



HLA検査のエッセンス Vol.3 LABType

LABType試薬の概要と手技

株式会社ベリタス

2025/3/5

本日の内容

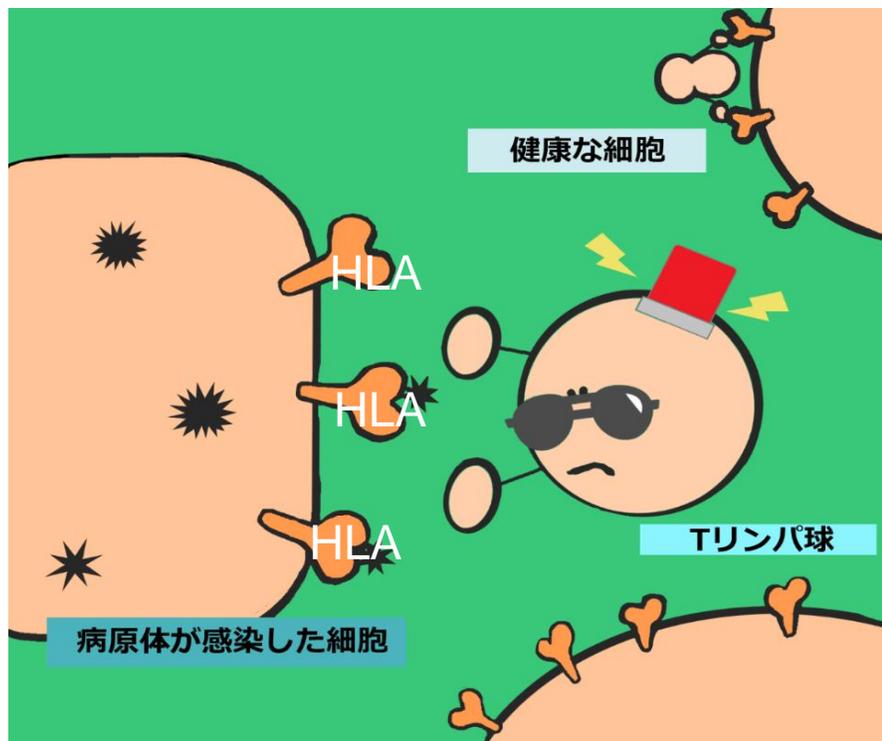
- HLAとは
- LABType試薬概要
- LABType手技のポイント



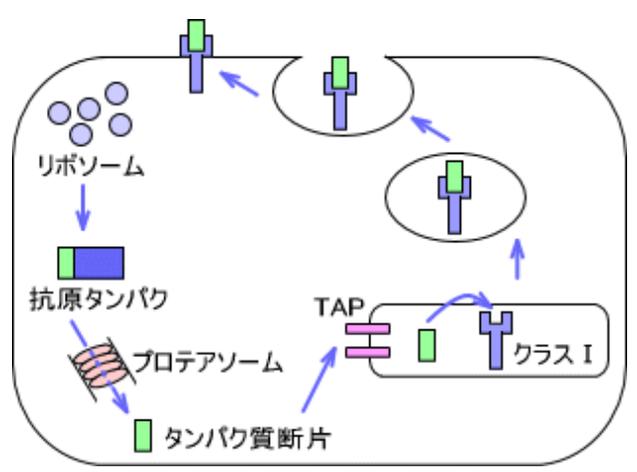
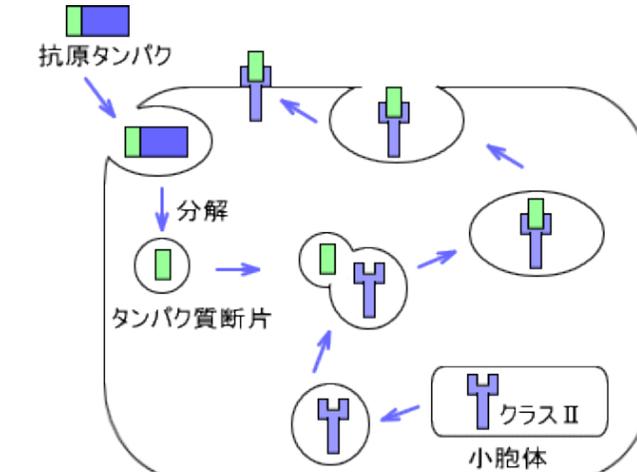
HLAとは

HLA (Human Leukocyte Antigen)

- 多くの細胞に発現しており、自己と非自己を認識する免疫システムの一つ
- HLA分子上に抗原（ペプチド）を結合し、免疫細胞に提示
- Class I、Class IIに大別：A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成



HLA抗原 (Class IとClass IIの違い)

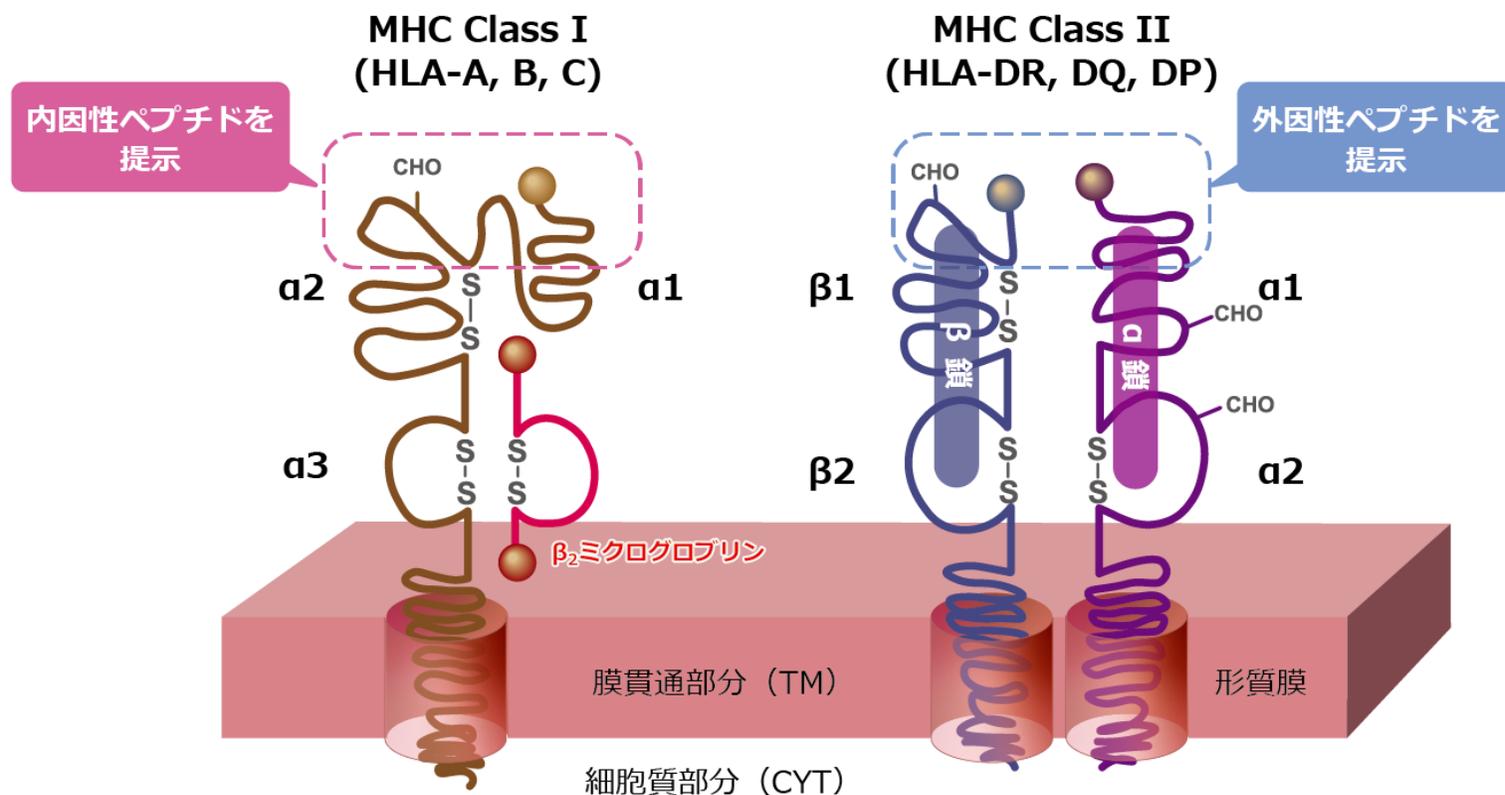
項目	Class I	Class II
主な抗原 (ローカス)	A, B, C	DR, DQ, DP
発現している細胞	ほとんどの有核細胞 (T細胞、B細胞、血小板など)	抗原提示細胞 (B細胞、樹状細胞など)
抗原として提示するもの	細胞内で合成された タンパク質 (自己タンパク、腫瘍細胞タンパクなど)	細胞外から入ってきた タンパク質 (ウイルス、微生物など)
抗原を認識する細胞	キラーT細胞 (CD8+T細胞)	ヘルパーT細胞 (CD4+T細胞)
抗原提示の機序	 <p>The diagram illustrates the Class I antigen presentation pathway. It shows a cell with ribosomes (リボソーム) synthesizing antigen proteins (抗原タンパク). These proteins are then degraded by a proteasome (プロテアソーム) into peptide fragments (タンパク質断片). These fragments are transported through the TAP transporter (TAP) into the endoplasmic reticulum, where they bind to Class I molecules (クラス I). The resulting peptide-MHC complex is then transported to the cell surface and presented to a T cell.</p>	 <p>The diagram illustrates the Class II antigen presentation pathway. It shows an extracellular antigen protein (抗原タンパク) entering the cell. The protein is degraded (分解) into peptide fragments (タンパク質断片) within a vesicle (小胞体). These fragments then bind to Class II molecules (クラス II) within the vesicle. The resulting peptide-MHC complex is transported to the cell surface and presented to a T cell.</p>

図は<http://kusuri-jouhou.com/immunity/hijiko.html>より抜粋

細胞表面におけるHLA分子の発現

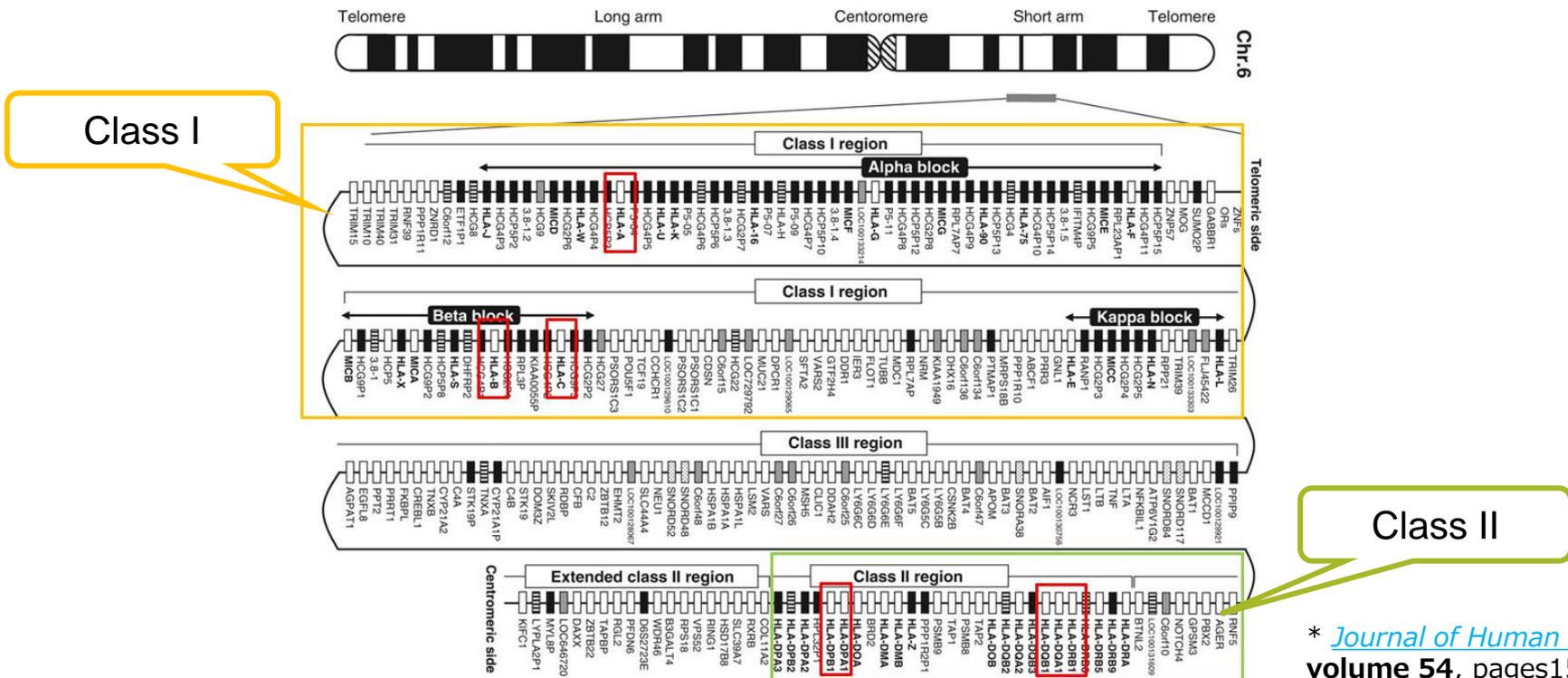
- Class I (A, B, C)
 - α 鎖 + β 2ミクログロブリン
 - α 1- α 2領域でペプチドを提示

- Class II (DR, DP, DQ)
 - α 鎖と β 鎖が会合
 - α 1、 β 1領域でペプチドを提示



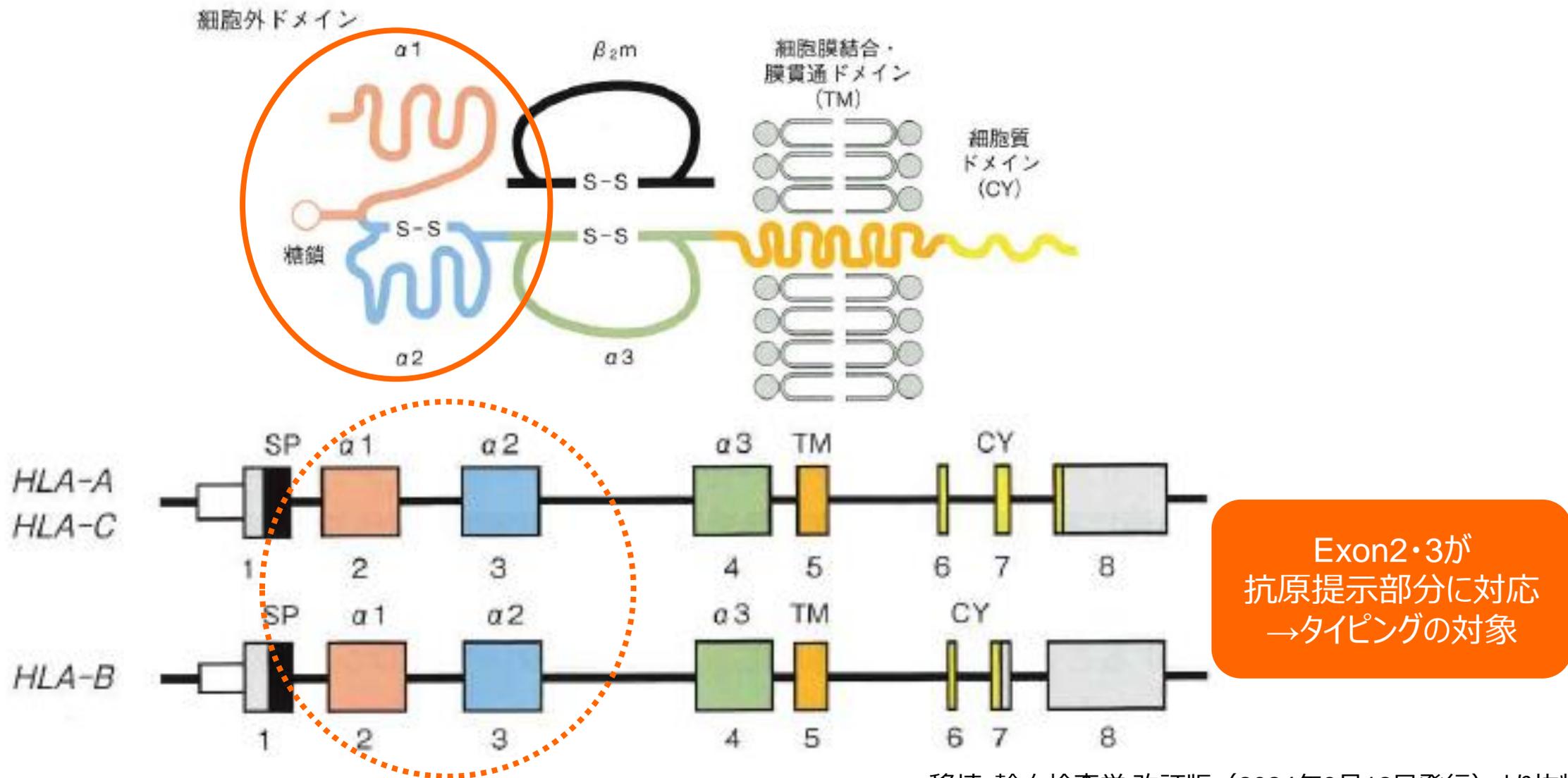
HLA遺伝子

- HLAをコードする遺伝子は第6染色体の短腕部に集中して存在
 - Class I : A、B、C α -カス
 - Class II : DRB1、DRB3/4/5、DQA1、DQB1、DPA1、DPB1 α -カス



* [Journal of Human Genetics](#)
volume 54, pages15–39(2009)

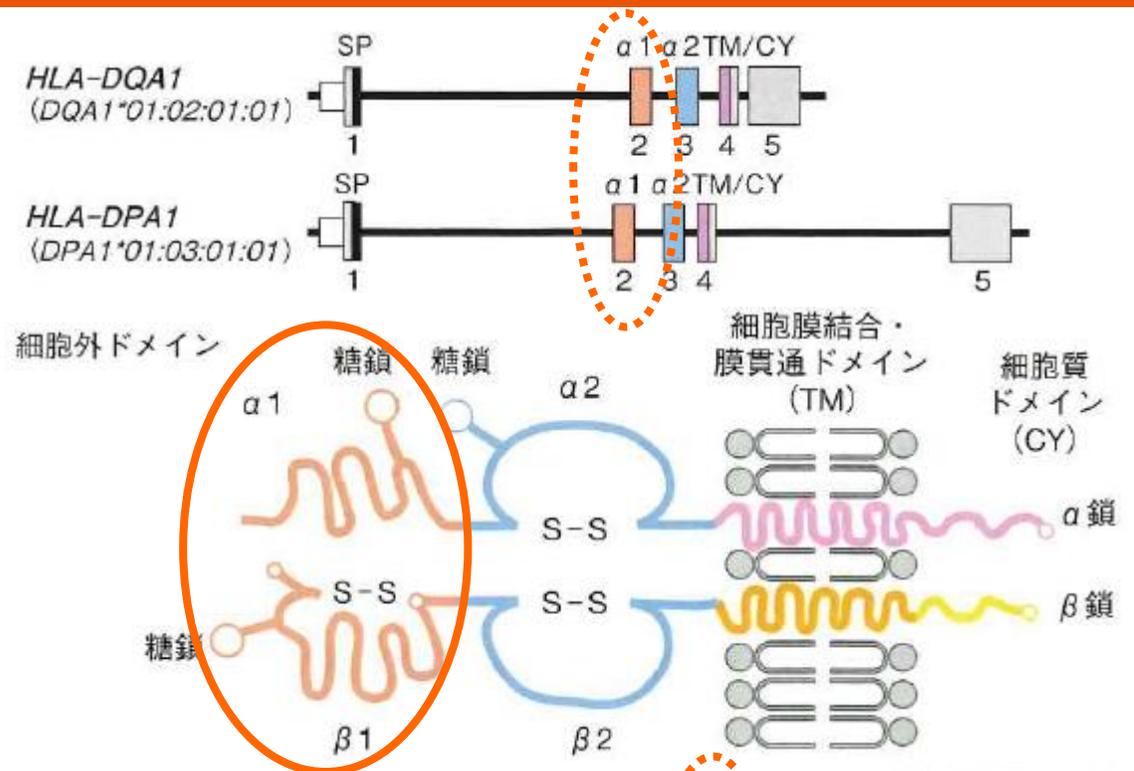
HLA分子と遺伝子の関連、タイピング領域 (Class I)



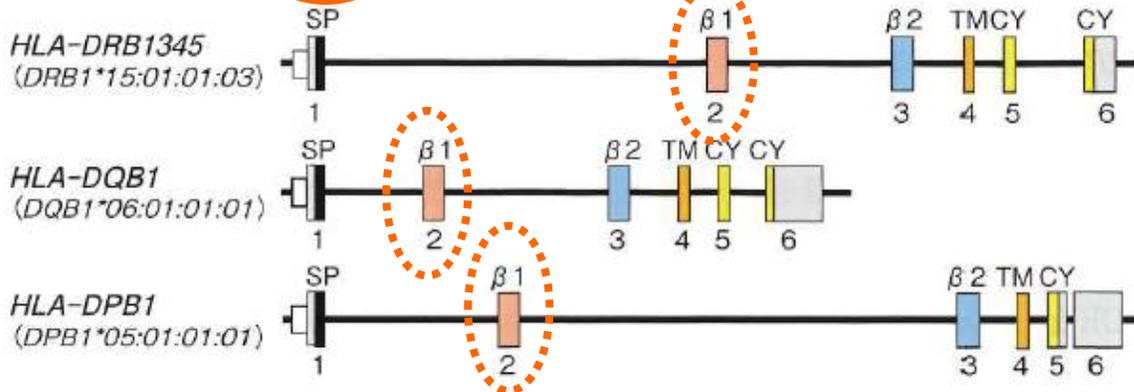
移植・輸血検査学 改訂版 (2024年9月12日発行) より抜粋

HLA分子と遺伝子の関連、タイピング領域 (Class II)

α鎖



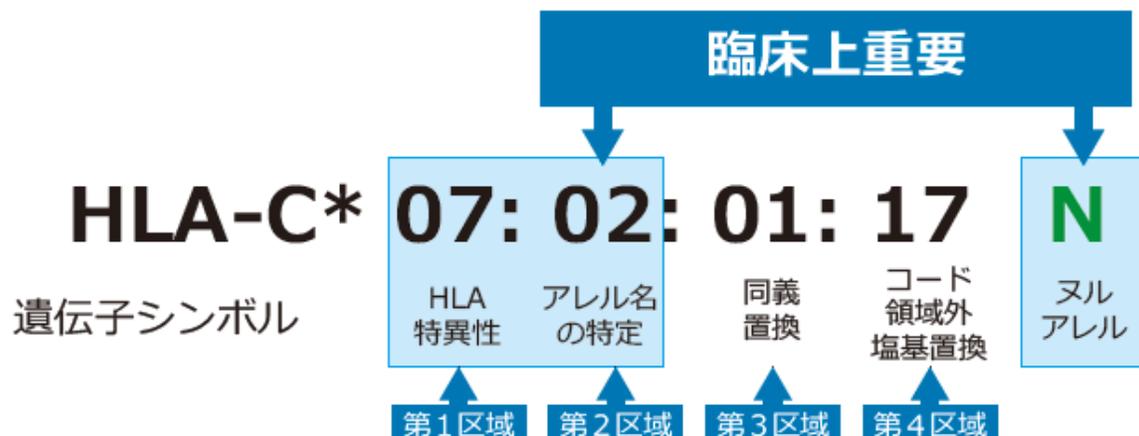
β鎖



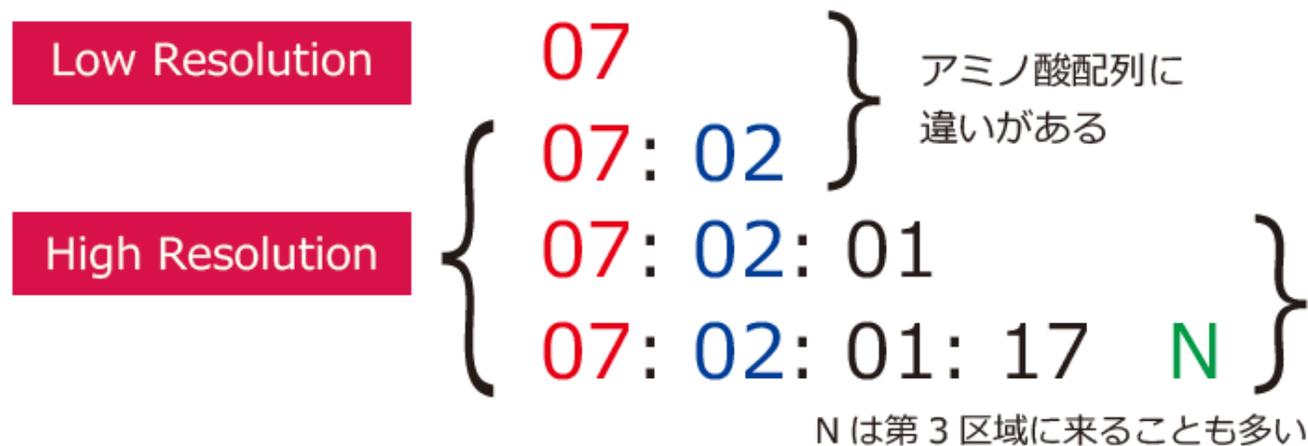
α鎖とβ鎖のExon2が抗原提示部分に対応
 →タイピングの対象

※DRA1の多型性は低いため一般にタイピングの対象外とされる

HLAの表記方法



表記レベル



区域	呼称
第1区域	2桁、抗原型、血清型、HLA型
第2区域	4桁、アレル型、DNA型
第3区域	6桁
第4区域	8桁

HLAの特長①頻度と多様性

- 多様性が非常に高く膨大な数のアレルが存在する
- 人種によりアレル頻度が大きく異なる
 - みなし判定をする場合は検体に適した頻度データを使用することが重要

IMGT登録アレル数

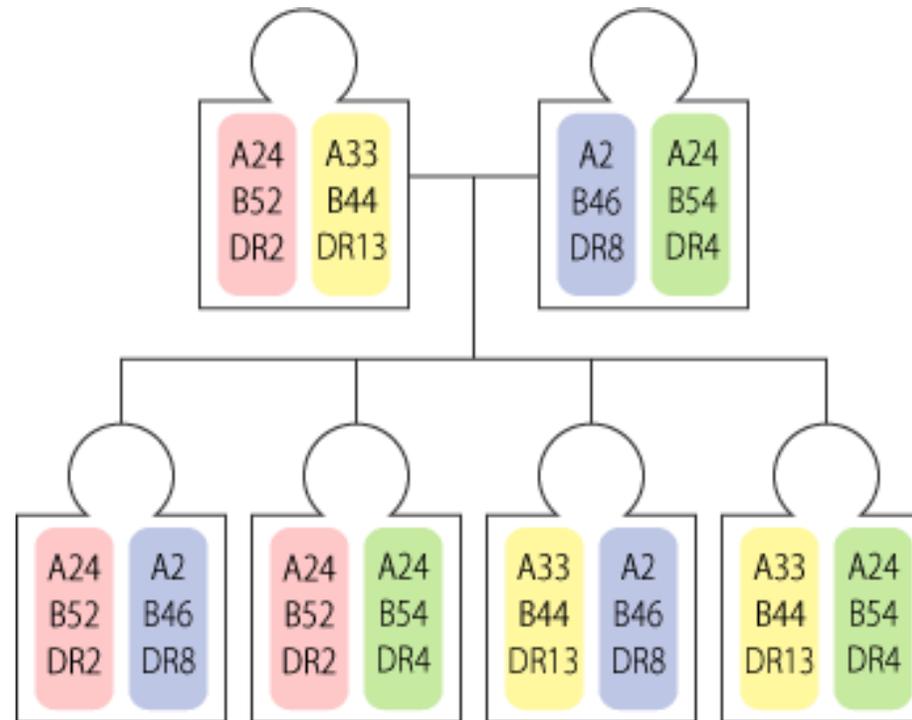
ローカス	アレル数	ローカス	アレル数
A	8,556	DRB1	3,787
B	10,346	DQA1	872
C	8,657	DQB1	2,813
		DPA1	765
		DPB1	2,795

A*01:01のアレルの頻度

アレル	日本	US (サンフランシスコ)	北アフリカ (チュニジア)
A*24:02	37.9%	7.8%	6.7%
A*02:01	11.5%	24.7%	17.5%
~			
A*01:01	0.9%	16.0%	11.2%
A*23:01	-	2.3%	9.4%

HLAの特長②ハプロタイプ

- 両親より受け継いだそれぞれのHLAの組み合わせ = ハプロタイプ
- ハプロタイプは基本的に維持されたまま親から子に遺伝する
 - 兄弟でHLAが一致する確率は25%



- 昨年4月に開催したWeb講習会で詳しく説明しております
 - https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/weblecture-hlabasic12_1.html



VERITAS

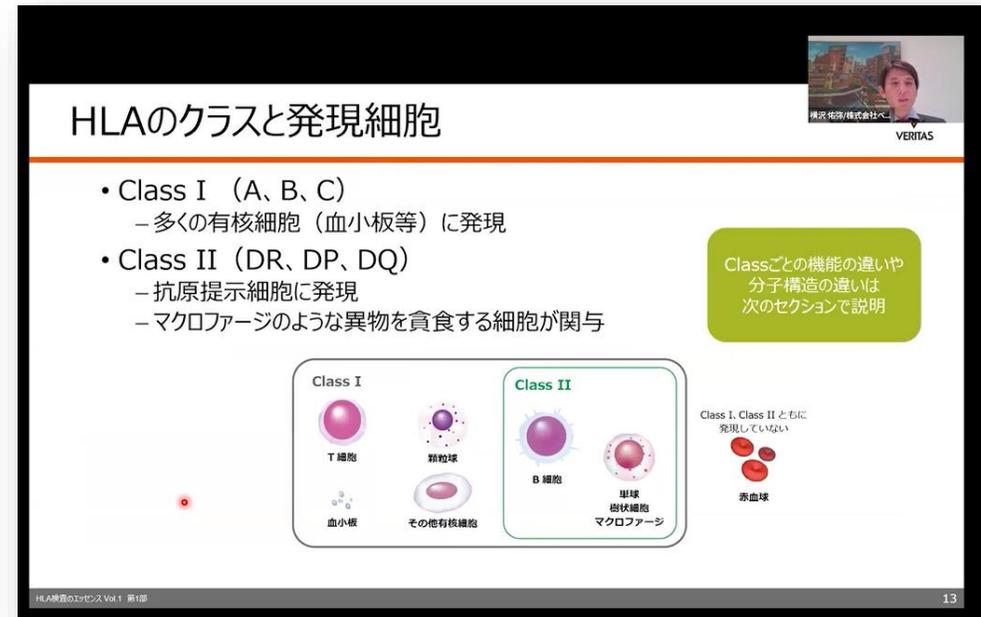
HLA 検査のエッセンス

Vol.1 HLA の基礎

Part1 HLA とは

2024年4月25日開催

Illustration: A scientist in a white coat and cap stands next to a large glass jar labeled 'HLA Typing'. The jar contains a cartoon character with sunglasses and the text 'Eplet Antibody Detection'. Another scientist in a white coat stands to the right, holding a tablet. The background is orange.



HLAのクラスと発現細胞

- Class I (A, B, C)
 - 多くの有核細胞（血小板等）に発現
- Class II (DR, DP, DQ)
 - 抗原提示細胞に発現
 - マクロファージのような異物を貪食する細胞が関与

Classごとの機能の違いや分子構造の違いは次のセクションで説明

Class I	Class II
T細胞	B細胞
顆粒球	単球
血小板	樹状細胞
その他有核細胞	マクロファージ

Class I, Class II ともに発現していない

赤血球

VERITAS

HLA検査のエッセンス Vol.1 第1部 13



VERITAS

Veritas Corporation

LABType試薬概要

HLAタイピング検査法



rSSO (reverse Sequence Specific Oligonucleotide) 法

PCR増幅

- ビオチンで標識したプライマーを使用して目的の遺伝子領域を増幅

アルカリ変性

- アルカリ性の条件のもとで2本鎖を1本鎖にする

ハイブリダイゼーション

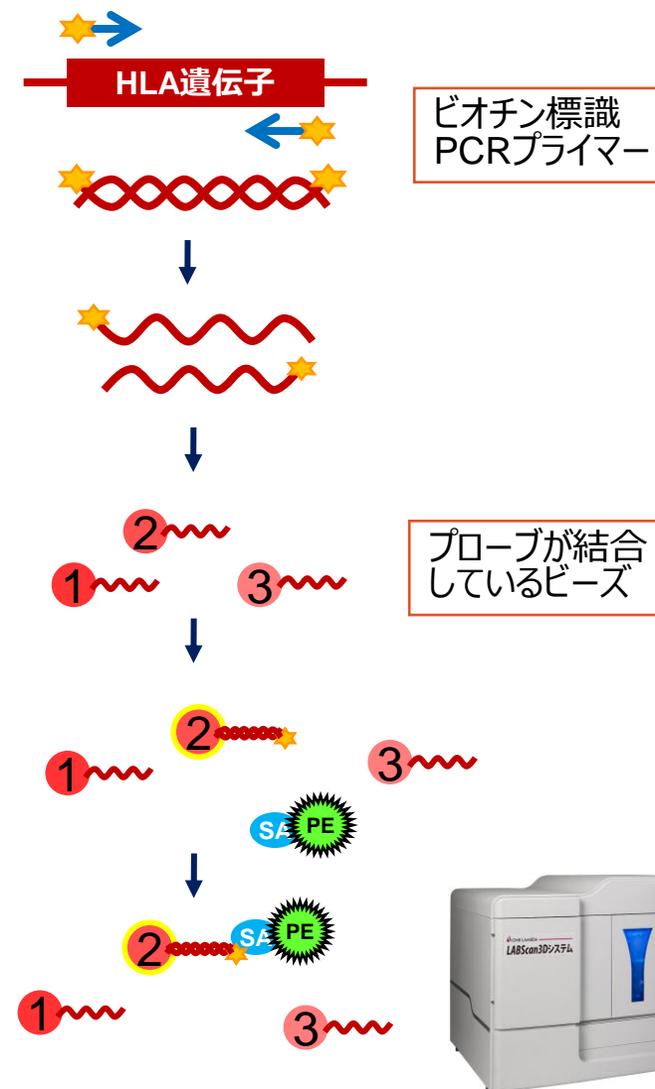
- プロブが結合しているビーズに1本鎖にしたDNAを反応させる

SAPEでの標識

- ビオチンに蛍光標識をしたストレプトアビジンを結合させる

測定

- LABScanシステム/LABScan3Dシステムで測定



タイピング領域が広い+ビーズのプローブ数が多いほど解像度が高くなる

LABType SSOシリーズ (LABScan、LABScan3Dで測定可) 2桁レベル

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType SSO HLA A Locus	RSSO1A	100 tests	RSO1AT	20 tests
LABType SSO HLA B Locus	RSSO1B	100 tests	RSO1BT	20 tests
LABType SSO HLA C Locus	RSSO1C	100 tests	RSO1CT	20 tests
LABType SSO HLA DRB1	RSSO2B1	100 tests	RSO2B1T	20 tests
LABType SSO HLA DRB3,4,5	RSSO2345	100 tests	RSO2345T	20 tests
LABType SSO HLA DQA1/DQB1	RSSO2Q	100 tests	RSO2QT	20 tests
LABType SSO HLA DPA1/DPB1	RSSO2P	100 tests	RSO2PT	20 tests

LABType CWDシリーズ (LABScan 3D専用) 4桁レベル

2024年アップデート

商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType CWD Class I A Locus	RSSOW1A	100 test	RSOW1AT	20 test
LABType CWD Class I B Locus	RSSOW1B	100 test	RSOW1BT	20 test
LABType CWD Class I C Locus	RSSOW1C	100 test	RSOW1CT	20 test
LABType CWD Class II DRB1 Locus	RSSOW2B1	100 test	RSOW2B1T	20 test

LABType CWDについて

2024年アップデート



- プローブ数が大幅に増加
 - CIWD 3.0で定義されたアレルの検出に最適化
 - ※CIWD3.0：従来の分類システム（CWD2.0）のアップデートバージョン
 - HLAアレルをCommon・Intermediate・Well Documentedに分類
- 測定法は従来と同じまま、より広範囲・高精度に4桁タイピングが可能

使用しているプローブ数

Locus	旧バージョン	新バージョン
A	204	419
B	210	465
C	187	299
DRB1	140	244

タイピング結果例

CIWD フィルタを使用			
Allele 1	Allele 2	G	SA
A*02:06:01:01	A*24:02:01:01	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:04	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:05	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:06	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:07	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:08	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:12	G1	

青： Common
紫： Intermediate
ピンク： Well documented

日本人フィルタを使用			
Allele 1	Allele 2	G	SA
A*02:06:01:01	A*24:02:01:01	G1	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:03	G2	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:05	G2	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:06	G2	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:07	G2	
A*02:06:01:01	A*24:02:01:08	G2	

青： 日本人高頻度アレル

LABTypeキット内容

	試薬名	注意点
PCR前	Locus-Specific Primer Set	冷凍 (-20℃以下)
	Primer Set D-mix	冷凍 (-20℃以下)
PCR後	Bead Mixture	解凍後3か月以内に使用 開封後は冷蔵・遮光、再凍結禁止
	Denaturation Buffer	25℃以下で保存 NaOHのため取扱い注意
	Neutralization Buffer	25℃以下で保存、紫のキャップ
	Hybridization Buffer	25℃以下で保存
	Wash Buffer	25℃以下で保存
	SAPE Buffer	冷蔵 (2-8℃) 保存

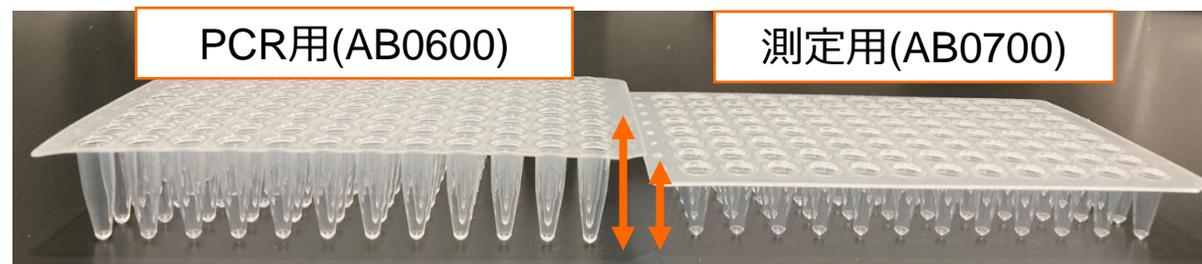
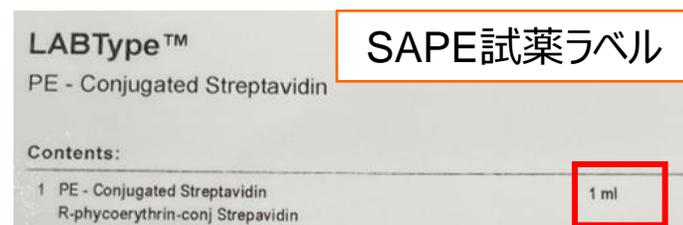
- Primer SetとBeads Mixtureは試薬の種類、ローカスごとに異なる
- その他の試薬は全てのLABTypeキットで共通



キット以外に必要な試薬・消耗品

種類	商品名	メーカー
SAPE (標識試薬)	PE-Conjugated Streptavidin	ベリタス(One Lambda)LT-SAPE <ul style="list-style-type: none"> 粉末試薬のため事前にラベルに記載されている容量の精製水で溶解 溶解後は冷蔵で6か月保存可能
PCRポリメラーゼ	AmpliAq DNA Polymerase Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8080160

種類	商品名	メーカー
プレート	PCRプレート (PCR用)	Thermo Fisher Scientific AB0600
	PCRプレート (ロープロファイル、測定用)	Thermo Fisher Scientific AB0700
PCRシール	Adhesive Sealing Sheet	Thermo Fisher Scientific AB0558
	SSP Tray Seals (ハイブリ用)	ベリタス (One Lambda) SSPSEA300/同等品でも可



キット以外に必要な器具・装置

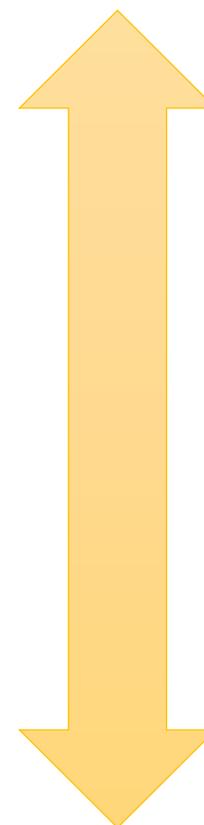
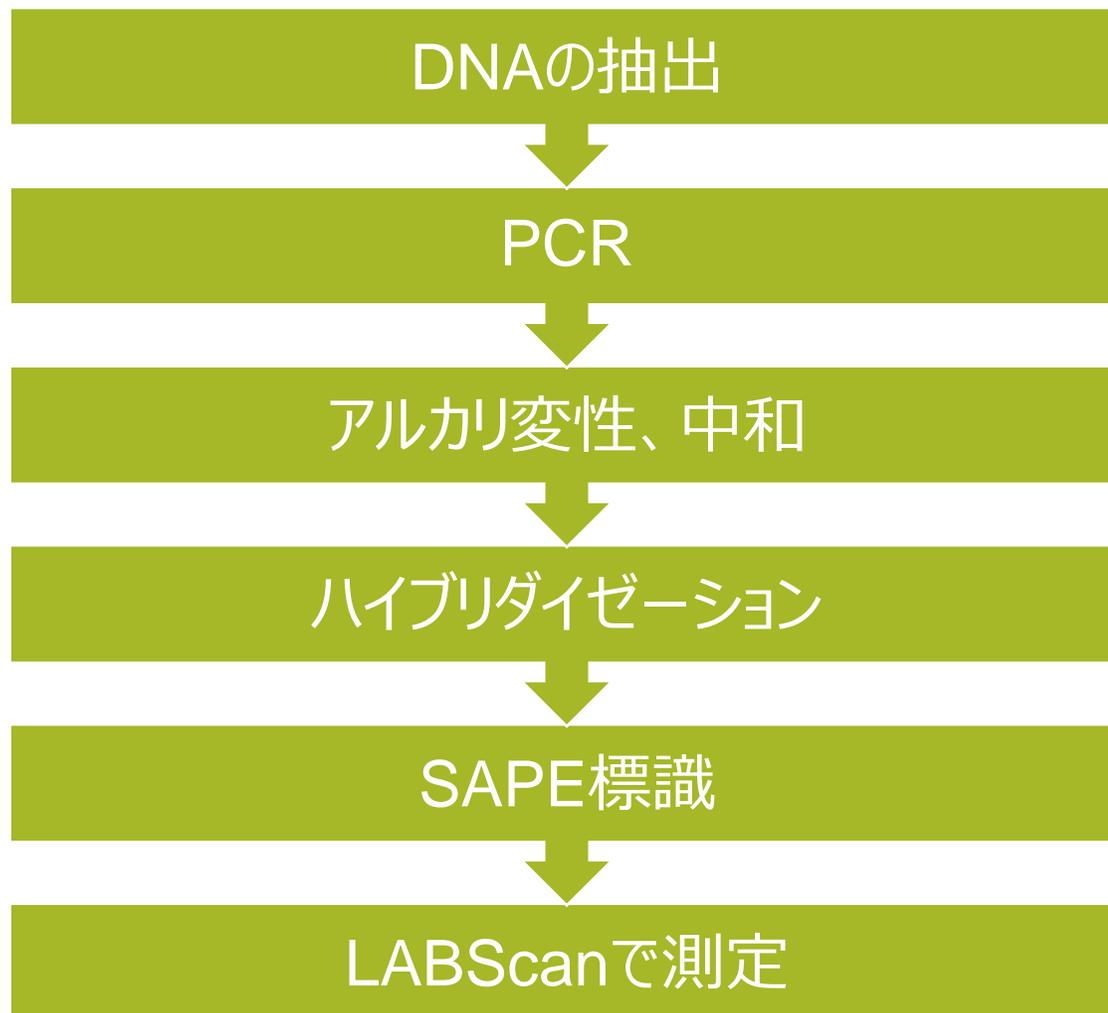
種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	Veriti 96-Well サーマルサイクラー	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
PCRパッド	マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	ベリタス (One Lambda) SSPPADTN
遠心機	プレート遠心機	96 wellプレートを1300 g以上で遠心ができる機器/ メーカー不問
測定機器	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	ベリタス (One Lambda)





LABType手技のポイント

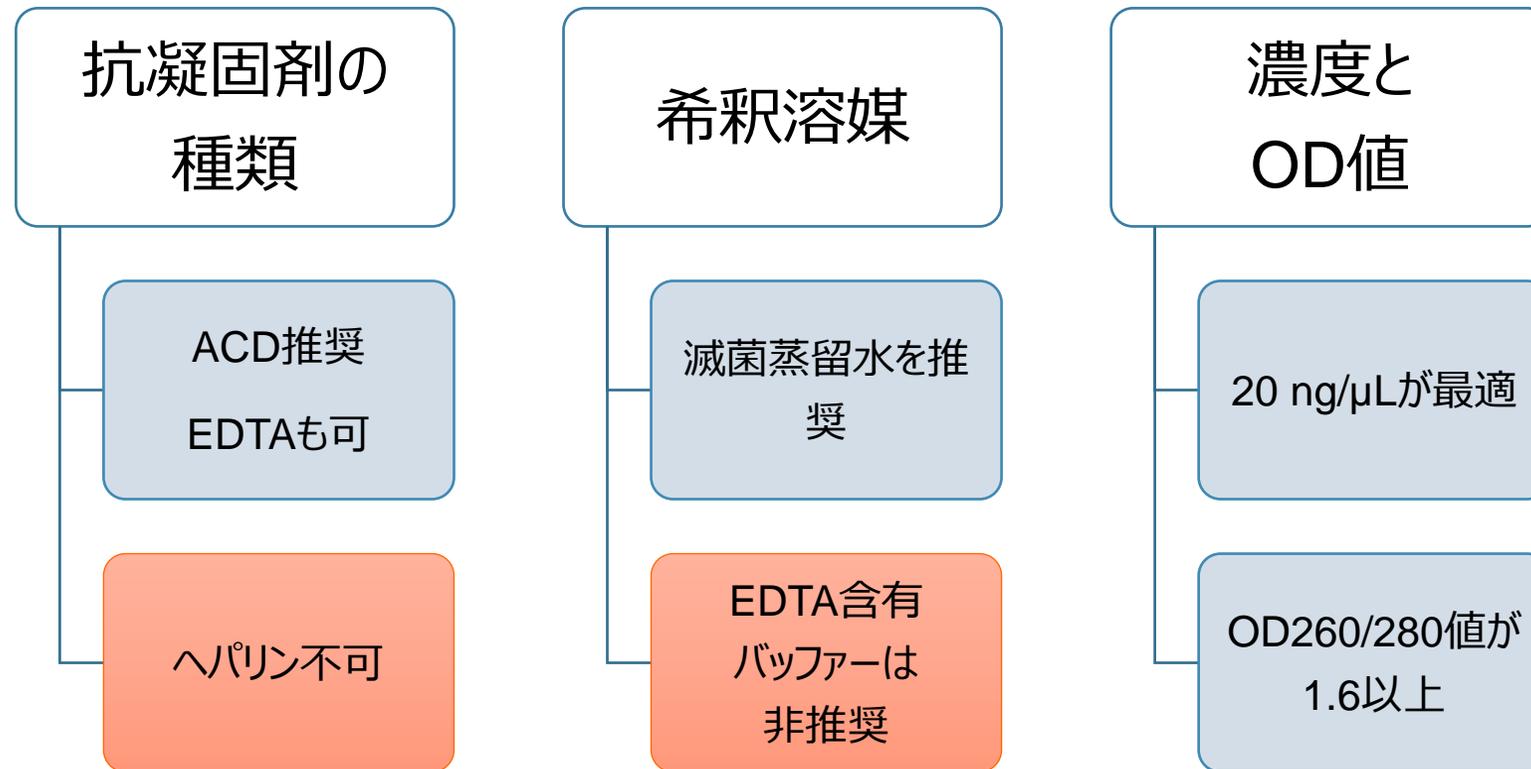
LABType測定の流れ



PCRから測定終了まで
約3時間

DNA抽出のポイント

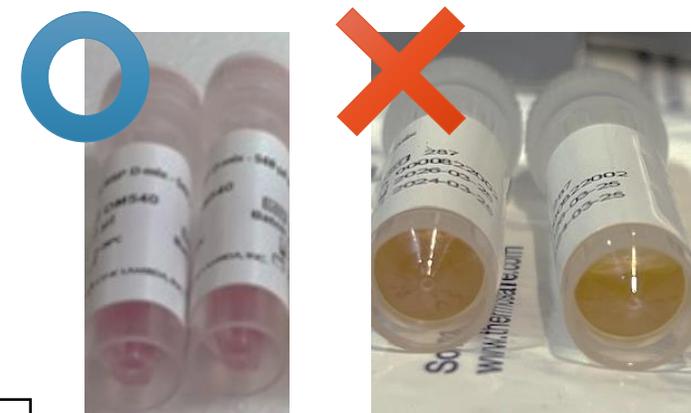
- PCRに適した品質、濃度のDNAを抽出
- PCRを阻害する成分の混入を避ける



PCR試薬（プレミックス液）の調製

- D-mix、Primerを融解
 - D-mix、Primer mixはよくボルテックス
 - D-mixの色を必ず確認
- PCRトレイはAB0600を使用
- DNAを各ウェルに2 μL 分注する
- AmpliTaqは使用直前に冷凍庫から取り出す
 - 混ぜる際はピペティング（ボルテックス不可）

D-mixの色は濃いピンク～紫色
黄色に変色したD-mixは使用不可



プレミックス液の容量（1ウェルあたり）

検体数が多い場合→ローカス毎に調製

Primer mix（ローカスごと）	4.0 μL
D-mix	13.8 μL
AmpliTaq	0.2 μL
合計	18.0 μL

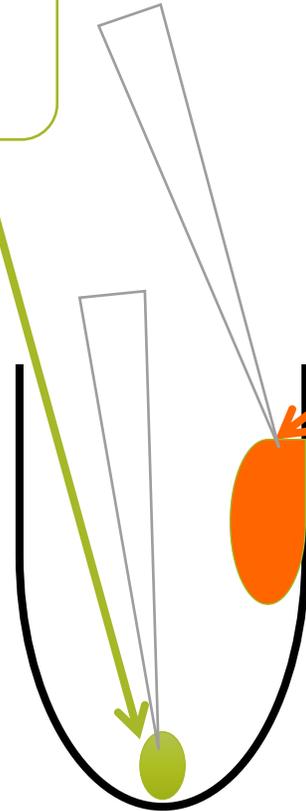
検体数が少ない場合→全ローカス分まとめて調製
プライマーはDNAと同様にウェルに添加しておく

D-mix	13.8 μL
AmpliTaq	0.2 μL
合計	14.0 μL

検体とプレミックス液の分注

※検体数が多い場合の操作

①DNA 2.0 μL を
ウェルの底部に分注



②プレミックス液 18 μL を分注

- D-mix (13.8 μL)
- Primer mix (4 μL)
- AmpliTaq (0.2 μL)

- プレミックス液は氷上で分注する
- ローカスと検体の対応およびコンタミネーションに注意する
- プレミックス液を分注した後はできるだけ速やかにサーマルサイクラーへ入れる

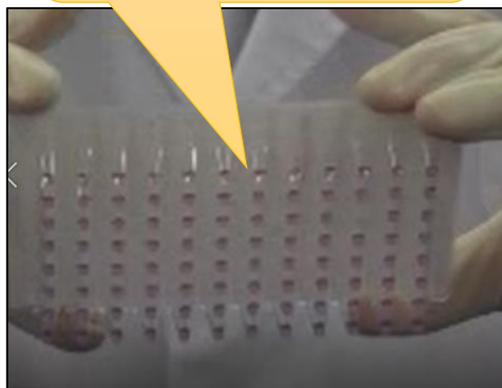
PCR (約85分)

- プレートシールをしっかりと貼る
- シリコンパッドの使用で蒸発防止
 - GeneAmpの場合はトレーも必ず使用
- 9600モード(Simulation Mode)を使用
- ホットスタートを推奨

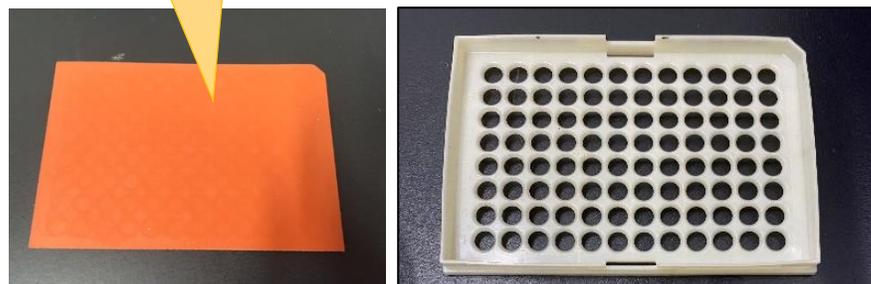
PCR条件 (Reaction volumeは20 uL)

温度	時間	サイクル数
96°C	3 min	1 cycle
96°C	20 sec	5 cycles
60°C	20 sec	
72°C	20 sec	
96°C	10 sec	30 cycles
60°C	15 sec	
72°C	20 sec	
72°C	10 min	1 cycle
4°C	Forever	

試薬がウェルの底にあることを確認

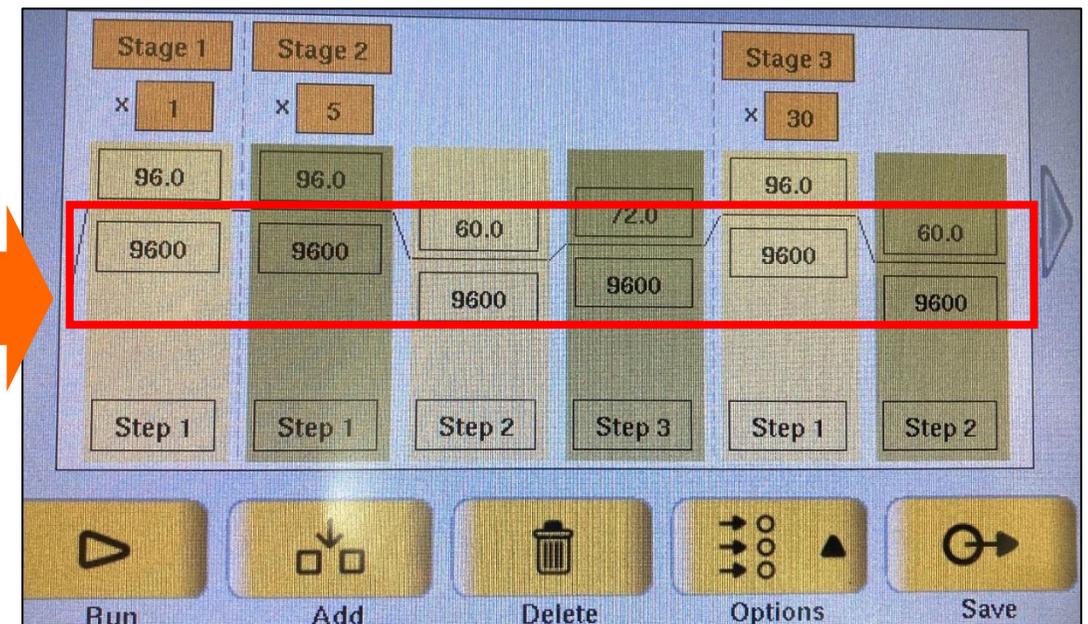
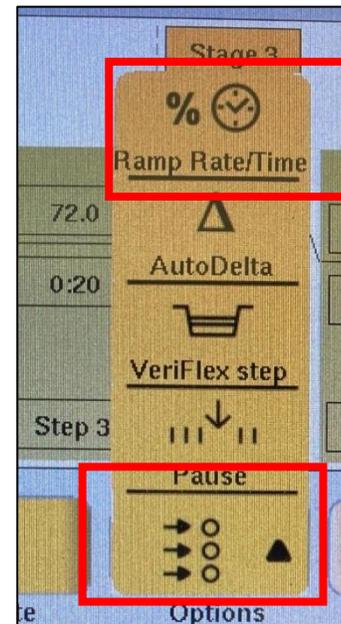
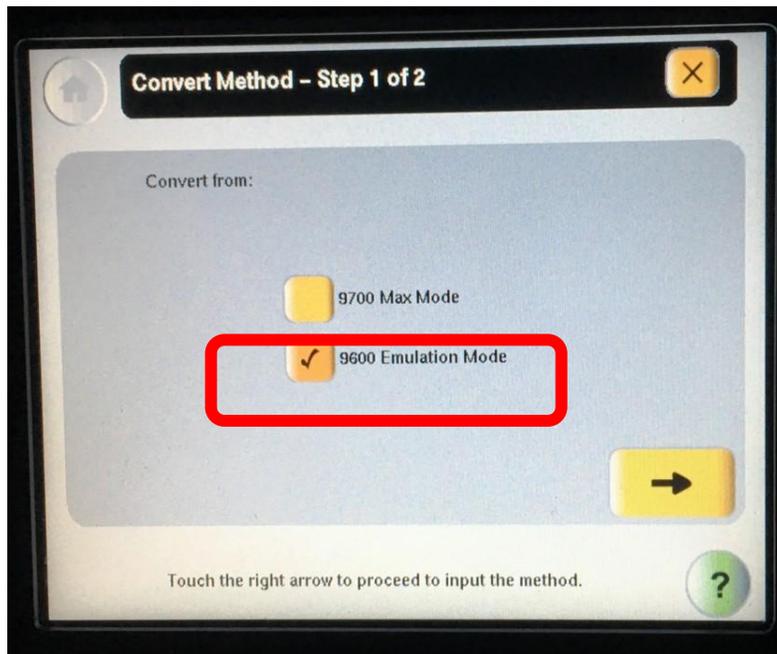


パッド&トレーで蒸発防止



※9600モードの設定・確認方法 (Veriti)

- 設定方法
 - Home画面>Tools Menu> Convert a Method> 9600 Emulation Modeを選択
- 確認方法
 - 使用するプログラムを選択しView
 - Options>Ramp Rate/Timeを選択
 - 各ステップの下の表示が「9600」になることを確認



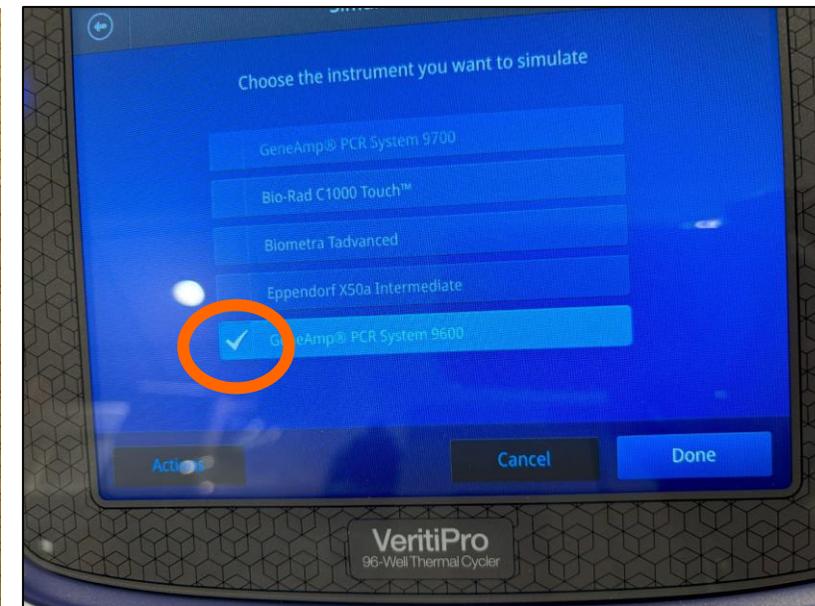
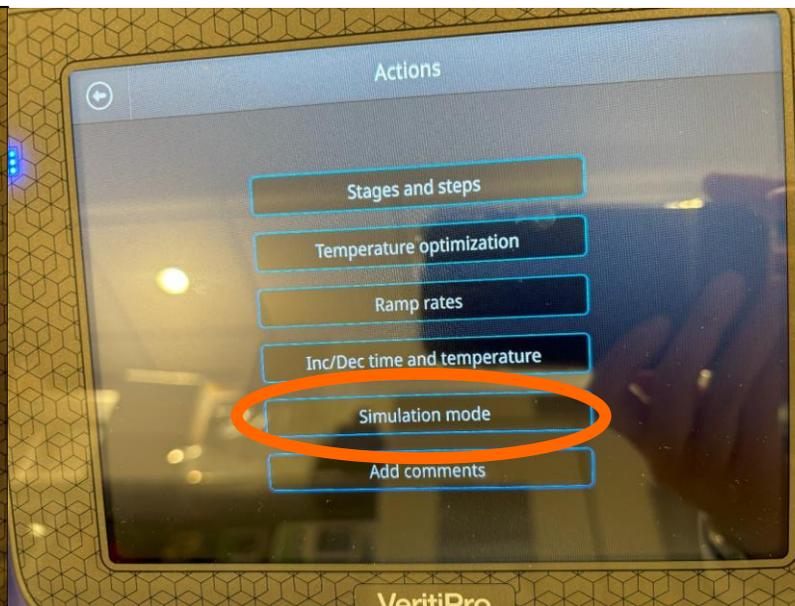
※9600モードの設定・確認方法（Veriti Pro）

- 設定方法

- Home画面のNew Method>Open template>Basic PCR>AmpliAqを選択
- プログラム画面のActions>Simulation modeを選択
- GeneAmp PCR System 9600を選択して「Done」を押す

- 確認方法

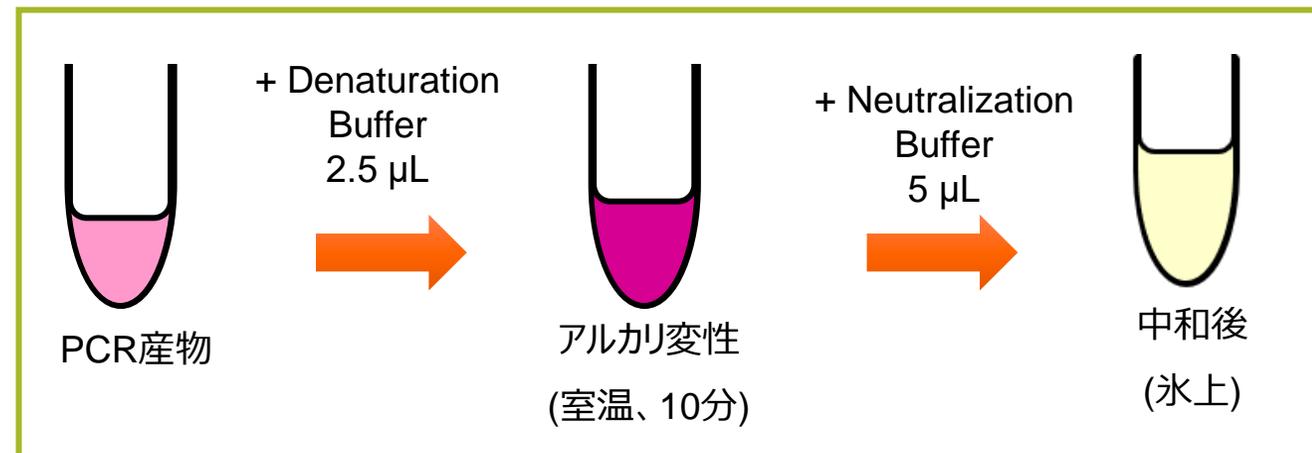
- Open Methodから使用するプログラムを選択
- 設定方法と同じ操作で「GeneAmp PCR System 9600」にチェックがあることを確認



アルカリ変性、中和

- PCR産物を取り出した後、サーマルサイクラーを60°Cに設定
- プレートはAB0700を使用
- プレートのウェル底にDenaturation Buffer 2.5 μ Lを分注しスピンドウン
- PCR産物 5 μ Lを8連ピペット（推奨）で分注、ピペッティングで混合
 - 溶液が濃いピンクに変色することを確認
- 室温で10分間静置。反応の間にビーズ試薬を調製（次スライド）
- 10分後、Neutralization Bufferを5 μ L加えピペッティングでしっかり混合
 - 溶液が透明に変色することを確認
 - 透明にならない場合は透明になるまで1 μ Lずつ追加

検体間のタイムラグを
少なく



Beads試薬の調製

- アルカリ変性の反応中に調製
- Bead Mixtureは、よくボルテックスした後に軽くスピンドウンしておく
 - 調製直前にもしっかりとピペティングで混合
- Beads試薬はローカス毎に調製する

Beads試薬の容量 (1ウェルあたり)

Bead Mixture	4.0 μ L
Hybridization Buffer	34.0 μ L
合計	38.0 μ L

保存中に結晶が析出している場合があるため
しっかり溶解しておく

- 調製後は氷上に置く

- 中和後のトレイを氷上に置き、氷上で分注する
- Beads試薬を38.0 μL ずつ分注
 - 分注直前もピペティングで混合する
 - ローカス毎に試薬は異なるので、分注間違いに注意
 - できるだけ速やかに分注
- 分注後、シールを貼り速やかにサーマルサイクラーへ入れる
- サーマルサイクラーで60°C、15分間反応
- サーマルサイクラーから取り出した後は速やかに氷上に置き、つづけて速やかにWash Buffer 70 μL を添加

洗浄操作（3回）

- Wash Buffer 70 μ Lを添加した後、トレイにシールを貼る
- 1500g、3分間（1300g、5分間でも可）遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス（ドライボルテックス）
- Wash Bufferを100 μ L添加し、遠心～ドライボルテックスを行う **2回繰り返す**

フリッキング



フリッキングは真下に1回のみ
終了後トレイは下向きのままにする

タッピング



数回キムタオルに押し付ける
(強く叩きつけない)

ドライボルテックス



ウェルの底のビーズが
ほぐれているかを確認する

- 3回目の洗浄時に調製、調製後は遮光保存
 - 全ローカス共通で作成
 - 1～2検体分多めに調製することを推奨
 - 例) 3検体、4ローカスの場合は $3 \times 4 + 2 = 14$ 検体分

1ウェルあたりの必要量

SAPE溶液	0.5 μ L
SAPE Buffer	49.5 μ L
合計	50.0 μ L

SAPE溶液の原液は事前に調製する

- 粉末の試薬を精製水で溶解
- 溶解後は冷蔵で6か月保存可能

保存中に結晶が析出している場合があるため
しっかり溶解しておく

- 50.0 μ Lずつ分注し、シールを貼る
- サーマルサイクラーで60℃、5分間反応

洗浄操作（1回）

- Wash Bufferを70 μ L添加し、シールを貼る
- 1500 g、3分間（1300 g、5分間でも可）遠心
- フリッキングにより上清を除去
- キムタオルの上で軽く3回程度タッピングする
- ビーズのみの状態でボルテックス（ドライボルテックス）

フリッキング



フリッキングは真下に1回のみ
終了後トレイは下向きのままにする

タッピング



数回キムタオルに押し付ける
（強く叩きつけない）

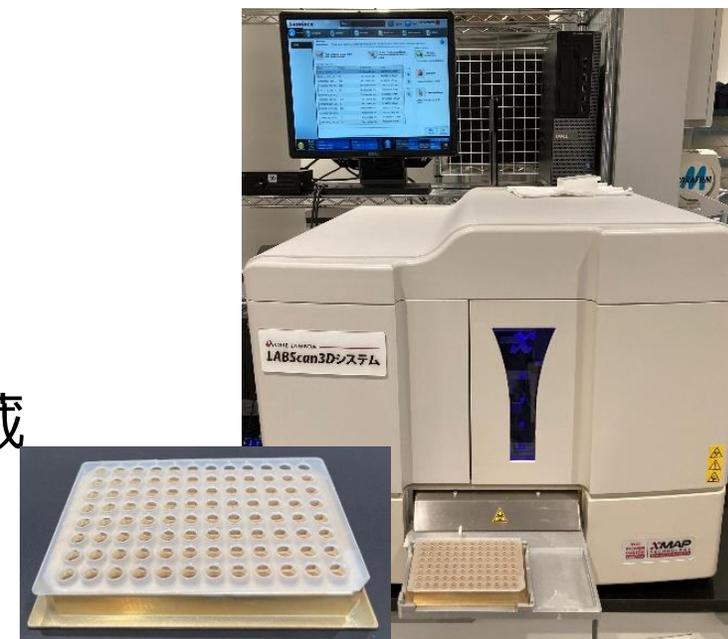
ドライボルテックス



ウェルの底のビーズが
ほぐれているかを確認

LABScanでの測定

- Wash Bufferを70 μ L加え測定
- 測定用のテンプレートファイルは試薬/ローカス/ロット毎に異なるため注意
 - テンプレートファイルはベリタスのWebよりダウンロード可能
 - https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html
- LABScanのメンテナンスを行っておく
 - Calibration/Verification
 - 週に一度：プローブ洗浄、Weekly Maintenance
 - 月に一度：Monthly Maintenance
- すぐに測定できない場合・・・
 - プレートにシールを貼り、さらにアルミホイルで遮光して冷蔵
 - 24時間保存可能
 - 測定前によくピペティングで混合してから測定する



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

