



# HLAの世界へようこそ！ Vol.3 LABType

第1部

LABType試薬の概要と手技

株式会社ベリタス

2026/2/19



**VERITAS**

Veritas Corporation

# LABType試薬概要

# HLAタイピング検査法



## • 検査を行うタイミング

- 各種バンク登録時 (臓器移植ネットワーク、日本骨髄バンクなど)
- 移植ドナー選定时 (家族間、バンクドナー確認検査など)

# 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

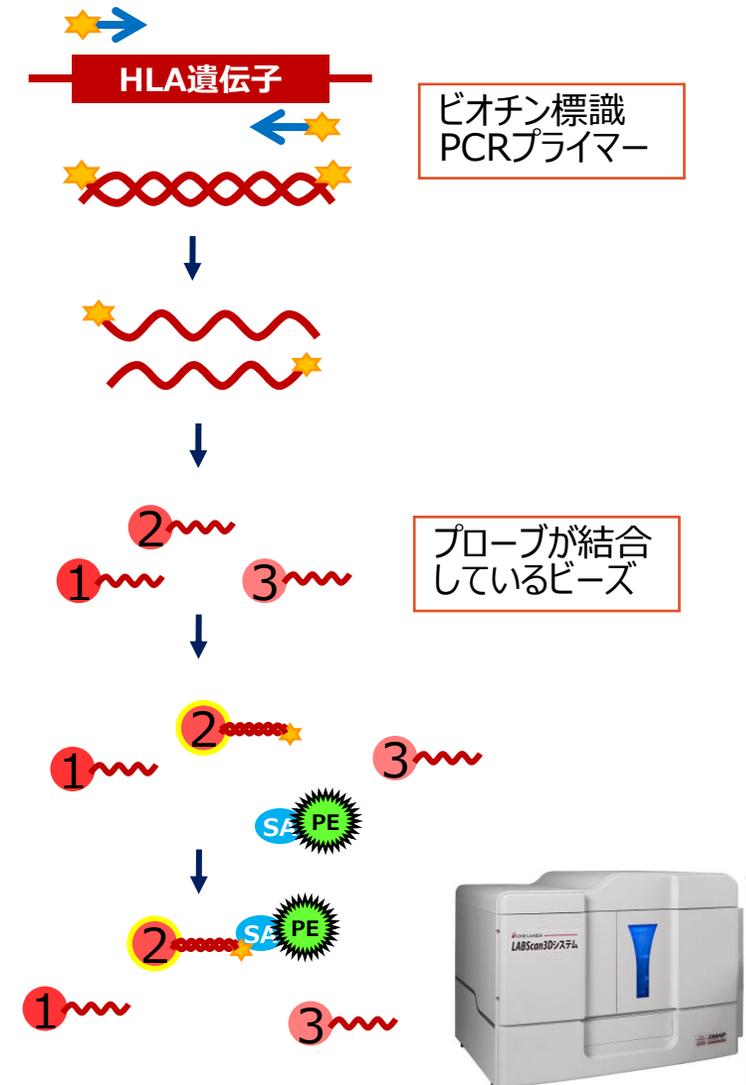
- プロブが結合しているビーズに1本鎖にしたDNAを反応させる

## 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

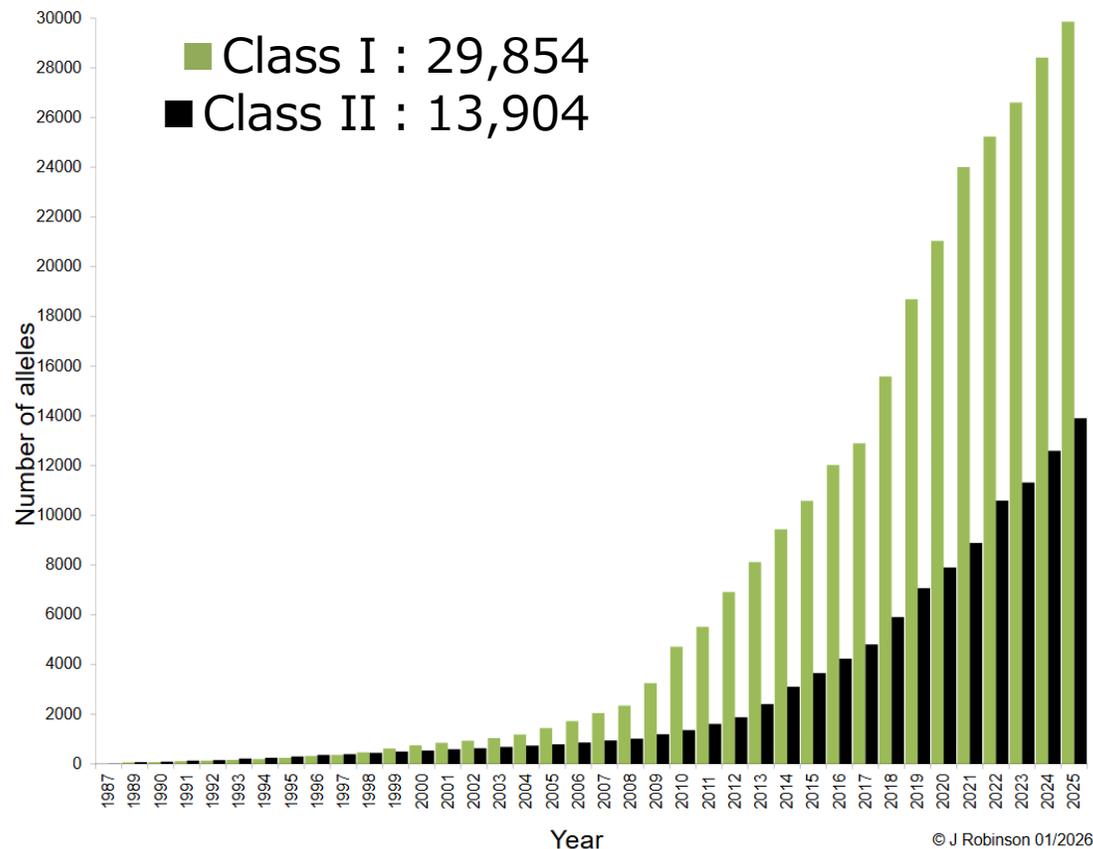
## 測定

- LABScanシステム/LABScan3Dシステムで測定



# LABTypeとは:HLAをタイピングする試薬

- HLAは多様性が非常に高く膨大な数のアレルが存在する
- この膨大なHLAの中から検体のHLAのタイピングをするのがLABType



アレル数の推移

ローカス	アレル数 (遺伝子)	タンパク
A	9,022	5,267
B	10,876	6,451
C	9,031	4,986
DRB	5,195	3,346
DQA1	994	486
DQB1	3,022	1,786
DPA1	897	406
DPB1	3,075	1,741

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>  
IMGT/HLA 3.63, 2026 Jan

# 試薬の種類とタイピングの方法

- 試薬はLABType SSOとLABType CWDの2種類
- HLA分子の中で抗原提示している領域
  - Class I : Exon2・3
  - Class II :  $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のExon2
- LABType SSO
  - 抗原提示部位の配列に着目し、その配列に対する反応性を確認することでタイピングを行う試薬
  - タイピング精度 : 第 1 区域
  - 抗原レベルでAmbiguityが残らないように設計
- LABType CWD
  - LABType SSOよりも読み取り領域を拡大
  - タイピング精度 : 第 2 区域
  - 第 2 区域のAmbiguityが大幅に減少

高解像度  
LABScan3D  
システム専用

Class	ローカス	LABType SSO	LABType CWD
I	A	Exon2-3	Exon2-5
	B	Exon2-3	Exon2-5
	C	Exon2-3	Exon2-7
II	DR	Exon2	Exon2
	DQ	Exon2	-
	DP	Exon2	-

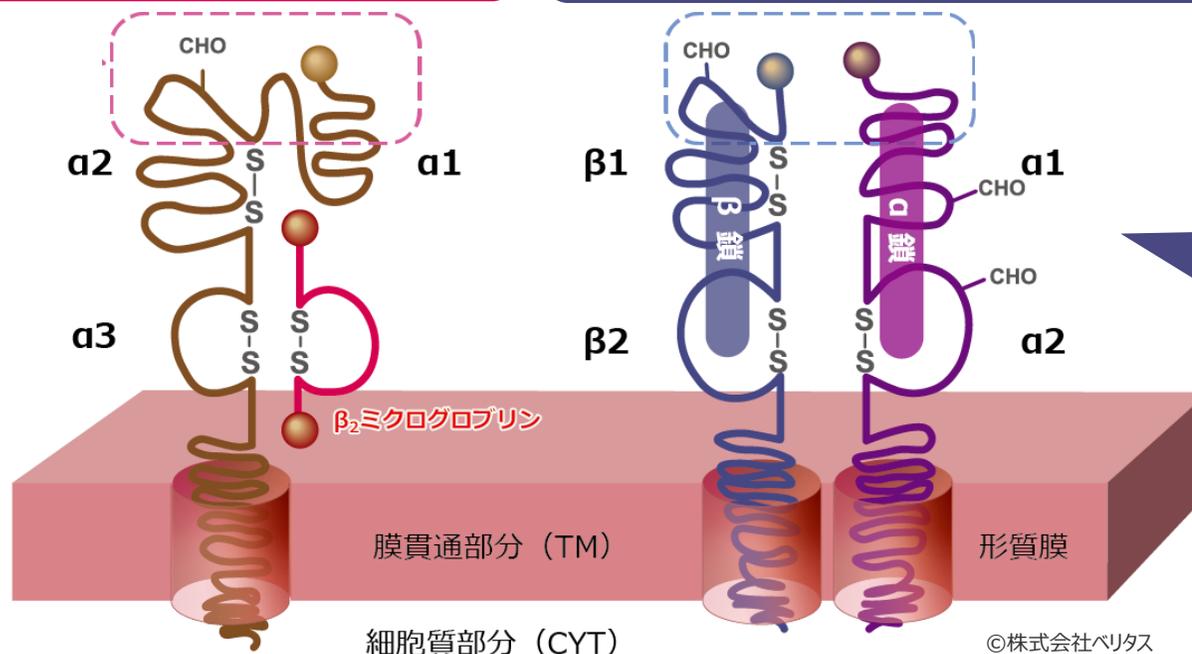
# おさらい：HLA（Human Leukocyte Antigen）とは？

- 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

Class I (A, B, C)  
α鎖 + β<sub>2</sub>ミクロglobリン

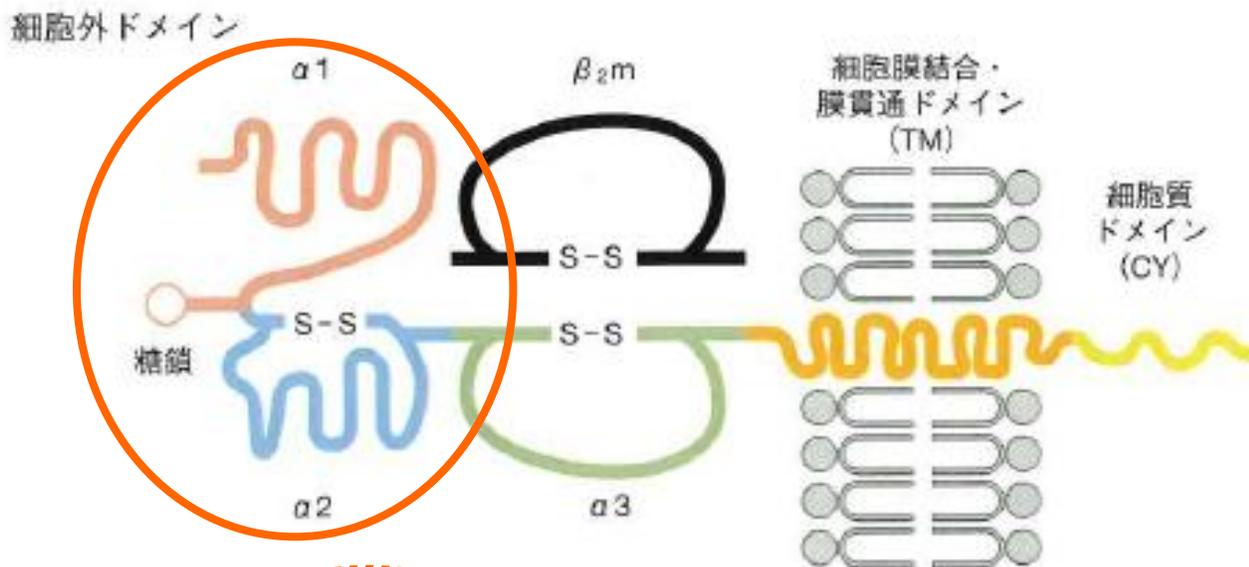
Class II (DR, DQ, DP)  
α鎖とβ鎖が会合

α1-α2領域で内因性  
ペプチドを提示



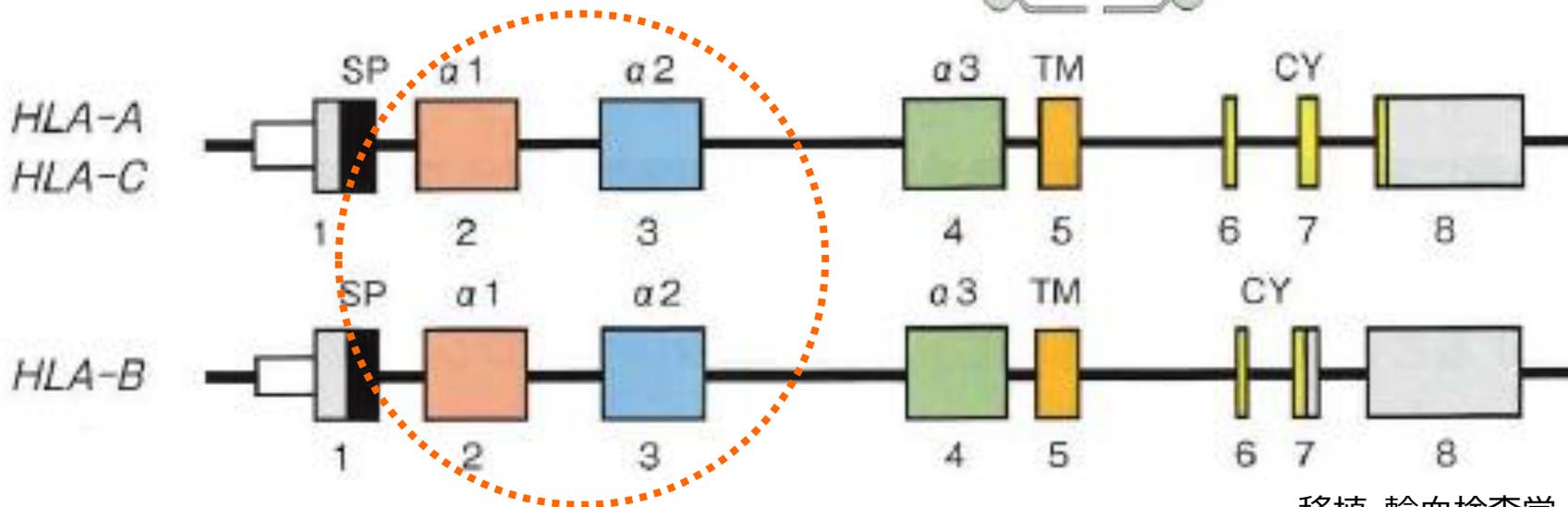
α1、β1領域で外因性  
ペプチドを提示

# おさらい： HLA分子と遺伝子の関連、タイピング領域（Class I）



## Class I タイピング領域

ローカス	LABType SSO	LABType CWD
A	Exon2-3	Exon2-5
B	Exon2-3	Exon2-5
C	Exon2-3	Exon2-7

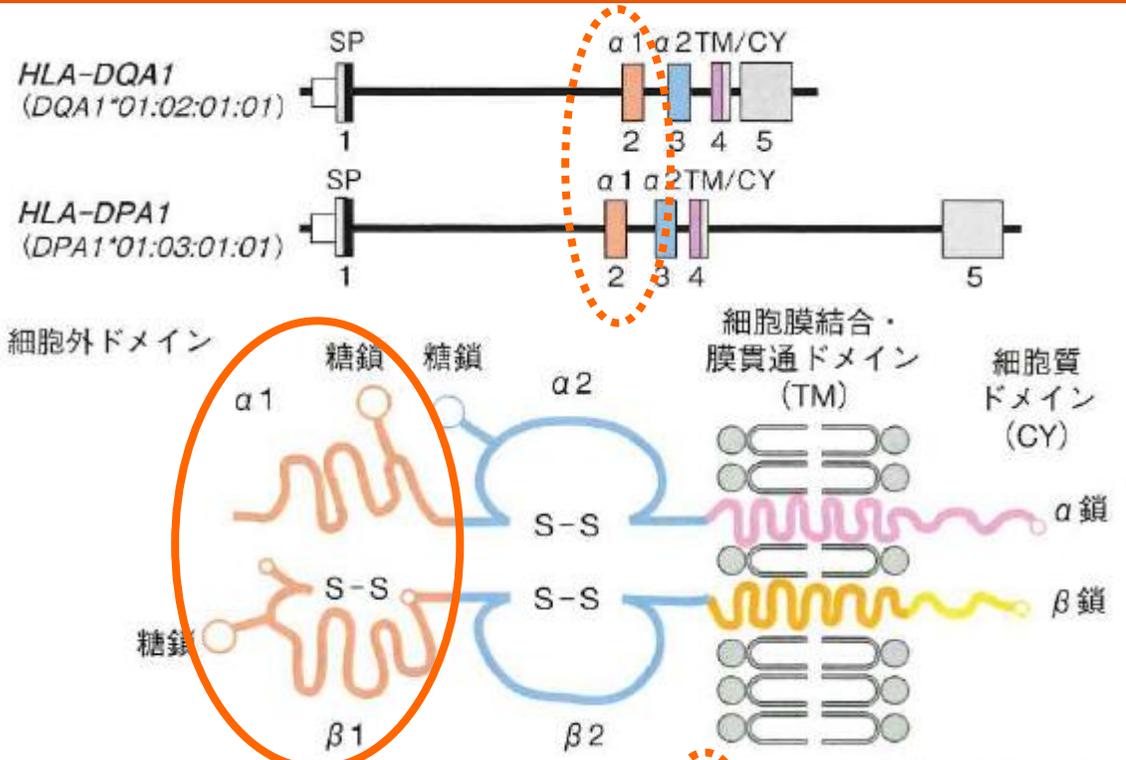


Exon2・3が  
抗原提示部分に対応

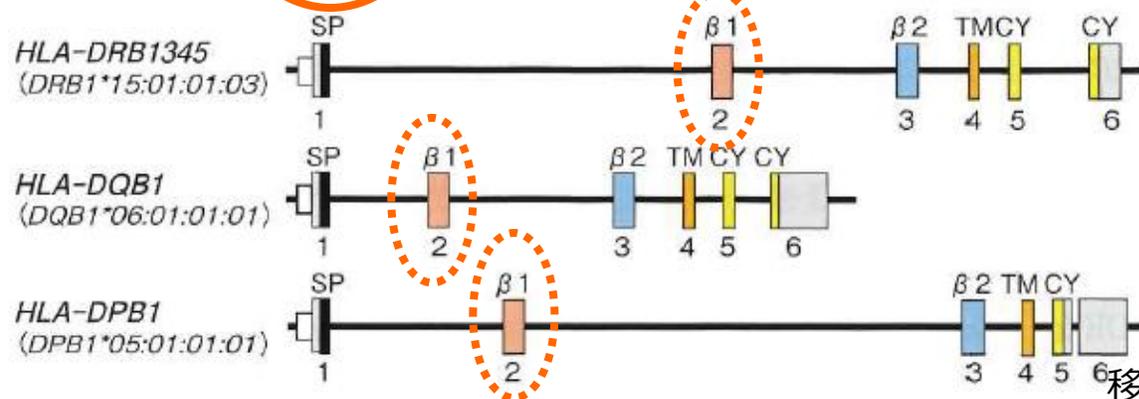
移植・輸血検査学 改訂版（2024年9月12日発行）より抜粋

# おさらい：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

# LABType製品一覧

## LABType SSOシリーズ

(LABScan、LABScan3Dで測定可) 第1区域

LABType SSO HLA A Locus	LABType SSO HLA DRB1
LABType SSO HLA B Locus	LABType SSO HLA DRB3,4,5
LABType SSO HLA C Locus	LABType SSO HLA DQA1/DQB1
	LABType SSO HLA DPA1/DPB1

DQ、DPは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖を同時にタイピング可能

## LABType CWDシリーズ

(LABScan 3D専用) 第2区域

LABType CWD Class I A Locus
LABType CWD Class I B Locus
LABType CWD Class I C Locus
LABType CWD Class II DRB1 Locus

梱包単位：100テスト、20テスト

## LABType CWDシリーズ特長

- 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

# 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のため取り扱い注意
	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

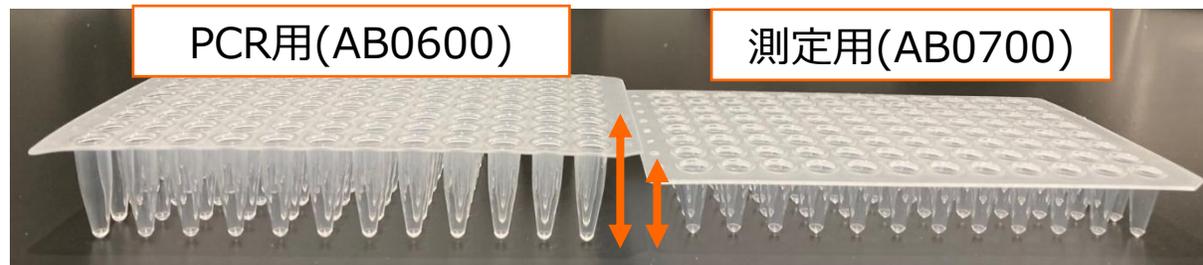
- Primer SetとBeads Mixtureは試薬の種類、ローカスごとに異なる
- その他の試薬は全てのLABTypeキットで共通



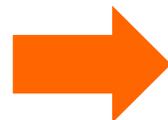
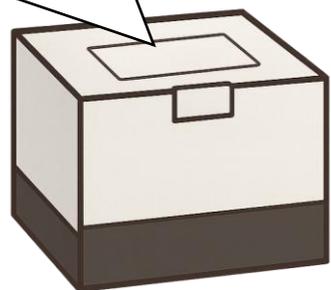
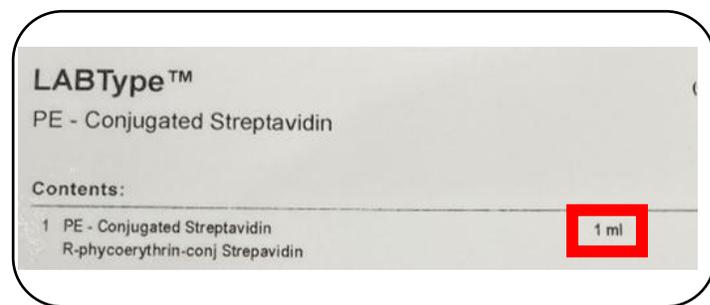
# キット以外に必要な試薬・消耗品

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"> <li>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</li> <li>溶解後は冷蔵で6か月保存可能</li> </ul>
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase <b>Goldは不可</b>	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



# SAPE試薬の調製方法



使用直前にSAPE Bufferで  
100倍希釈します

粉末状の試薬に、箱あるいはアルミ包装に記載された量の精製水を添加し混合します。

よく溶けたことを確認し、1～2時間 室温（20～25℃）においてから使用してください。溶液に懸濁物があり透明ではない場合、遠心分離をしてください。

※溶解後は冷蔵（2～8℃）で6か月保存可能

# キット以外に必要な器具・装置

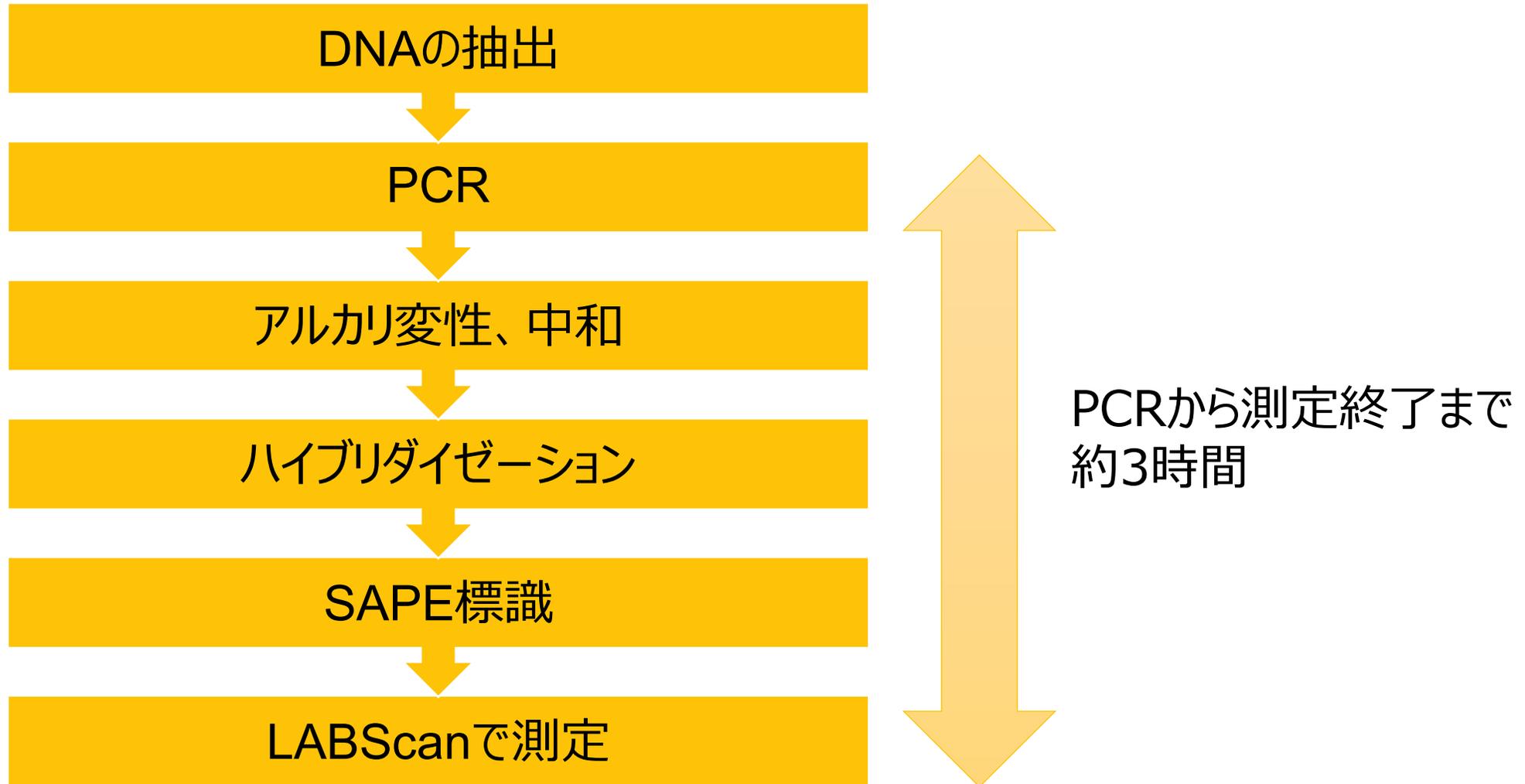
種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	Veriti 96-Well サーマルサイクラー VeritiProサーマルサイクラー	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
PCRパッド	マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	ベリタス (One Lambda) SSPPADTN
遠心機	プレート遠心機	96 wellプレートを1300 g以上で遠心ができる機器/ メーカー不問
測定機器	LABScanシステム/LABScan3Dシステム	ベリタス (One Lambda)





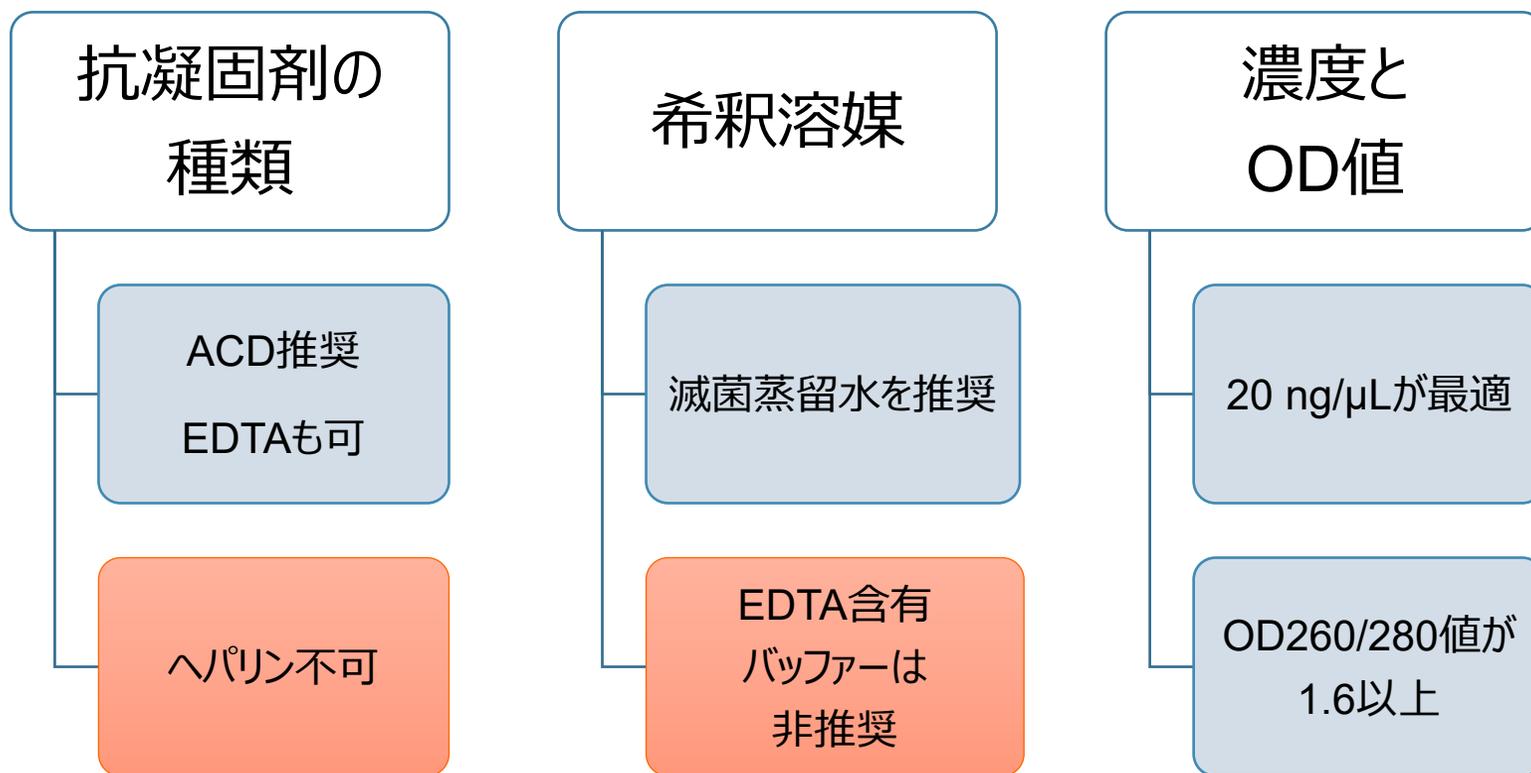
# LABType手技のポイント

# LABType測定の流れ



# 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  $\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{L}$
D-mix	13.8 $\mu\text{L}$
AmpliTaq	0.2 $\mu\text{L}$
合計	18.0 $\mu\text{L}$

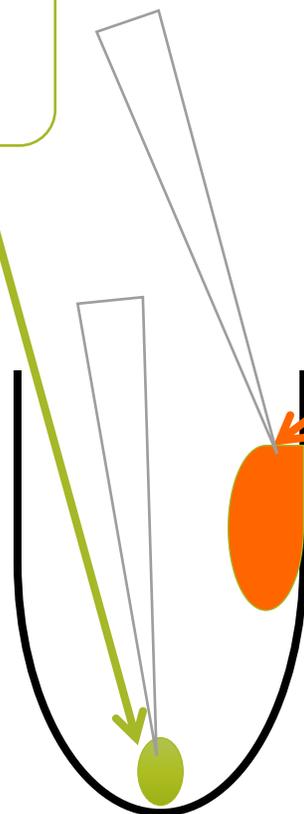
検体数が少ない場合→全ローカス分まとめて調製  
プライマーはDNAと同様にウェルに添加しておく

D-mix	13.8 $\mu\text{L}$
AmpliTaq	0.2 $\mu\text{L}$
合計	14.0 $\mu\text{L}$

# 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  $\mu\text{L}$ を  
ウェルの底部に分注



②プレミックス液 18  $\mu\text{L}$ を分注

- D-mix (13.8  $\mu\text{L}$ )
- Primer mix (4  $\mu\text{L}$ )
- AmpliTaq (0.2  $\mu\text{L}$ )

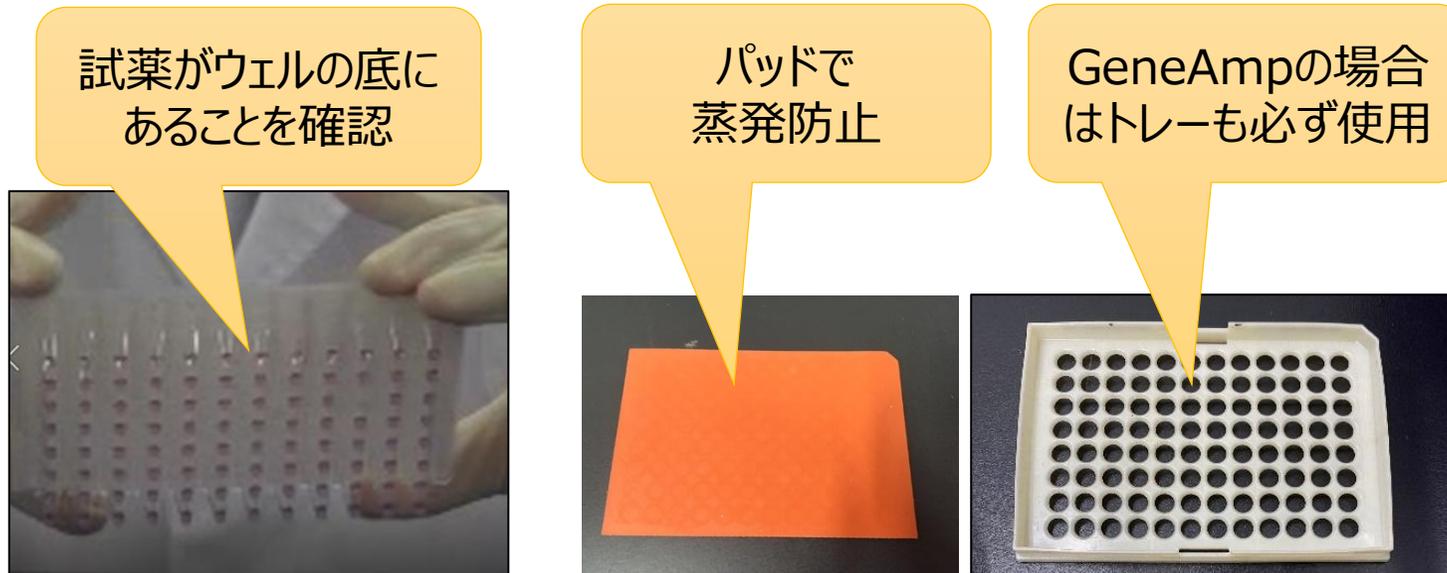
- プレミックス液は氷上で分注する
- ローカスと検体の対応およびコンタミネーションに注意する
- プレミックス液を分注した後はできるだけ速やかにサーマルサイクラーへ入れる

# 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
- 9600モード(Simulation Mode)を使用
- ホットスタートを推奨

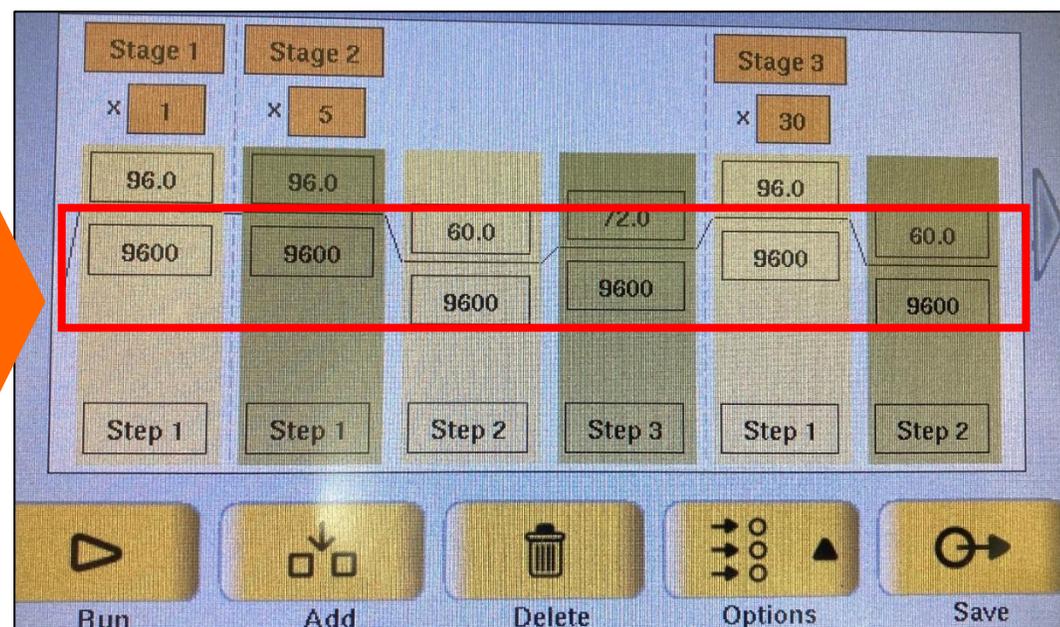
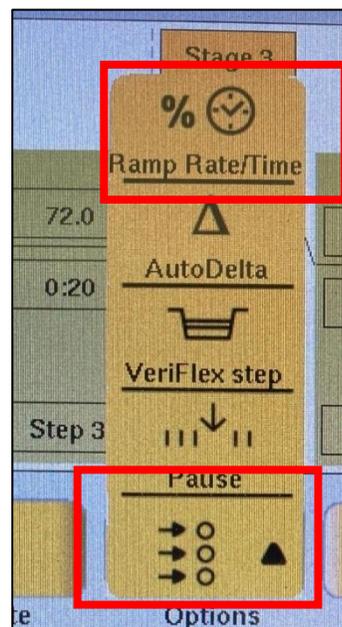
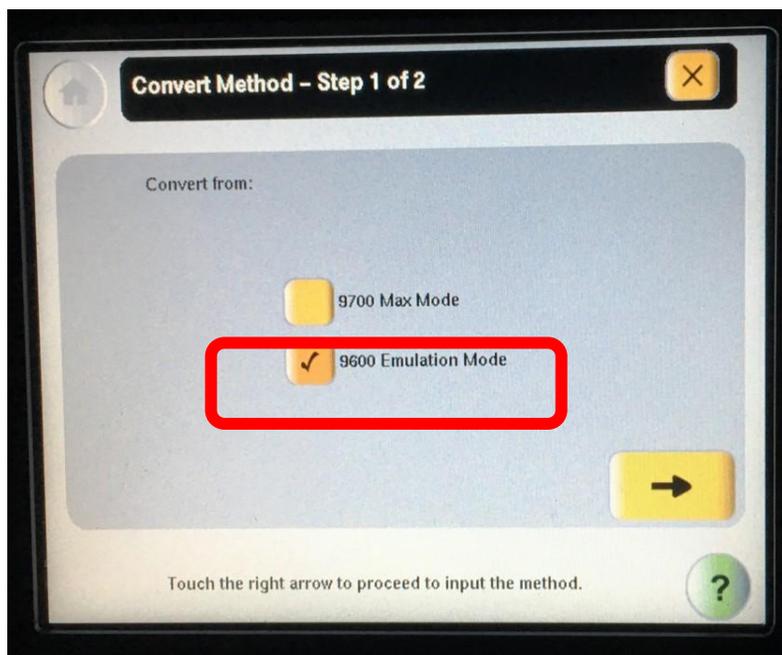
PCR条件 (Reaction volumeは20 uL)

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



# ※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



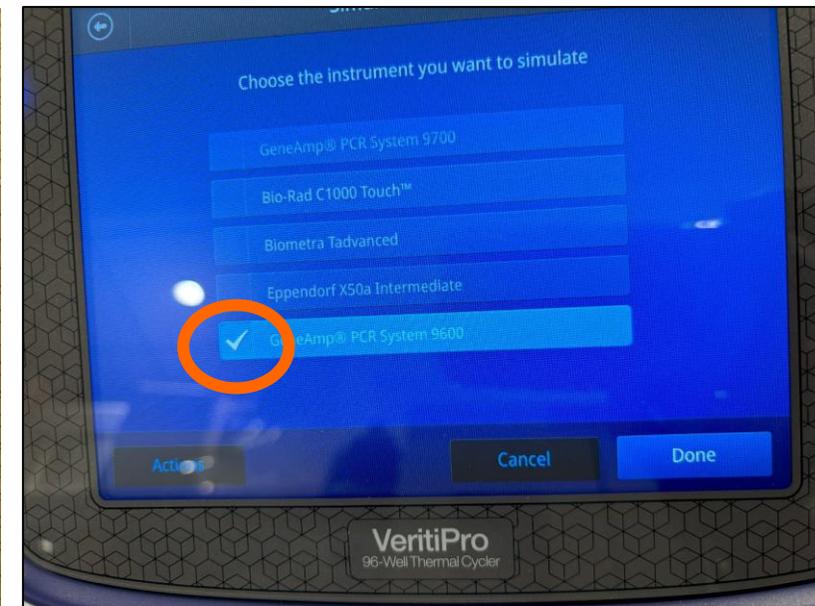
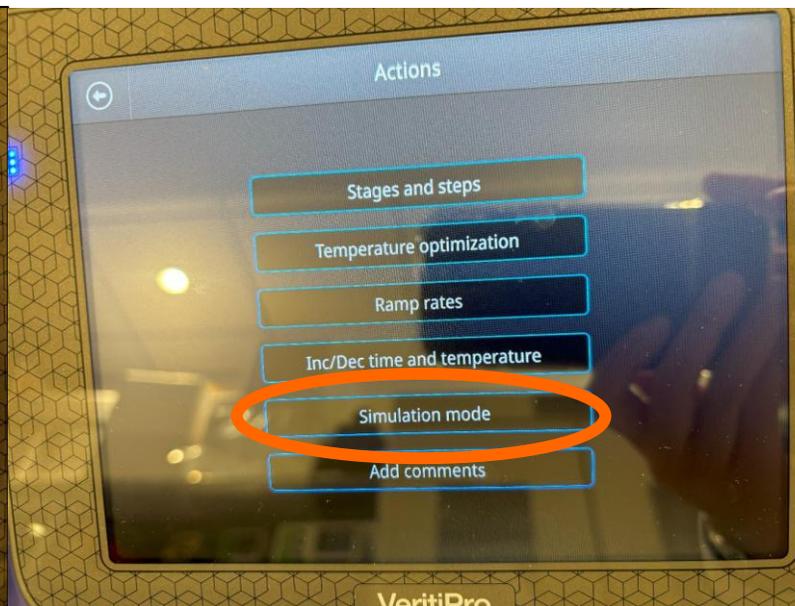
# ※9600モードの設定・確認方法（Veriti Pro）

- 設定方法

- Home画面のNew Method>Open template>Basic PCR>AmpliTag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

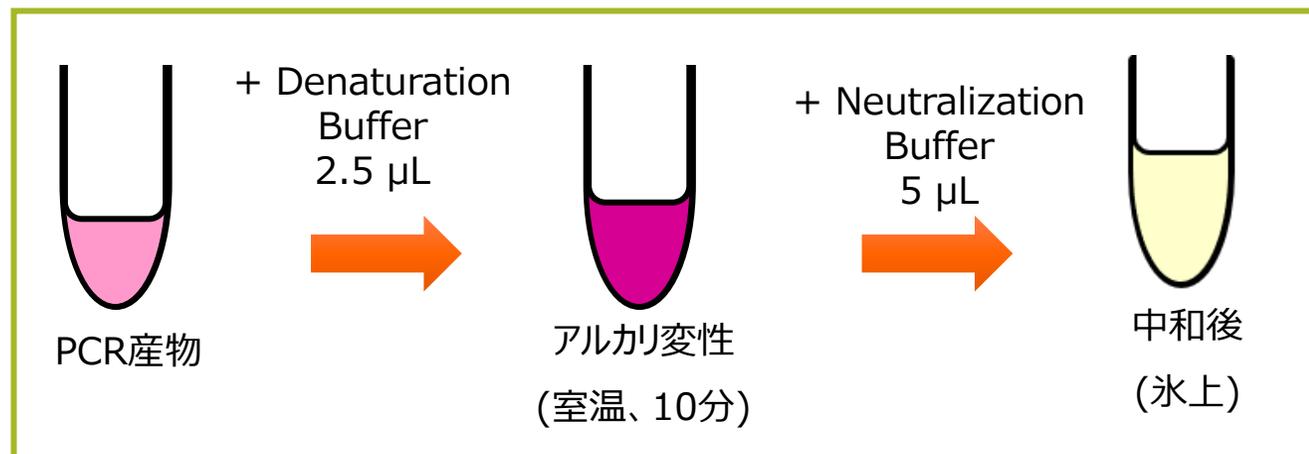
- Open Methodから使用するプログラムを選択
- 設定方法と同じ操作で「GeneAmp PCR System 9600」にチェックがあることを確認



# 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  $\mu$ Lを分注しスピンドウン
- PCR産物 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L
Hybridization Buffer	34.0 $\mu$ L
合計	38.0 $\mu$ 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  $\mu\text{L}$ 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、速やかに Wash Buffer 70  $\mu\text{L}$ を添加

# 洗浄操作（3回）

- Wash Buffer 70  $\mu$ 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  $\mu$ L添加し、遠心～ドライボルテックスを行う



<http://y2u.be/2p7Vq8BWiEI>

2回繰り返す

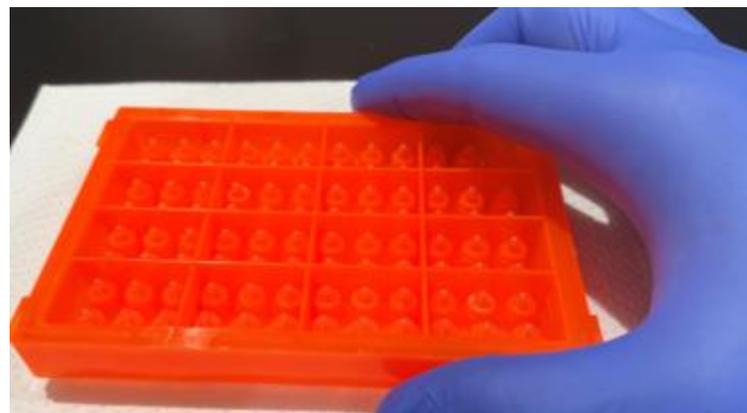
ドライボルテックス

フリッキング

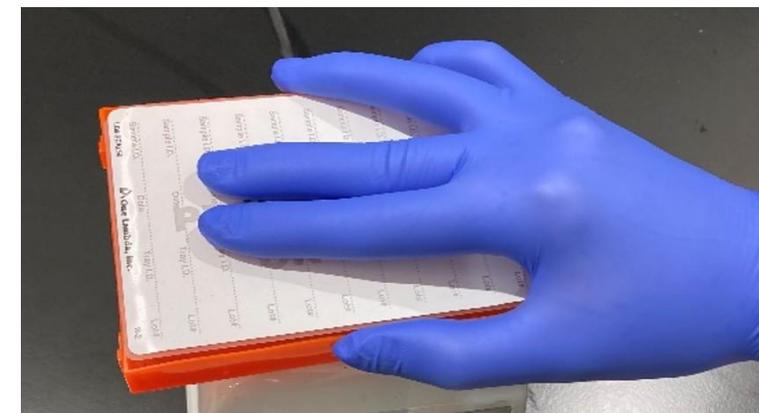
タッピング



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



数回キムタオルに押し付ける  
（強く叩きつけない）



ウェルの底のビーズが  
ほぐれているかを確認する

# SAPE標識 & 洗浄操作 (1回)

- 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 $\mu$ L
SAPE Buffer	49.5 $\mu$ L
合計	50.0 $\mu$ L

SAPE溶液の原液は事前に調製する

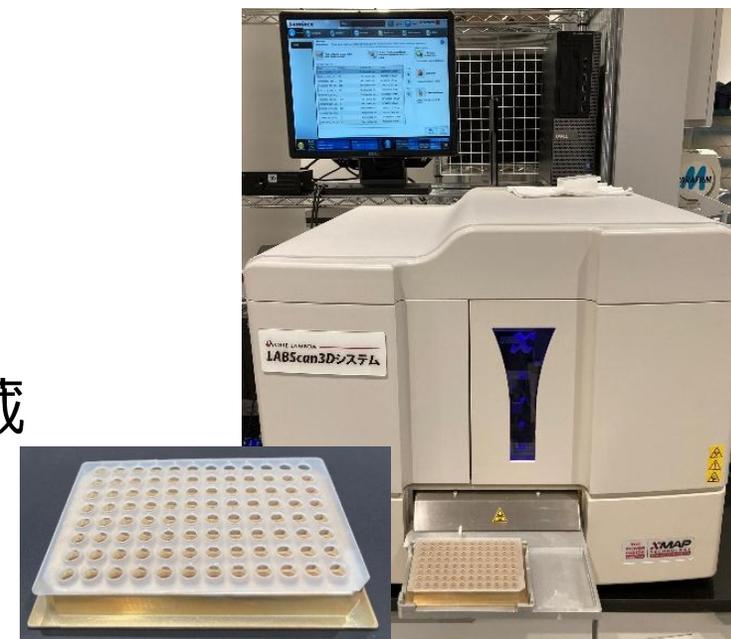
- 粉末の試薬を精製水で溶解
- 溶解後は冷蔵で6か月保存可能

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  $\mu$ 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（フリッキング、タッピング、ドライボルテックス）を1回実施

# LABScanでの測定

- Wash Bufferを70  $\mu$ 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](https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html)
- 必要なLABScanのメンテナンス
  - 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

