



今日から始めるHLA Vol.3 マイクロSSP入門

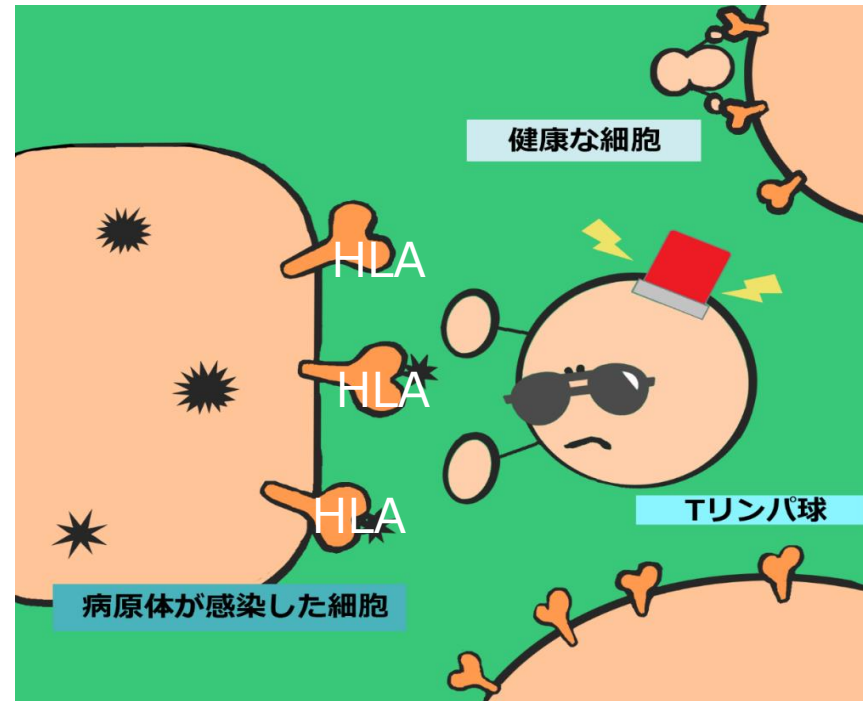
マイクロSSPの概要と手技

株式会社ベリタス

2023年12月6日

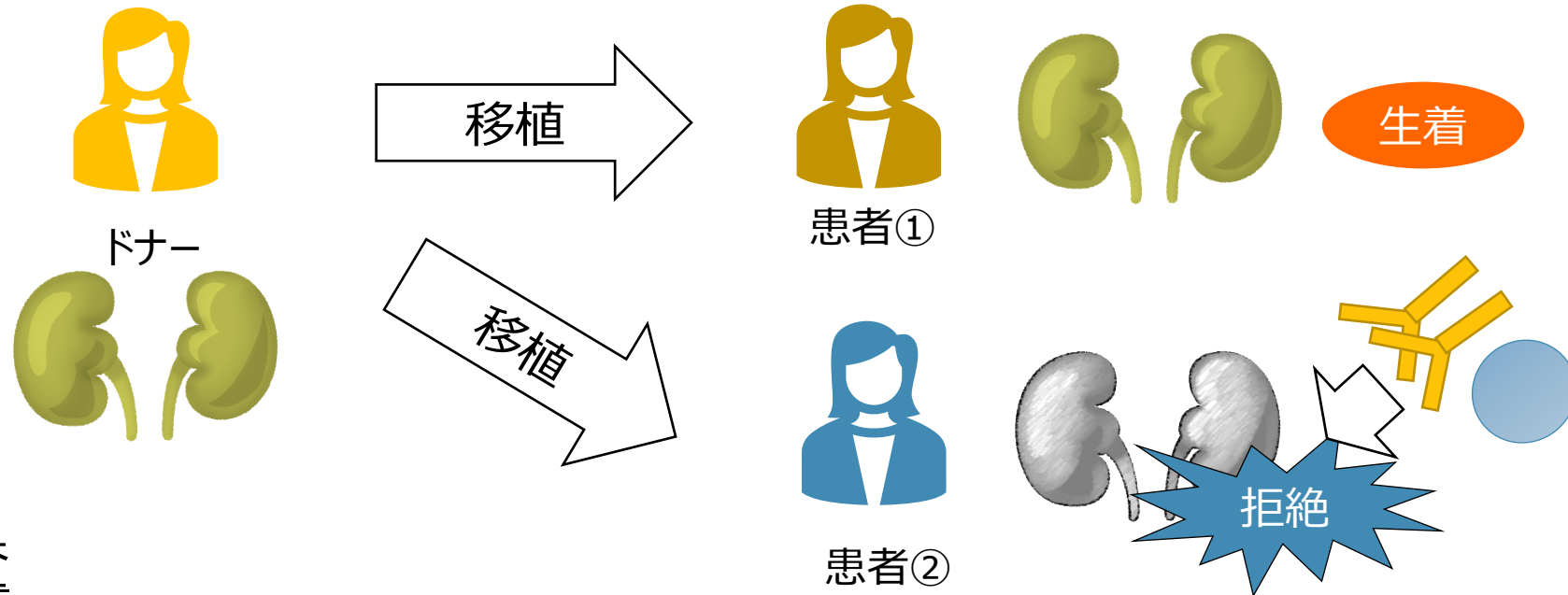
HLA（ヒト白血球抗原：Human Leukocyte Antigen）とは

- ヒトにおける主要組織適合遺伝子複合体（MHC）として1952年頃に発見
- 細胞表面に発現
- 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
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成



移植におけるHLAの重要性

移植した臓器の生着・廃絶（graft loss）や造血幹細胞の生着や拒絶（移植片対宿主病：GVHD）と関連



移植前の検査

- ドナーと患者のHLA抗原検査
- 患者がドナーのHLA抗原に対する抗体（DSA）を持っているかを確認（抗HLA抗体検査）

移植後の検査

- 患者がDSAを産生していないことを定期的に確認（抗HLA抗体検査）

HLA抗原

- 血清学的検査 + 細胞性免疫学的検査により細分化
- 国際組織適合性ワークショップにて認定され、WHO命名委員会で命名

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	
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				

ブロード抗原

スプリット抗原

アソシエート抗原

Class I 抗原

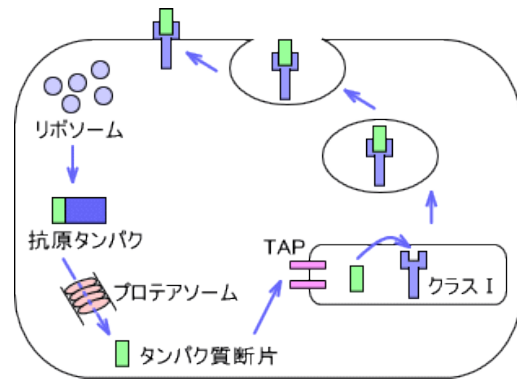
Class II 抗原

http://hla.alleles.org/antigens/recognised_serology.html 一部改変

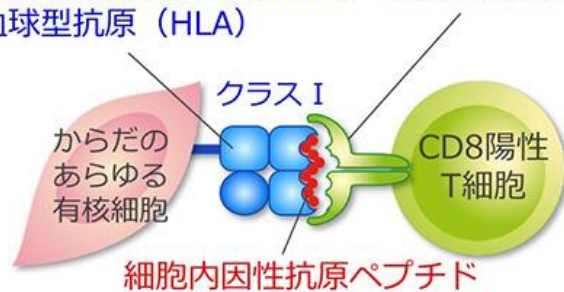
Class IとClass IIのちがい

Class I (A、B、C)

- ほとんどの有核細胞に発現
- 内在性のペプチド（正常細胞、感染・腫瘍細胞などに由来）を結合
- CD8+細胞（キラーT細胞）に抗原提示

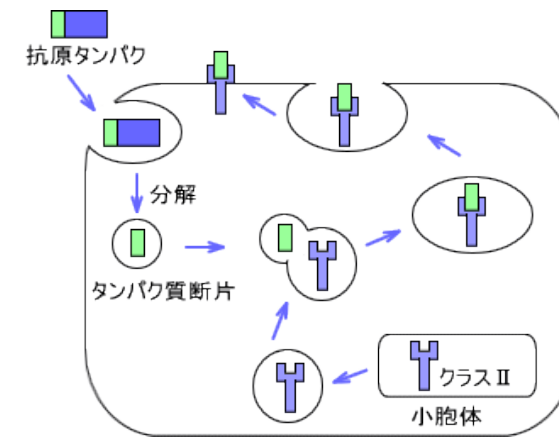


主要組織適合抗原複合体 (MHC) T細胞受容体 (TCR)
ヒト白血球型抗原 (HLA)

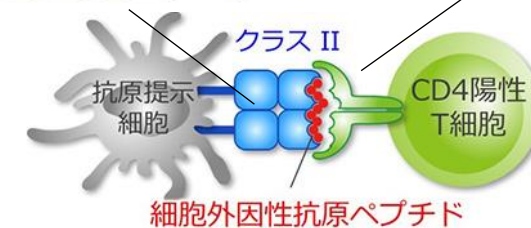


Class II (DR、DQ、DP)

- 抗原提示細胞に発現
- 外来性のペプチド（ウイルスや細菌などに由来）を結合
- CD4+細胞（ヘルパーT細胞）に抗原提示



主要組織適合抗原複合体 (MHC) T細胞受容体 (TCR)
ヒト白血球型抗原 (HLA)



<http://www.tokyo-med.ac.jp/neoself/about/outline.html>
<http://kusuri-jouhou.com/immunity/hijiko.html>

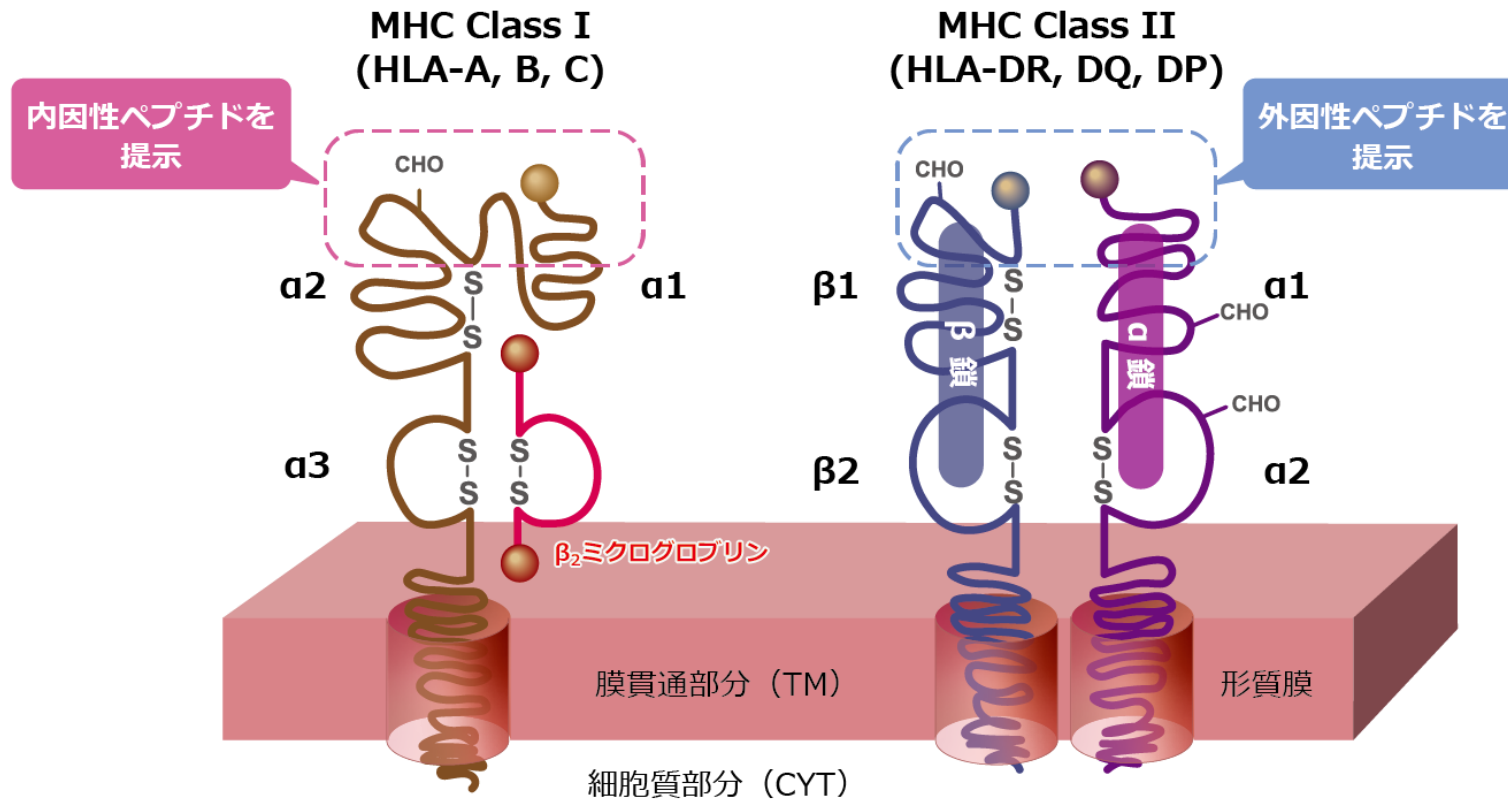
HLAの分子構造

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

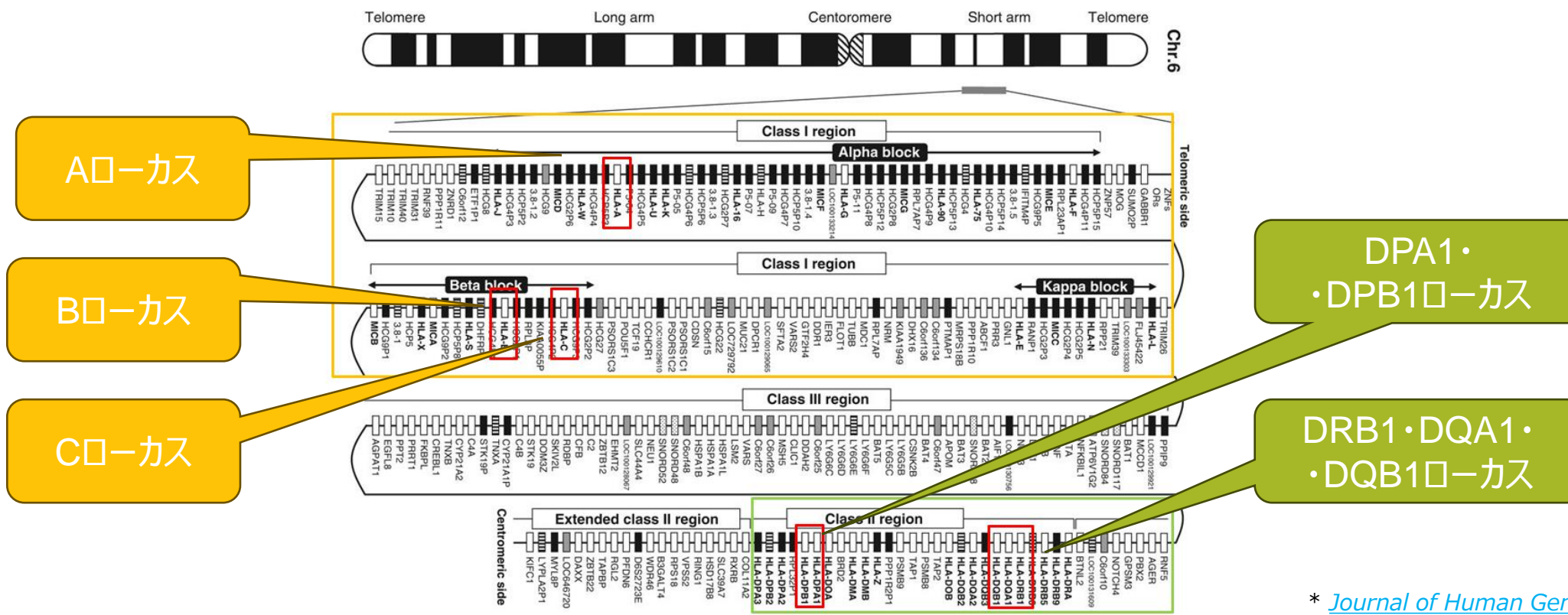
Class II (DR、DQ、DP)

- α 鎖と β 鎖が会合
- α 1、 β 1領域でペプチドを提示



HLA遺伝子領域とクラス、ローカス

- 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
- 各抗原をコードする遺伝子 = 座位 (ローカス)
 - Class IIはα鎖とβ鎖それぞれ対応した遺伝子が存在



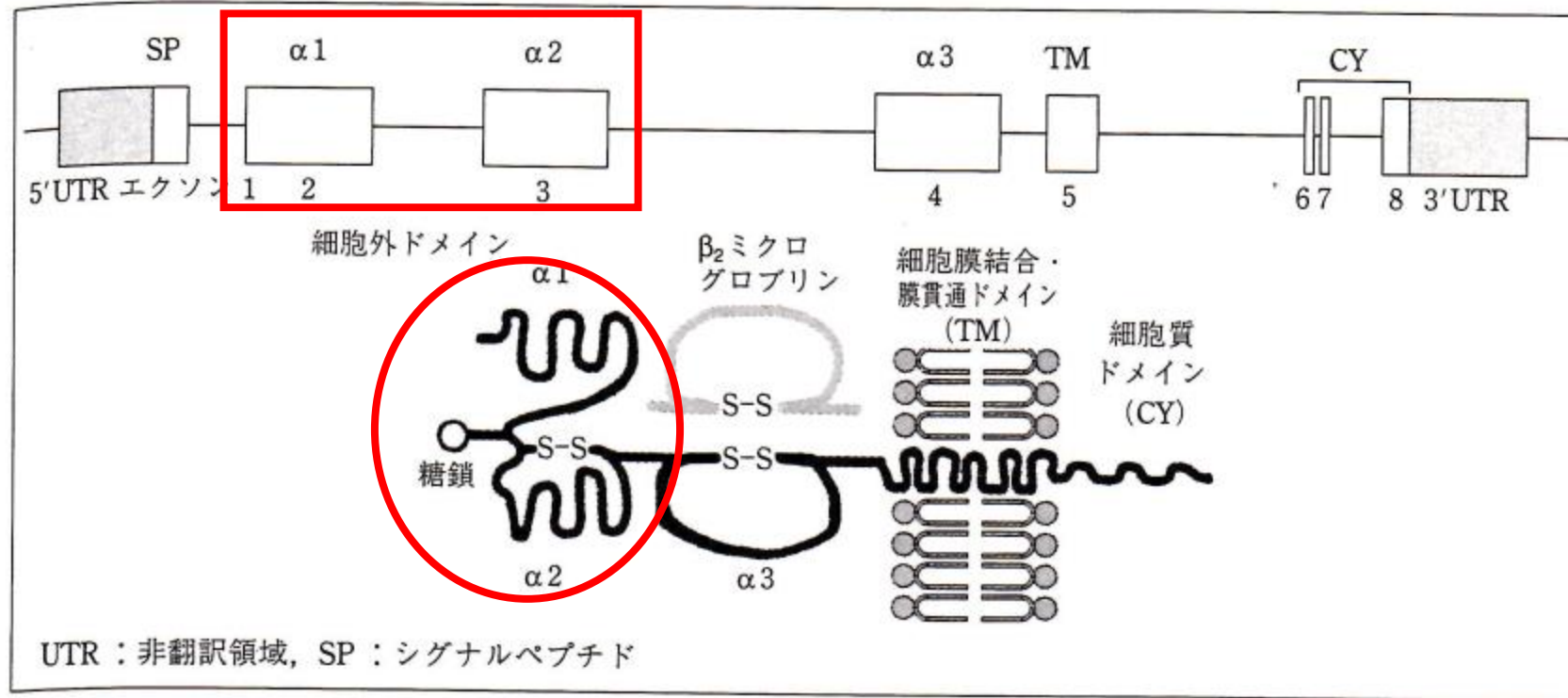
DPA1・DPB1ローカス

DRB1・DQA1・DQB1ローカス

* *Journal of Human Genetics* volume 54, pages15-39(2009)

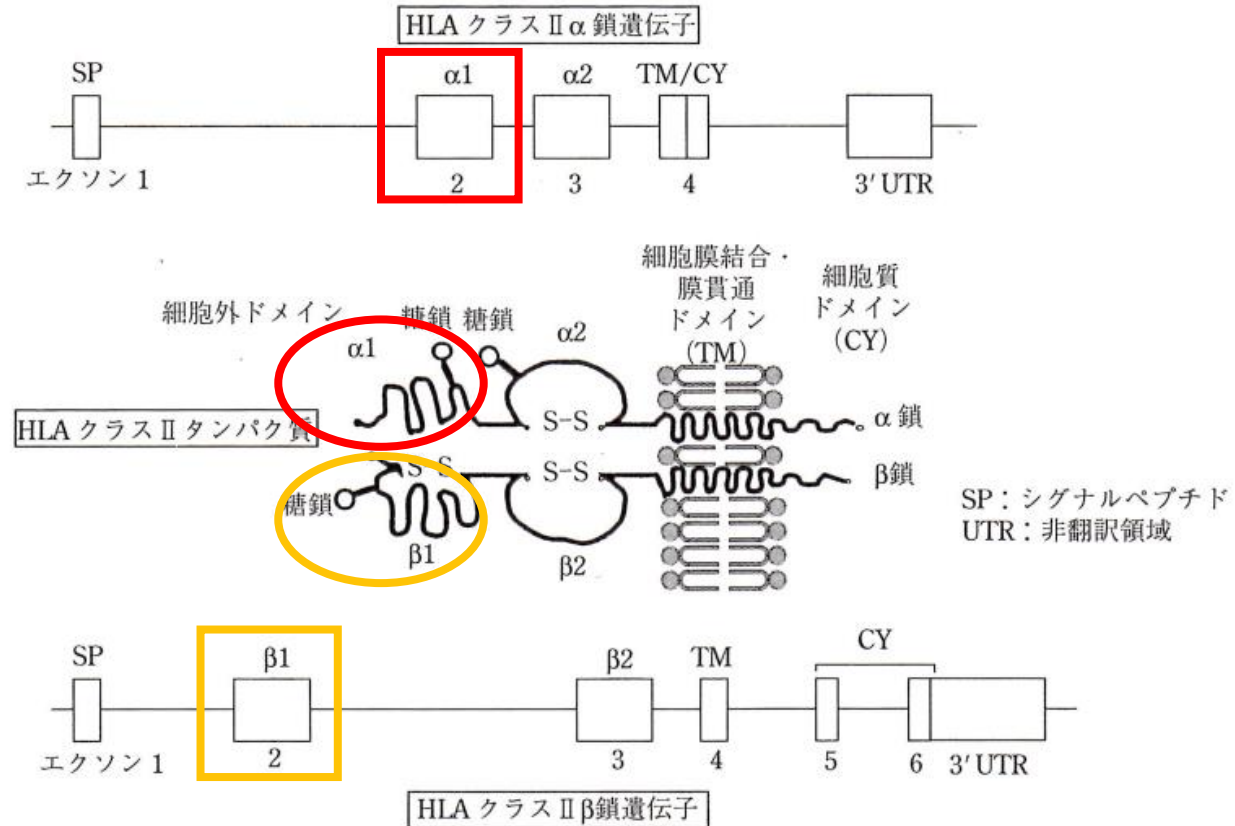
タイピング領域 (Class I)

- 抗原提示領域は $\alpha 1 \cdot \alpha 2$ 領域
- $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 領域をコードする **Exon2と3**の遺伝子配列が主に解析されている



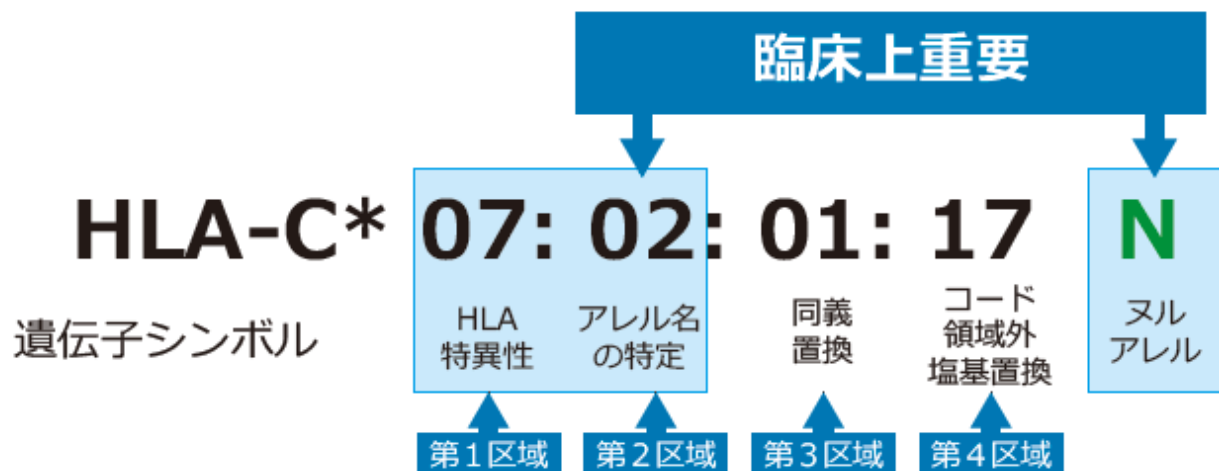
タイピング領域 (Class II)

- 抗原提示領域は α 鎖の $\alpha 1$ 領域 + β 鎖の $\beta 1$ 領域
- $\alpha 1 \cdot \beta 1$ 領域をコードする α 鎖のExon2、 β 鎖のExon2の遺伝子配列が主に解析されている
- とくに β 鎖に多型が多い



移植・輸血検査学 第1刷 (2004) より転載

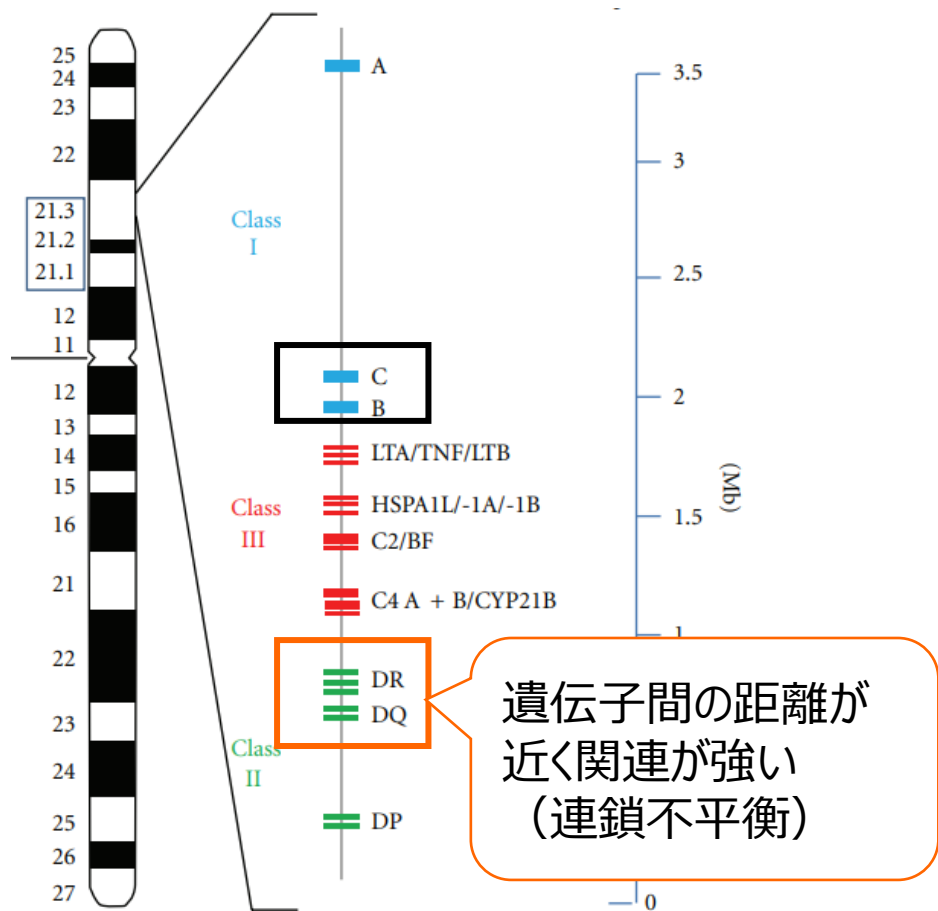
HLAアレルの表記方法



- N : 発現していない
- L : 通常と比べ発現量が低い
- Q : 発現量が通常と異なる可能性（明確なデータは無い）
- S : 可溶性分子として発現するが細胞表面上に無い
- C : 細胞質に存在するが細胞表面上に無い
- A : まったく発現していないかどうか疑わしい

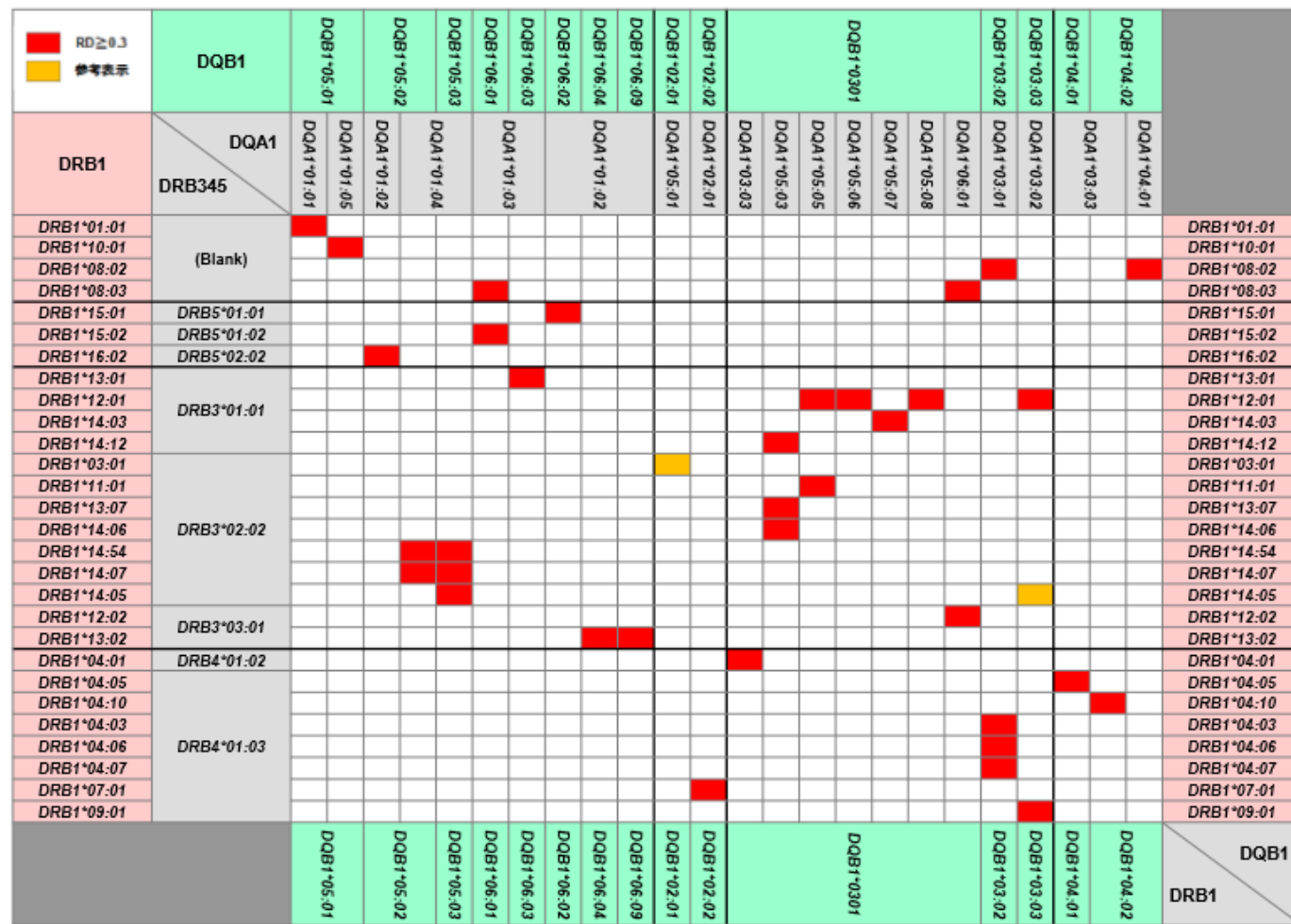
区域	桁数	名称	表記例	桁内での違い
第1区域	2桁	抗原型、血清型、HLA型	HLA-A*24	
第2区域	4桁	アレル型	HLA-A*24:02 HLA-C*03:23N	遺伝子配列およびアミノ酸配列が異なる
第3区域	6桁		HLA-A*24:02:01	遺伝子配列は異なるがアミノ酸配列は同一
第4区域	8桁		HLA-A*24:02:01:01 HLA-C*07:02:01:17N	分子をコードするエクソン外での塩基置換

連鎖 (DR-DQ、B-C)



Relle and Schwarting, 2012

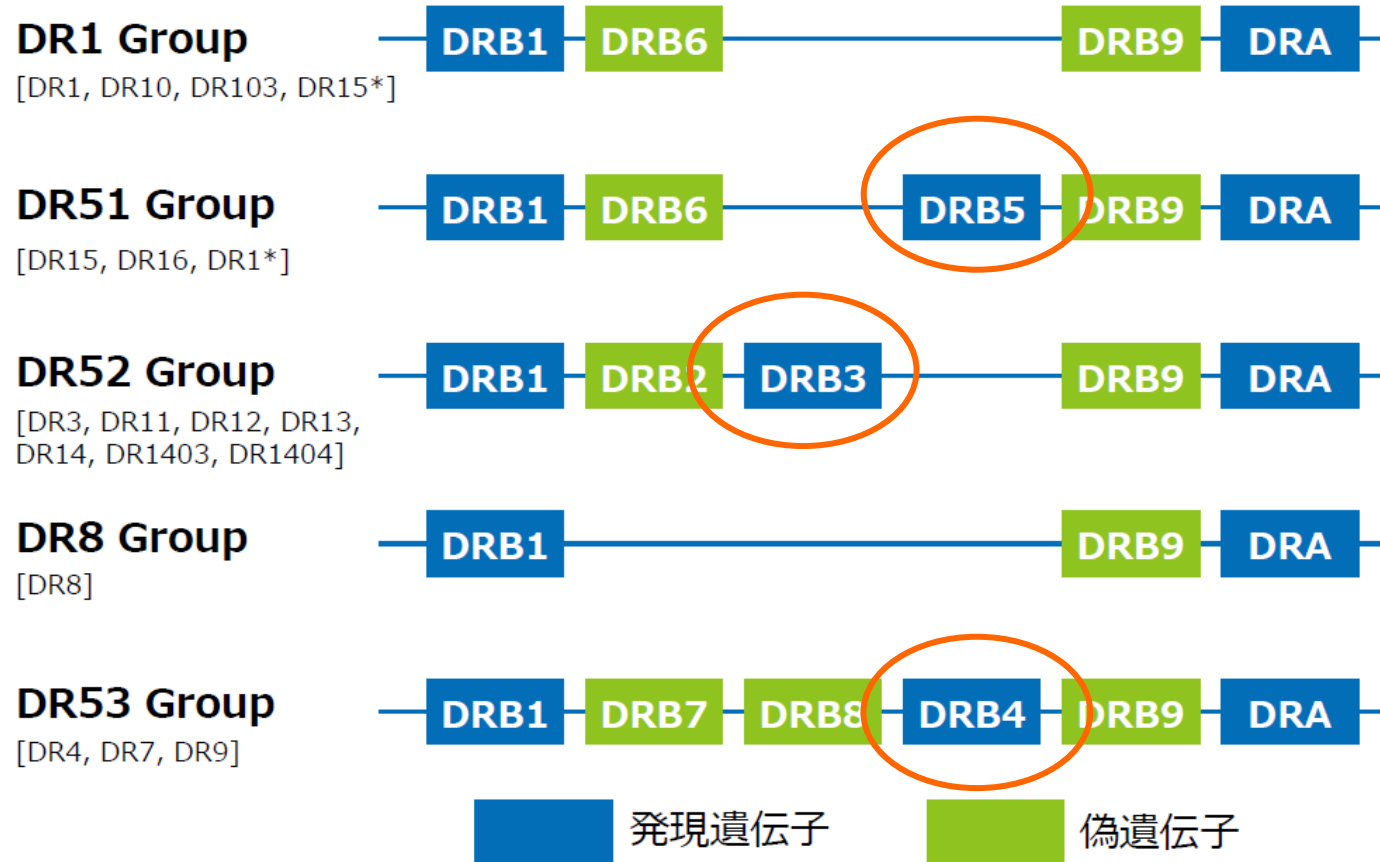
日本人高頻度アレルにおけるDR-DQの連鎖



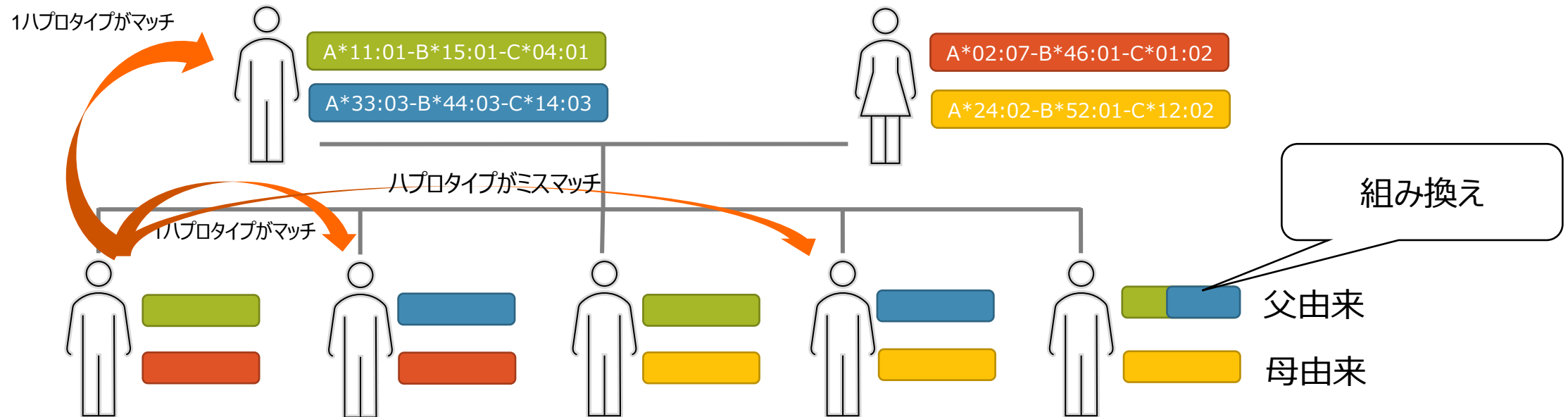
(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

DRB1とDRB345の連鎖

- 抗原型によりDRB3/4/5遺伝子の有無が異なる



- 同一染色体にあるHLA遺伝子（アレル）の組み合わせ
- 基本的にハプロタイプは維持されたまま親から子に遺伝する
 - 親子間ではどちらかのハプロタイプが一致
 - 兄弟間で完全一致する確率は25%
 - まれに組み換えが起こる



参考：日本人のハプロタイプの頻度

- アレルと同様に日本人に頻度が高いハプロタイプが存在

順位	ハプロタイプ	頻度 (%)
1	A*24:02-B*52:01-C*12:02-DRB1*15:02	8.167
2	A*33:03-B*44:03-C*14:03-DRB1*13:02	4.513
3	A*24:02-B*07:02-C*07:02-DRB1*01:01	3.599
4	A*24:02-B*54:01-C*01:02-DRB1*04:05	2.518
5	A*02:07-B*46:01-C*01:02-DRB1*08:03	1.739
6	A*11:01-B*15:01-C*04:01-DRB1*04:06	1.351
7	A*24:02-B*59:01-C*01:02-DRB1*04:05	1.221
8	A*11:01-B*54:01-C*01:02-DRB1*04:05	0.913
9	A*26:01-B*40:02-C*03:04-DRB1*09:01	0.835
10	A*24:02-B*40:06-C*08:01-DRB1*09:01	0.719
11	A*02:06-B*35:01-C*03:03-DRB1*15:01	0.597
12	A*31:01-B*51:01-C*14:02-DRB1*08:02	0.560
13	A*24:02-B*51:01-C*14:02-DRB1*09:01	0.548
14	A*02:06-B*40:06-C*08:01-DRB1*09:01	0.541
15	A*24:02-B*46:01-C*01:02-DRB1*08:03	0.526

造血幹細胞移植情報サービス 骨髄バンク集計 (https://www.bs.jrc.or.jp/bmdc/donorregistrant/m2_03_00_statistics.html)

参考：アレル頻度、ハプロタイプの確認方法（国内）

- 日本組織適合性学会 推定アレル頻度表
（毎年更新）※アレル頻度のみ

https://drive.google.com/file/d/1-Icntg_CbARn72pfZpt4MXJpnK4bMzPw/view

- HLA研究所様ホームページ

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

- 造血幹細胞移植情報サービス
骨髄バンク統計資料

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

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="button" value="チェック"/>		<input type="button" value="クリア"/>					

ドナー登録者のHLA型遺伝子頻度

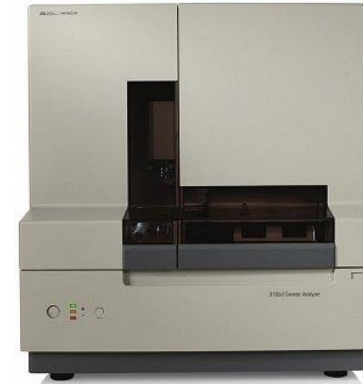
- HLA-A [Excel : 28KB]
- HLA-B [Excel : 31KB]
- HLA-C [Excel : 26KB]
- HLA-DRB1 [Excel : 27KB]

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]
- 都道府県別（上位50タイプ）

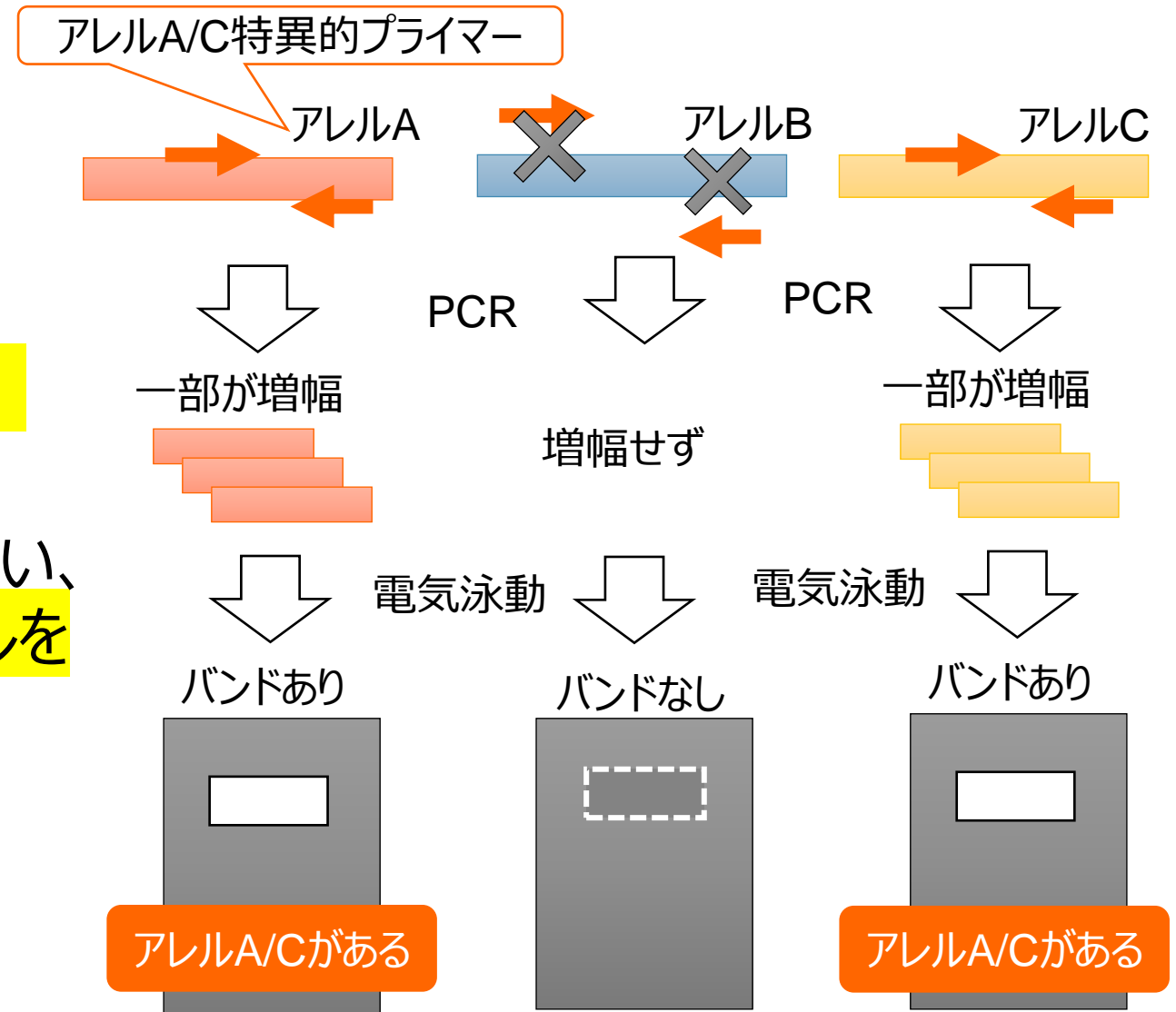
SSP法の原理と 検査手法

HLAタイピング検査法



SSP (Sequence Specific Primers) 法とは

- 特定配列にのみ結合するプライマーを用いPCR増幅
- PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動する
- バンドがある = 特定配列 (アレル) があると判定
- 多数のプライマーを使ってPCRを行い、複数ウェルの増幅パターンからアレルを同定
 - 右図でアレルAとCを区別するにはさらに別のプライマーでPCR増幅
 - 例：A/B特異的プライマー



Genericトレイ (2桁レベル)

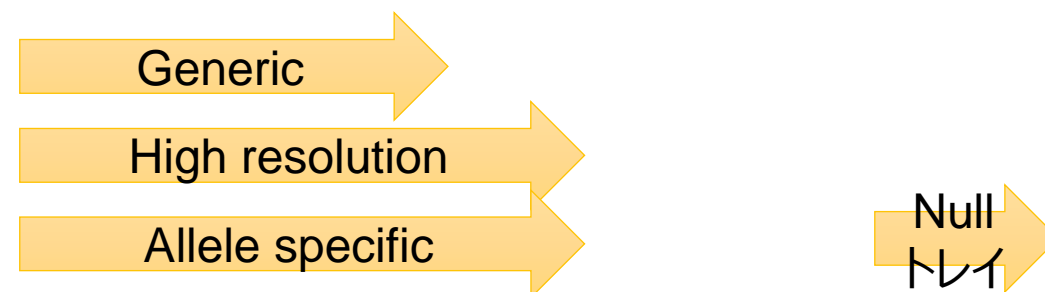
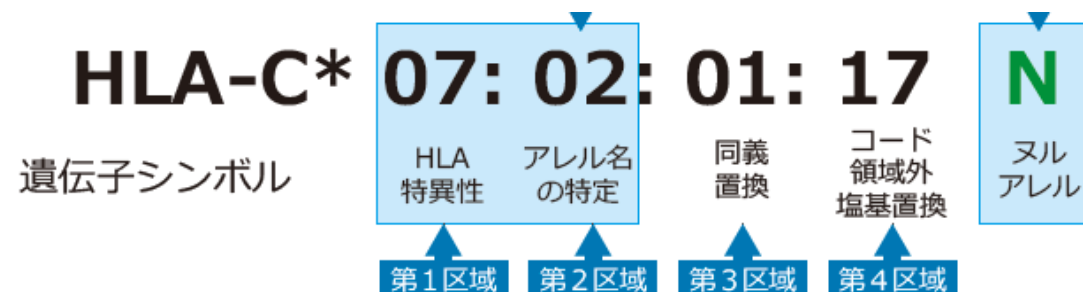
- ABC/DRDQ JPN (MSSP JPN)
- AB/DR Kit
- HLA A Typing Kit
- Class I Generic Typing Kit など

High resolutionトレイ (4桁レベル)

- Class II High Res. DRB Typing Kit など

Allele specificトレイ (4桁レベル)

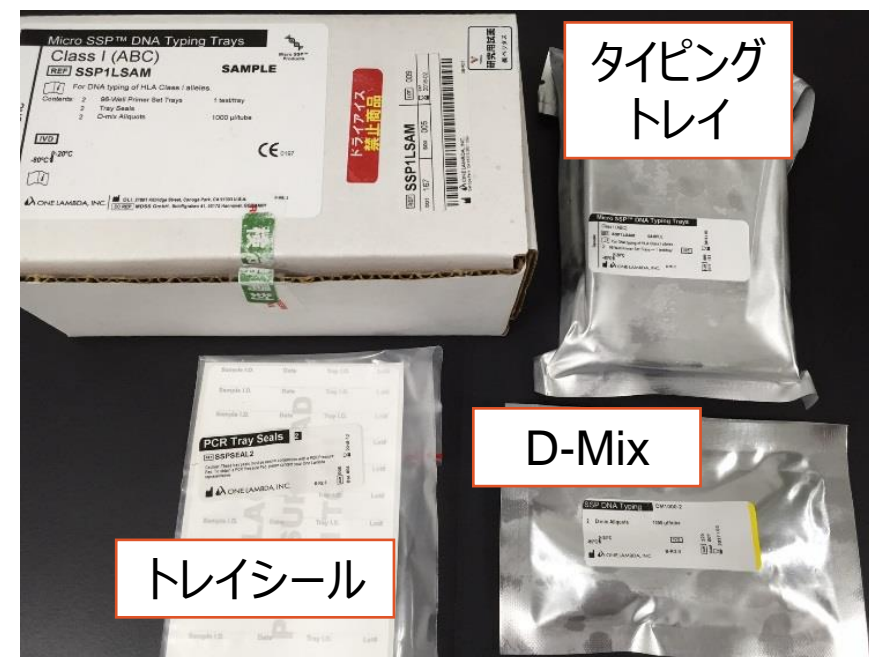
- Allele Specific A*24
- Allele Specific DRB1*01
- Null Allele Class I など



マイクロSSPのキット構成

キット構成は全て同じ

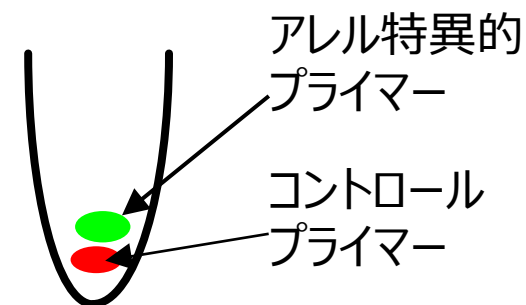
- D-Mix溶液
- タイピングトレイ
- トレイシール



タイピングトレイについて

各ウェルに凍結乾燥した**2種類**のプライマーが含まれる

- 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
特定の配列を増幅（同じ配列をもつアレルは全て増幅）



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	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
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase AmpliTaq Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8080160
電気泳動装置	マイクロSSP用泳動槽	ベリタス (One Lambda) OLI-MGS108
	パワーサプライ (150V用)	メーカー不問
ゲル作成機器	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 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

マイクロSSPの操作ステップ

DNAの抽出

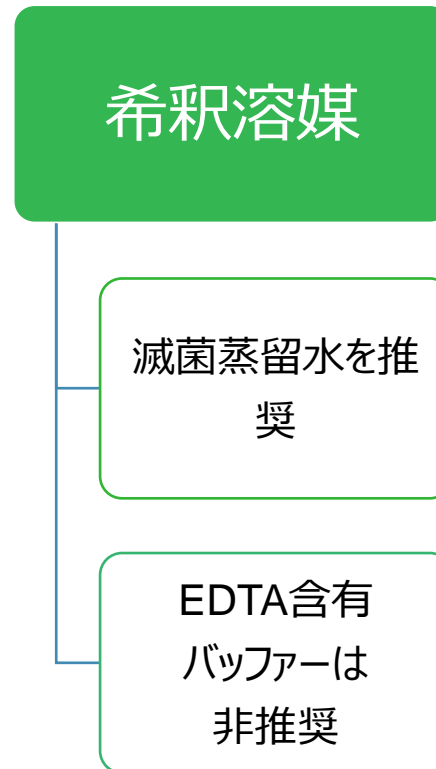
DNAとD-Mix、ポリメラーゼの混合

トレイへの添加

PCR

アガロースゲル電気泳動、撮影

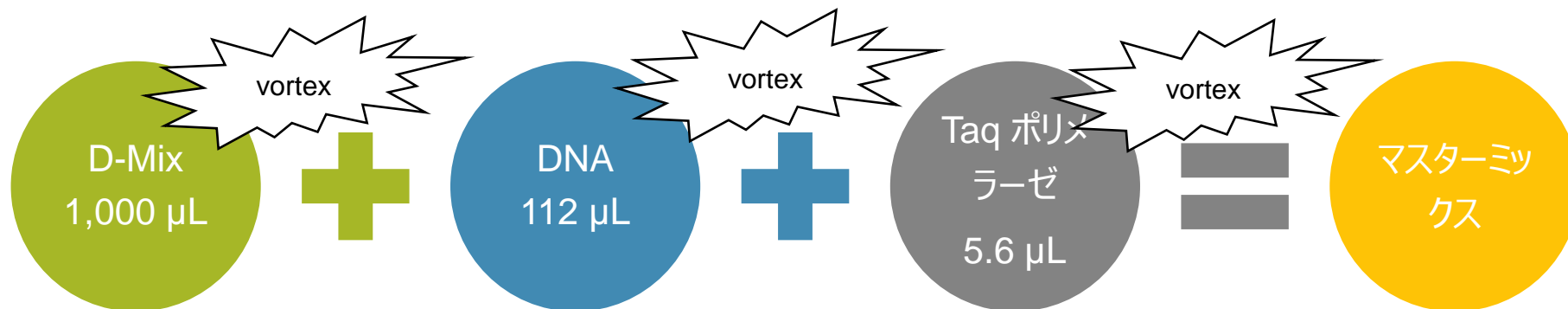
PCRに適した品質、濃度のDNAを抽出
PCRを阻害する成分の混入を避ける



JPNの場合：
75-150 ng/ μ L
JPN以外の場合：
25-200 ng/ μ L

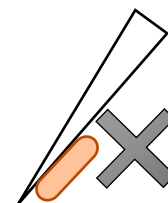
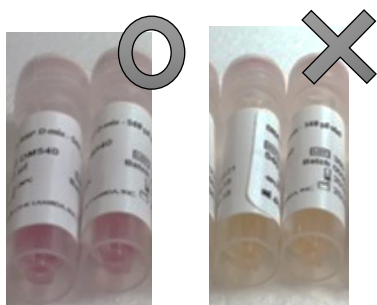
DNAとD-Mix、ポリメラーゼの混合 (MSSP JPN)

D-Mixの状態を確認
ポリメラーゼは正確な量を取る



- 室温に戻してから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

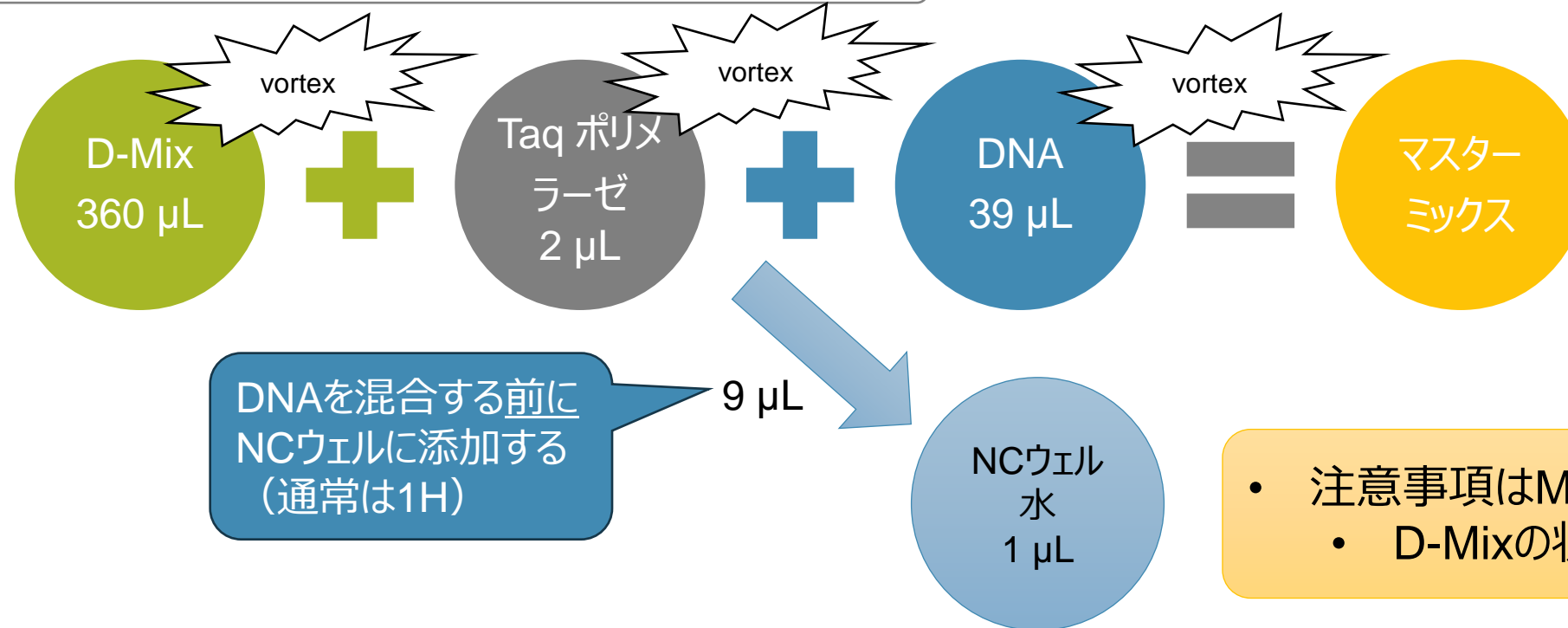


DNAとD-Mix、ポリメラーゼの混合（MSSP JPN以外）

- 混合レシピはトレイごとに異なります
 - One Lambda資料を参照ください
(Reference Table)

Negative Control	SSPT1-H1	8			
Generic Trays					
A Locus	SSP1A*	12	360	39	2
A, B Locus	SSP1AB*	10	1000	111	5.6
A,B,C Locus	SSP1L*	10	1000	111	5.6
A,B,DR	SSPABDR*	10	1000	111	5.6
DRB/DQB	SSP2L*	30	360	39	2

例：Class II Generic Typing SSP2L（32ウェル分）



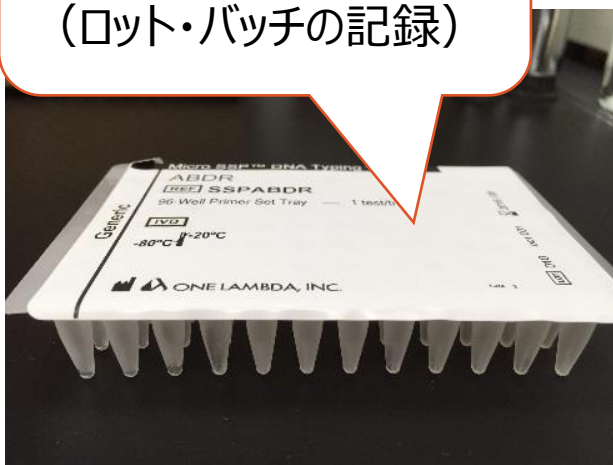
- 注意事項はMSSP JPNと同一
 - D-Mixの状態、Taqの取扱い

トレイへの検体の添加

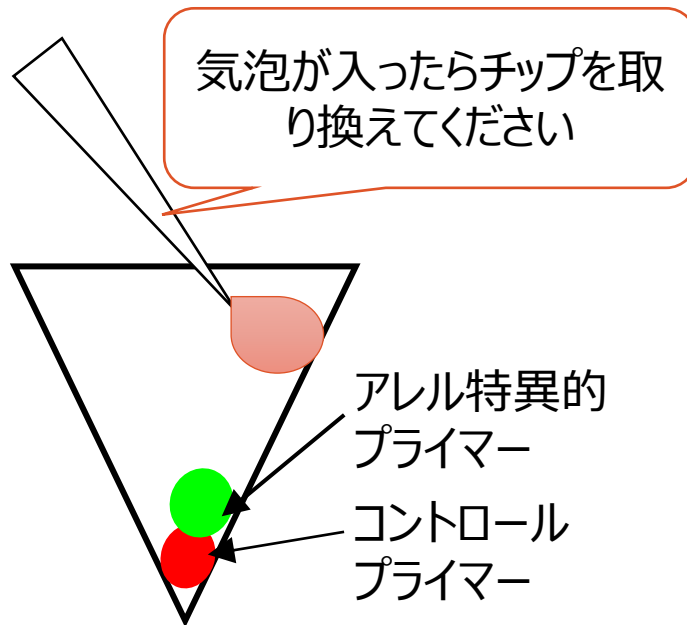
ウェルへの添加は壁面上部から
シールをしっかりと貼る

- トレイを室温に戻し、マスターミックスを各ウェルに10 uLずつ添加
- トレイ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
(ロット・バッチの記録)



気泡が入ったらチップを取り
換えてください

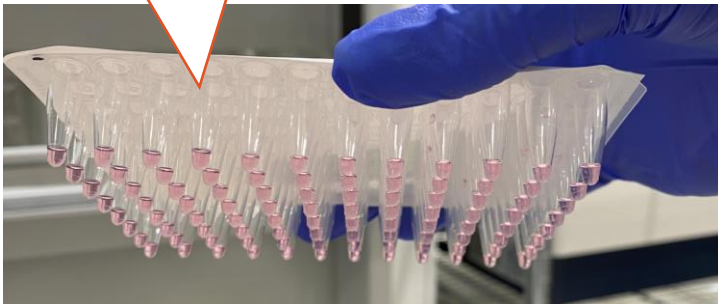


蒸発しないよう
しっかりシール

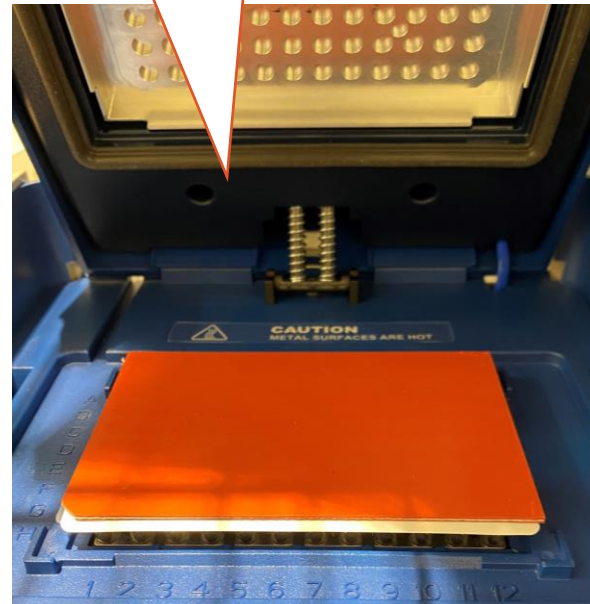


パッド・プラスチックトレイでしっかり固定
9600モードで増幅（約85分）

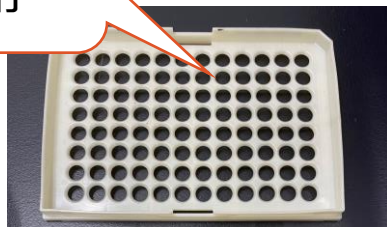
試薬がウェル底にあることを確認



パッドで
蒸発防止



GeneAmpは
トレイも併用



PCR条件（Reaction volumeは10 uL）

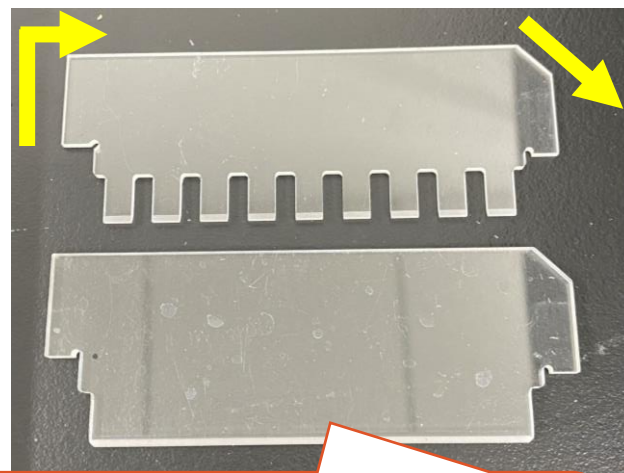
温度	時間	サイクル数
96°C	130 sec	1 cycle
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	9 cycles
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	20 cycles
59°C	50 sec	
72°C	30 sec	
4°C		∞

ゲルボックス、1 x TBEの準備

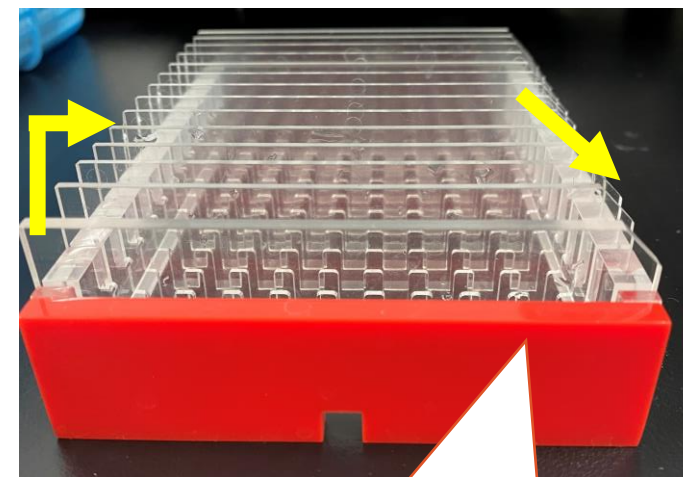
- ゲルボックスをベースにはめ、ねじで固定
- 水準器でベースが水平であることを確認
- コームをコームホルダーにセット
- 1 x TBEを約60 mL作成



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

ゲルは用事調製
アガロースは結晶が溶けるまでしっかり加熱

- Seakem LEアガロース 0.75 g + 1 x TBE 35 mLを入れ加熱
- 10 mg/mL エチジウムブロマイド 2 μ Lを添加
- ゲルをボックスに注ぎコームを挿し15分放置
 - コームの向きに注意
- ゲルが固まった後1 x TBEを少量注ぎコームを外す
- 1 x TBE 10~15 mLを注ぐ

TBEは
ゲル上部を
覆うように

泡立えないよう
にゆっくり



PCR増幅産物の添加

8連ピペットでスムーズに手早く添加 入れる位置と量をチェック

- PCR増幅産物およびサイズマーカーを10 uLずつ添加
- チップは余剰の1 x TBEで洗浄して使用
- 時間をかけずに手早く行う

サイズマーカー
(全てのウェルに入れなくてもよい)



トレーの向きを合わせて位置を間違えないように



奥まで入れると
ゲルに穴が開くことがあるので注意



泳動は規定条件と時間で（150V、3分）

蓋の向きは
手前が赤

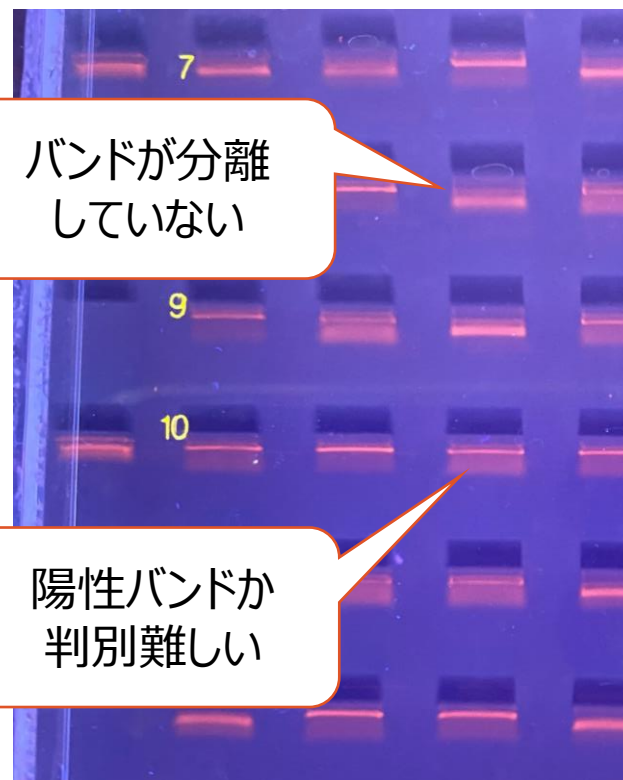
+と-のプラグを
間違えない



泳動時間が短い場合

バンドが分離
していない

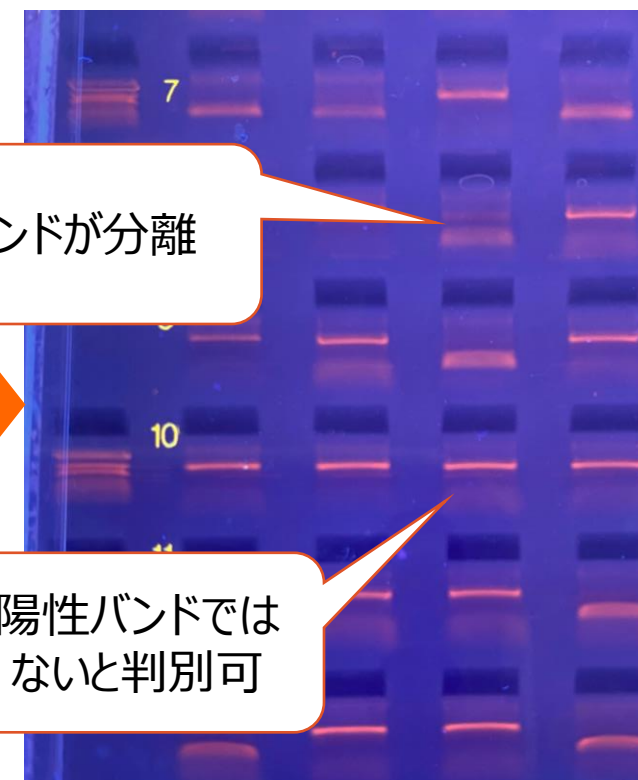
陽性バンドが
判別難しい



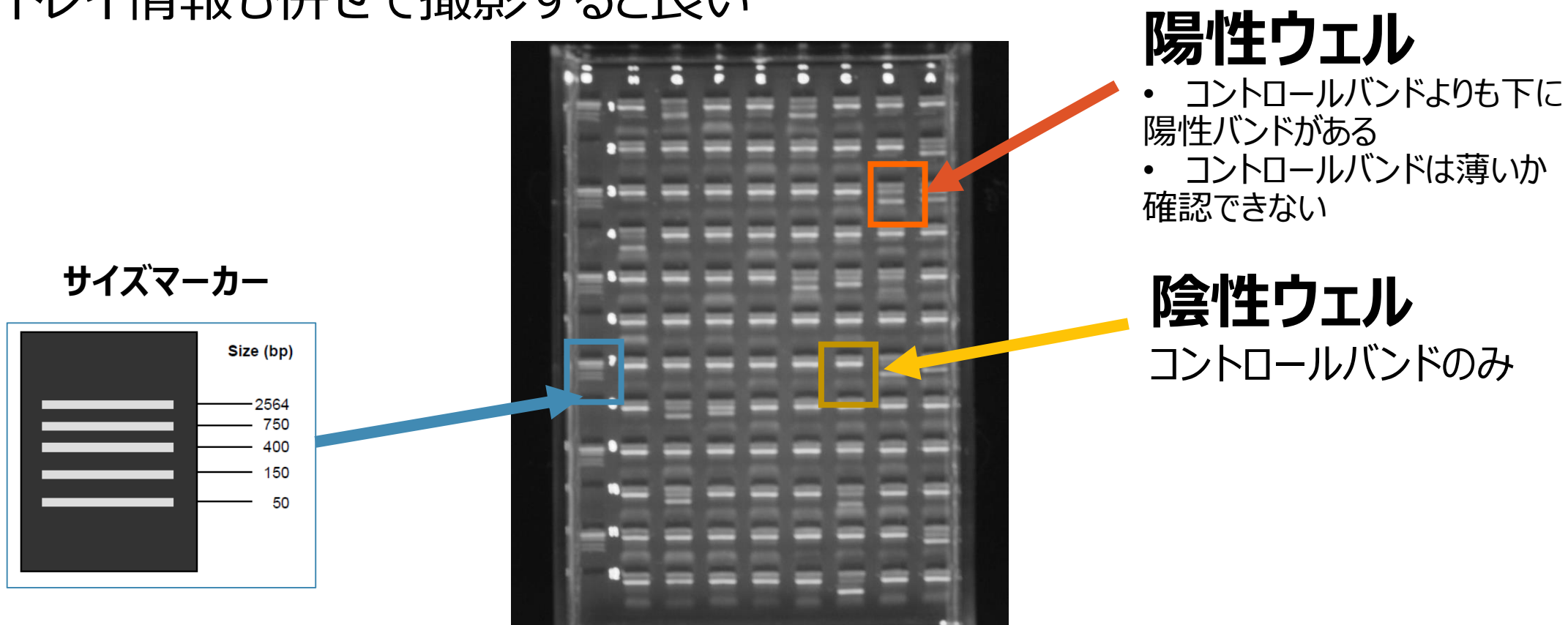
泳動時間が適切な場合

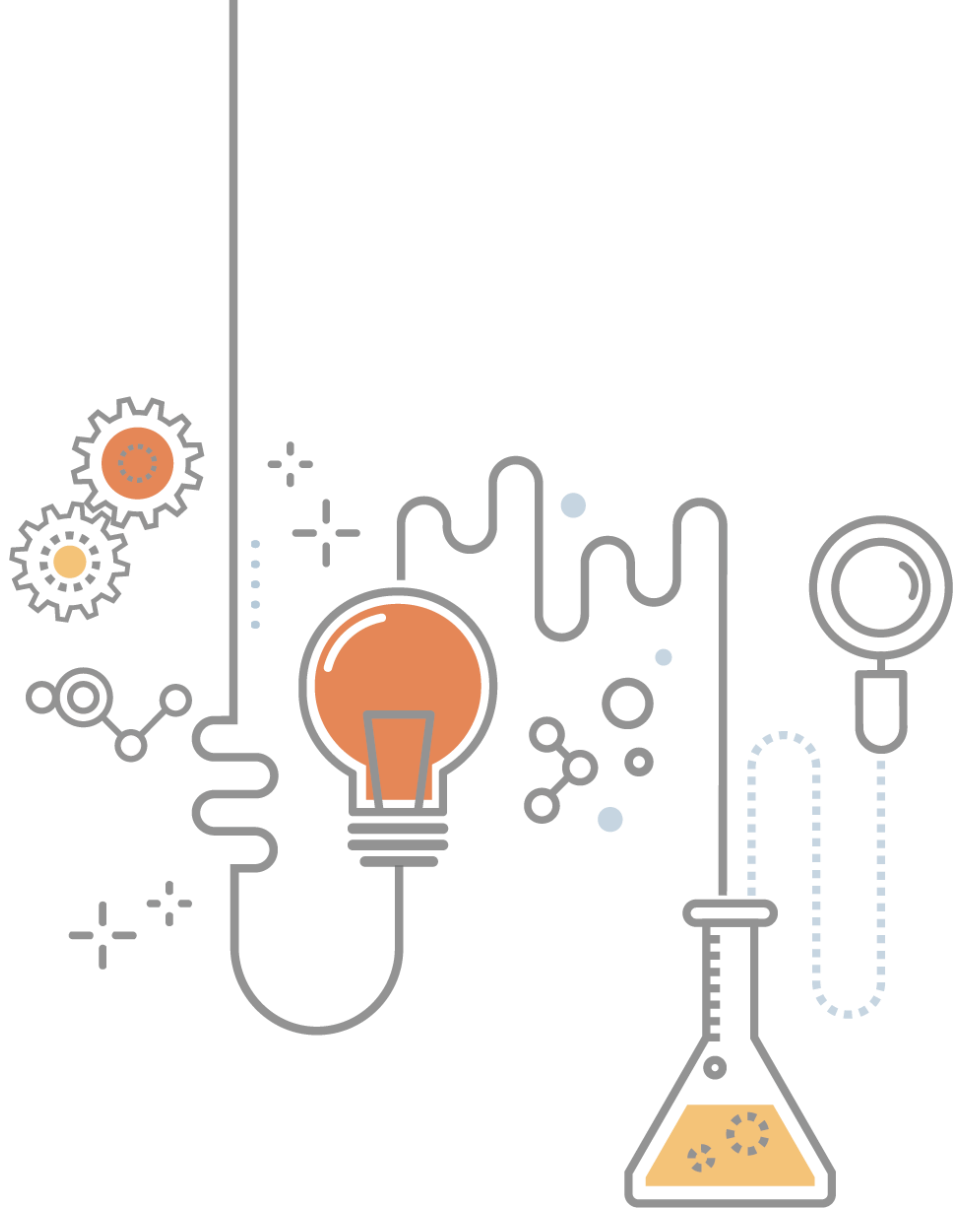
バンドが分離

陽性バンドでは
ないと判別可



- ゲルボックスに入れたままUVイルミネーターに載せ、UV照射
- 正面から撮影
- トレイ情報も併せて撮影すると良い





ご清聴ありがとうございました。