



# すぐに役立つHLA Vol.1 HLA入門

## 第2部 HLA検査試薬 配布資料

株式会社ベリタス  
2022/04/27

# HLAタイピング検査 (HLA抗原検査)

# HLAタイピング検査の歴史

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

1990年代後半から遺伝子検査の時代へ

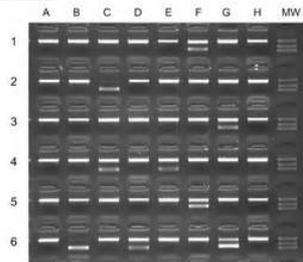
アレル数の増大により解像度の向上

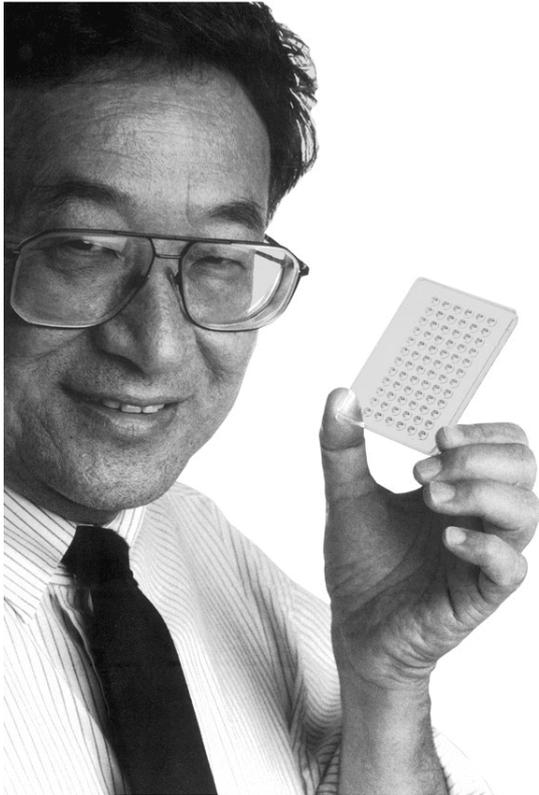
検体数の増加によりスループットの改善

解像度、スループットの両方を満たす技術

# タイピング検査手法の比較

手法	利点	課題
タイピングトレー	コスト安	低解像度
SSP法	短時間	大量検体に不向き
RSSO法 (LABScan/Luminex)	大量検体処理 解像度(中~高)	Luminexが必要 みなし判定
SBT法 (サンガーシーケンス)	高解像度	コスト、時間、装置(シーケンサー)
NGS (次世代シーケンス)	全配列のタイピング	操作の煩雑さ





NATURE

December 5, 1964 VOL. 204

PAUL I. TERASAKI  
JOHN D. McCLELLAND

University of California, Los Angeles,  
School of Medicine, Department of Surgery,  
Los Angeles.

## Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins

ATTEMPTS to define leucocyte groups in man serologically have been hampered by the scarcity of immune human antisera and the capriciousness of the leucoagglutination reaction<sup>1</sup>. The method recorded here for assaying lymphocyte cytotoxins in a microscale was developed to circumvent these difficulties. Its extreme sensitivity permits performance of 1,000 or more tests with 1 ml. of antiserum. Furthermore, lymphocytes obtained from one finger-prick sample of blood are sufficient for 100 separate tests. The basic innovation in

1 uLの血清でLymphocyte cytotoxinをテストする方法を開発  
Terasakiプレートは一般的な用語として利用されるようになる

cells and in  
sensitivity over  
the reaction  
s permits

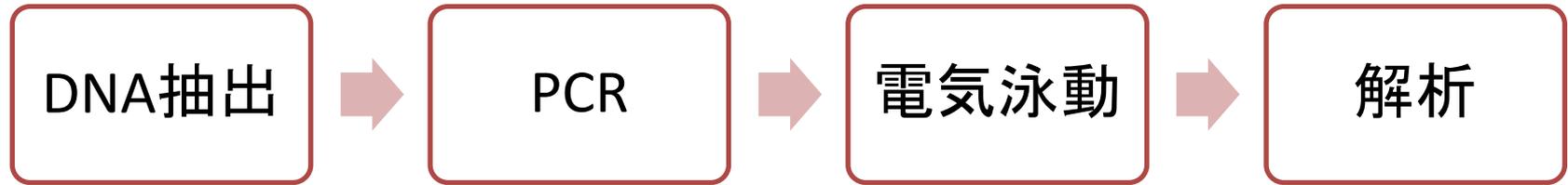
# タイピングトレー

- テラサキHLAトレー
  - 体外診断用医薬品として承認取得
  - 昭和58年(1983年)6月24日
- 体外診断用医薬品承認の廃止
  - 平成18(2006年)年7月26日

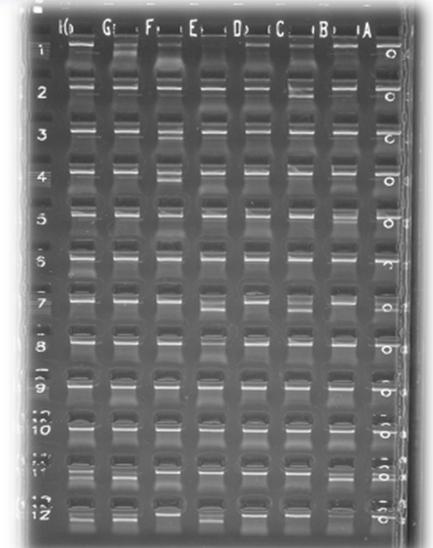
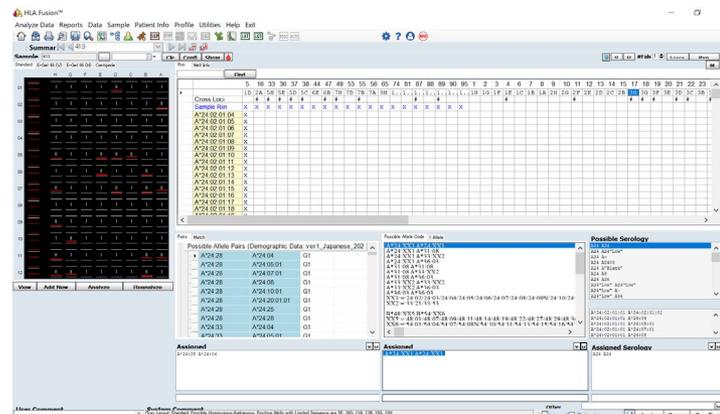
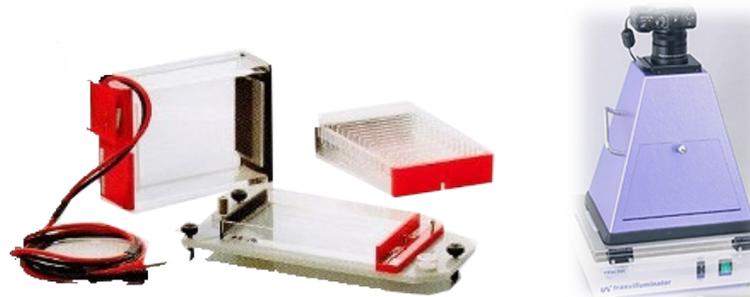
HLA抗原の複雑性が明らかになるにつれ精度が不十分になった  
遺伝子タイピングが必要となり、使用されなくなった歴史がある



# SSP(Sequence Specific Primer)法



- 短時間でのアウトプット
- 高額な装置が不要
- 低解像度
- 大量検体には不向き



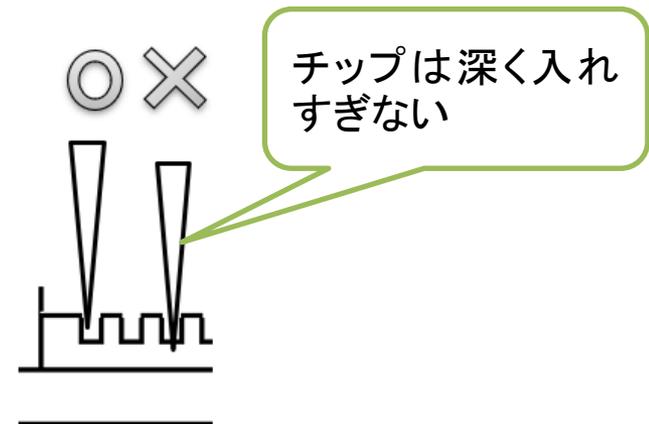
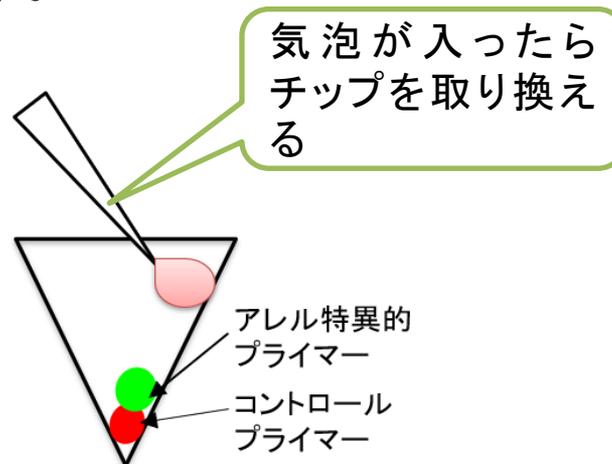
# SSP法の製品の一例

- 多くのキットが2桁用キット
- 一部の製品は4桁用キット(Alele Specific)

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度
SSPJPN	マイクロ SSP ABC/DRDQ JPN	10 tests	冷凍 (-20℃)
SSPABDR	マイクロ SSP AB/DR	10 tests	冷凍 (-20℃)
SSPABDRX	マイクロ SSP AB/DR 384	40 tests	冷凍 (-20℃)
SSPML02	マイクロ SSP Generic HLA Class I & II (ABDRDQ)	4 tests	冷凍 (-20℃)
SSP1L	マイクロ SSP Class I Generic Typing Kit	10 tests	冷凍 (-20℃)
SSP1A	マイクロ SSP HLA A Typing Kit	12 tests	冷凍 (-20℃)
SSP1AB	マイクロ SSP HLA AB Typing Kit	10 tests	冷凍 (-20℃)
SSP1B	マイクロ SSP HLA B Typing Kit	8 tests	冷凍 (-20℃)
SSP1C	マイクロ SSP HLA C Typing Kit	16 tests	冷凍 (-20℃)
SSP2L	マイクロ SSP Class II Generic Typing Kit (DRB/DQB)	30 tests	冷凍 (-20℃)
SSP2LB	マイクロ SSP Class II DRB Only Generic Typing Kit	40 tests	冷凍 (-20℃)
SSP2LQB1	マイクロ SSP Generic HLA Class II (DQB only)	24 tests	冷凍 (-20℃)
SSPDRQP1	マイクロ SSP Class II Generic Typing Kit (DRB/DQB1/DPB1)	10 tests	冷凍 (-20℃)

# SSPの手技のポイント

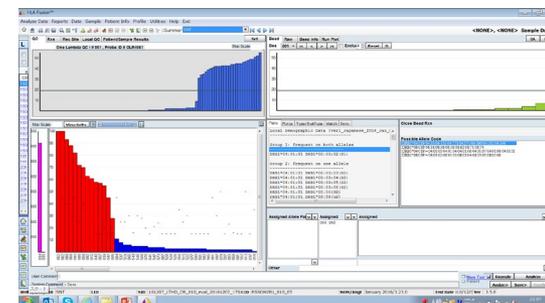
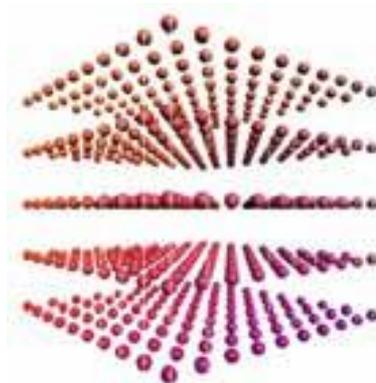
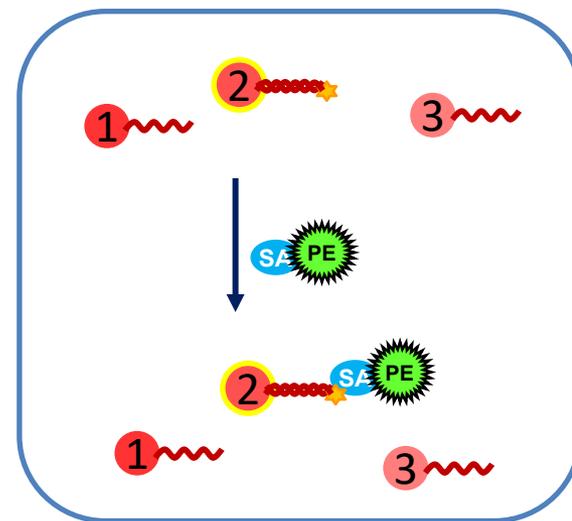
- DNA濃度は100 ng/ $\mu$ Lが最適
- D-Mixを室温に戻した際の色はピンク、黄色は使用不可
- ポリメラーゼはAmpliTaqを使用、ボルテックス不可
- PCRトレイのウェルの底にプライマーがあるため、D-Mixは壁面から加える
- ゲルにサンプルを加える際はできるだけ速やかに、チップは深く入れすぎない



# RSSO(Reverse Sequence Specific Oligonucleotide)法



- 中～高解像度(キットに依存)
- 大量検体にも対応
- アウトプットまで数時間
- LABScanで測定



# RSSO法の製品

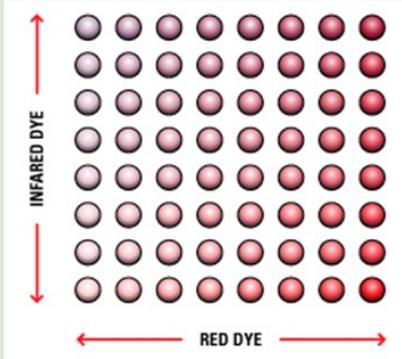
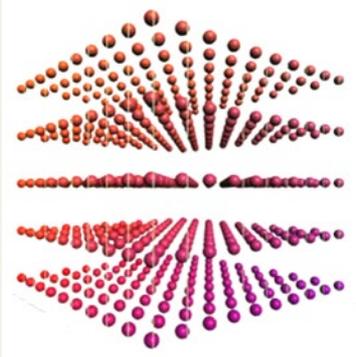
- LABTypeシリーズ
  - SSO,CWD,XRの3種類がある
  - SSOは2桁、CWDとXRは4桁のタイピングキット

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

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

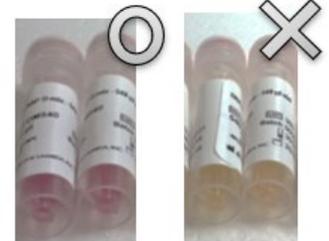
商品名	商品コード	梱包単位	商品コード	梱包単位
LABType XR Class I A Locus	RSSOX1A	100 test	RSOX1AT	20 test
LABType XR Class I B Locus	RSSOX1B	100 test	RSOX1BT	20 test
LABType XR Class I C Locus	RSSOX1C	100 test	RSOX1CT	20 test
LABType XR Class II DRB1 Locus	RSSOX2B1	100 test	RSOX2B1T	20 test

# RSSO法の測定装置 (LABScan/医療機器)

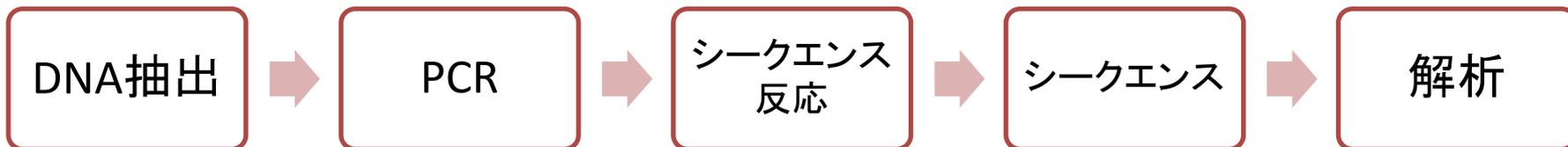
名称		ビーズ数	試薬
LABScan システム		100色 (10 × 10) 	SSOのみ
LABScan 3Dシステム		500色 (10 × 10 × 5) 	SSO,CWD,XR全て 使用可能

# LABTypeの手技のポイント

- DNA濃度は20 ng/ $\mu$ Lが最適
- D-Mixを室温に戻した際の色はピンク、黄色は使用不可
- ポリメラーゼはAmpliTaqを使用、ボルテックス不可
- DNA変性の際は液色の変化を確認
  - 濃いピンク→中和後に透明
- ビーズ試薬はボルテックス後にピペティングで混合
- 温度のメリハリをしっかりと
  - ビーズを加える際は氷上で速やかに行う
  - ハイブリ終了後は速やかに氷上で冷やす
- LABScanでの測定時はテンプレートファイルのロットを確認

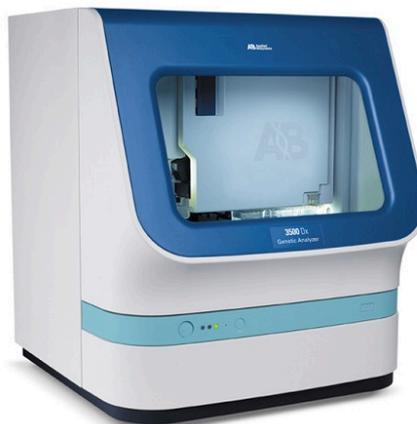


# SBT(Sequencing Based Typing)法



- 高解像度
- サンガーシーケンサーで測定
- 大量検体の際は手間がかかる
- 結果が出るまでに1-2日かかる
- 製品名 : SeCore

専用解析ソフト: uTYPE

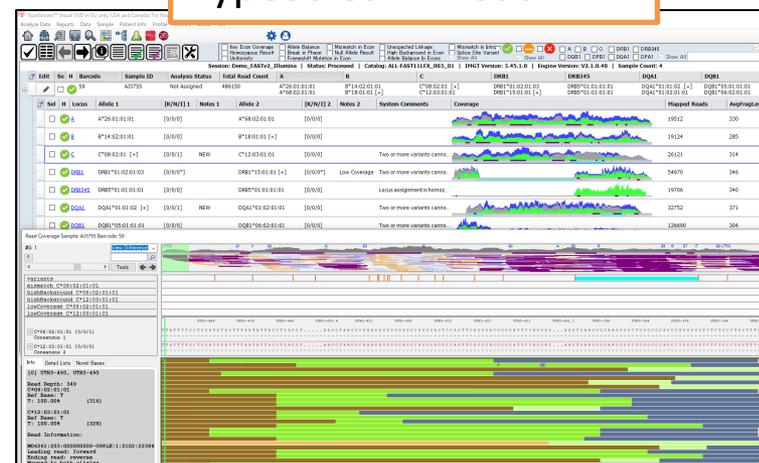


# NGS(Next Generation Sequencing)法



- 高解像度(完全タイピング)
- 次世代シーケンサーで測定
- 結果が出るまでに時間がかかる(2-2.5日)
- 製品名: AllType FASTplex NGS  
– 11ローカスを1度に解析

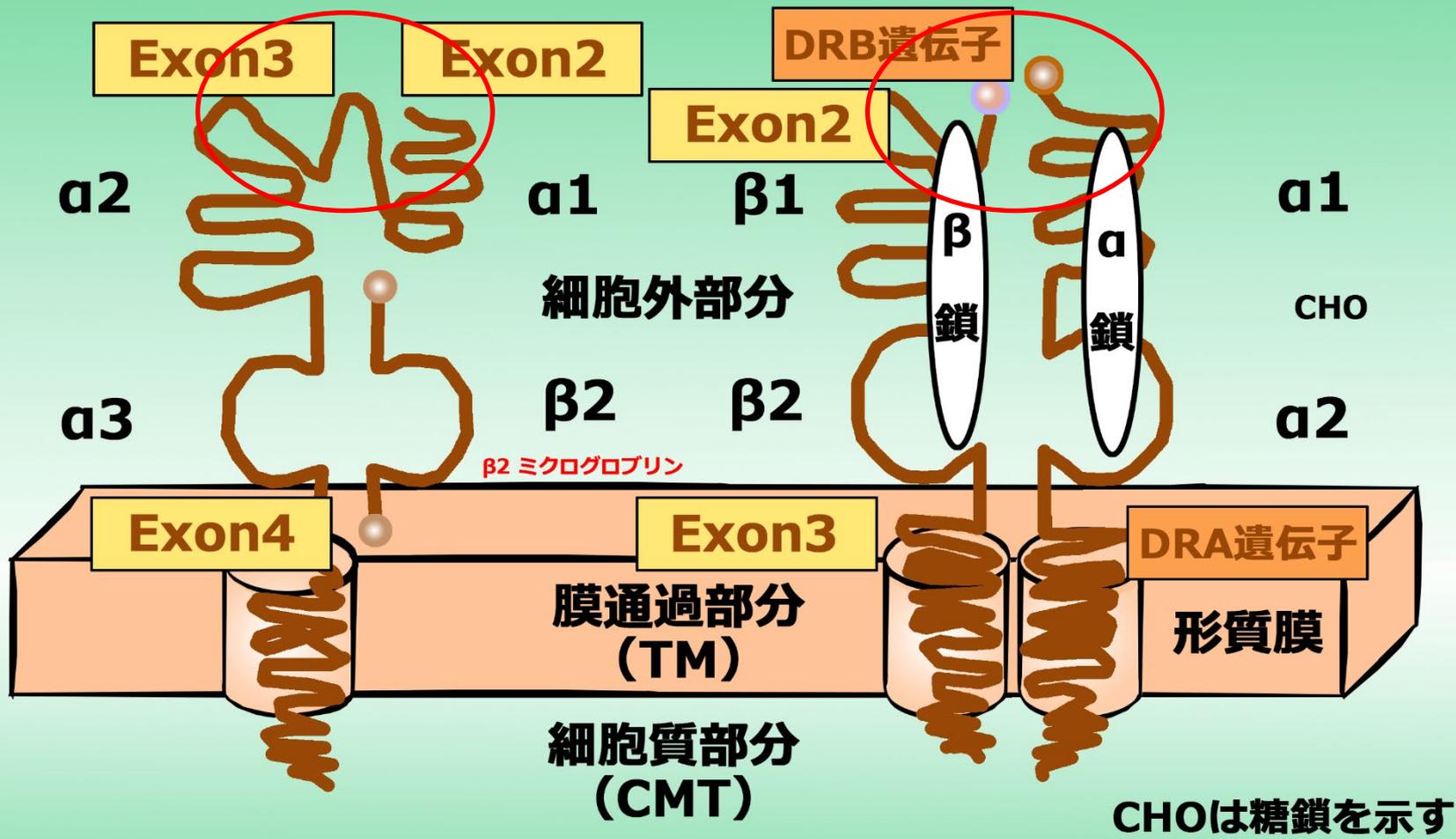
専用解析ソフト:  
TypeStream Visual



# HLAの抗原提示部位

## MHC Class I (HLA-A,B,C)

## MHC Class II (HLA-DR,DQ,DP)



# HLAタイピング (Class I)

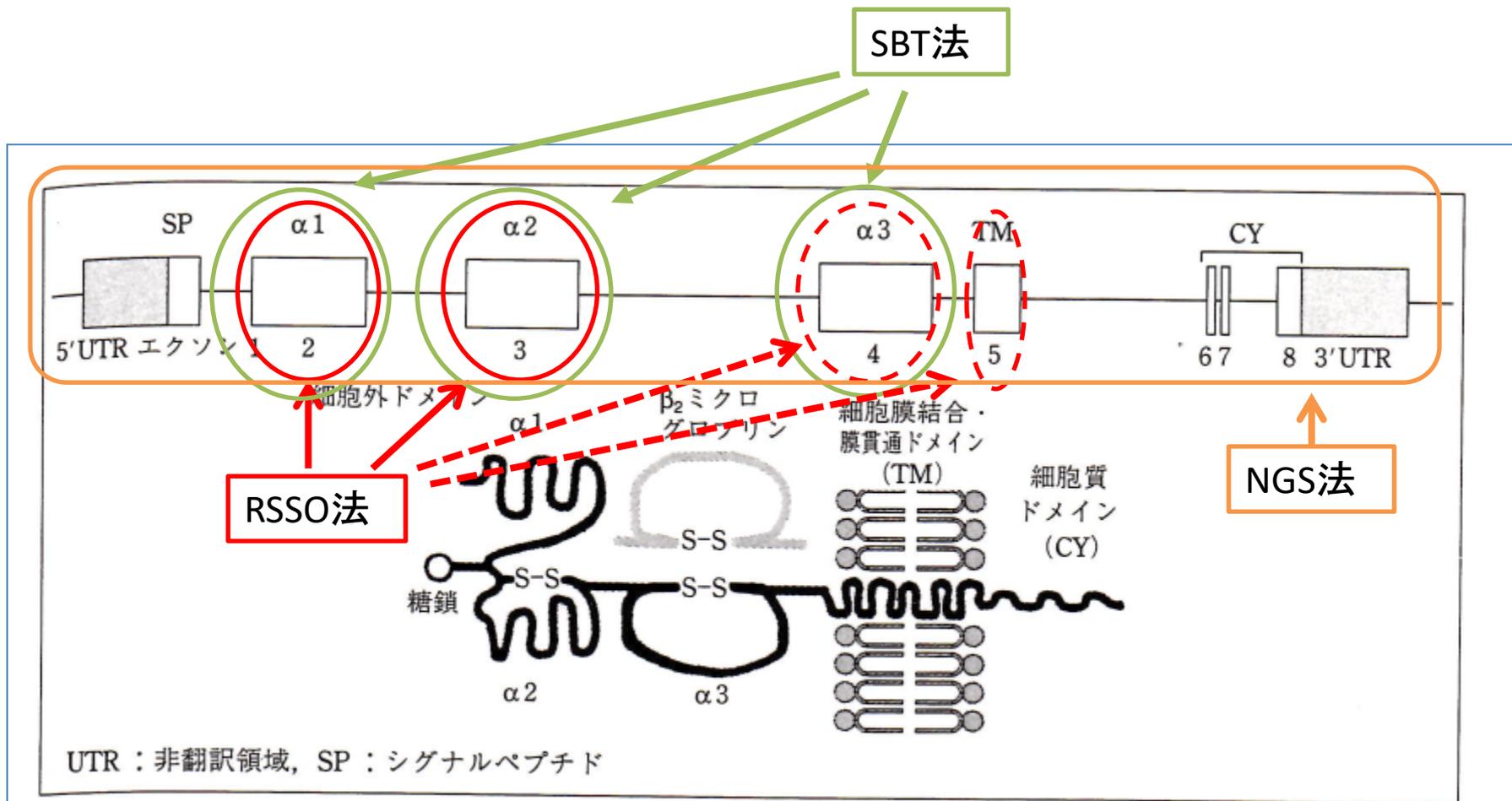
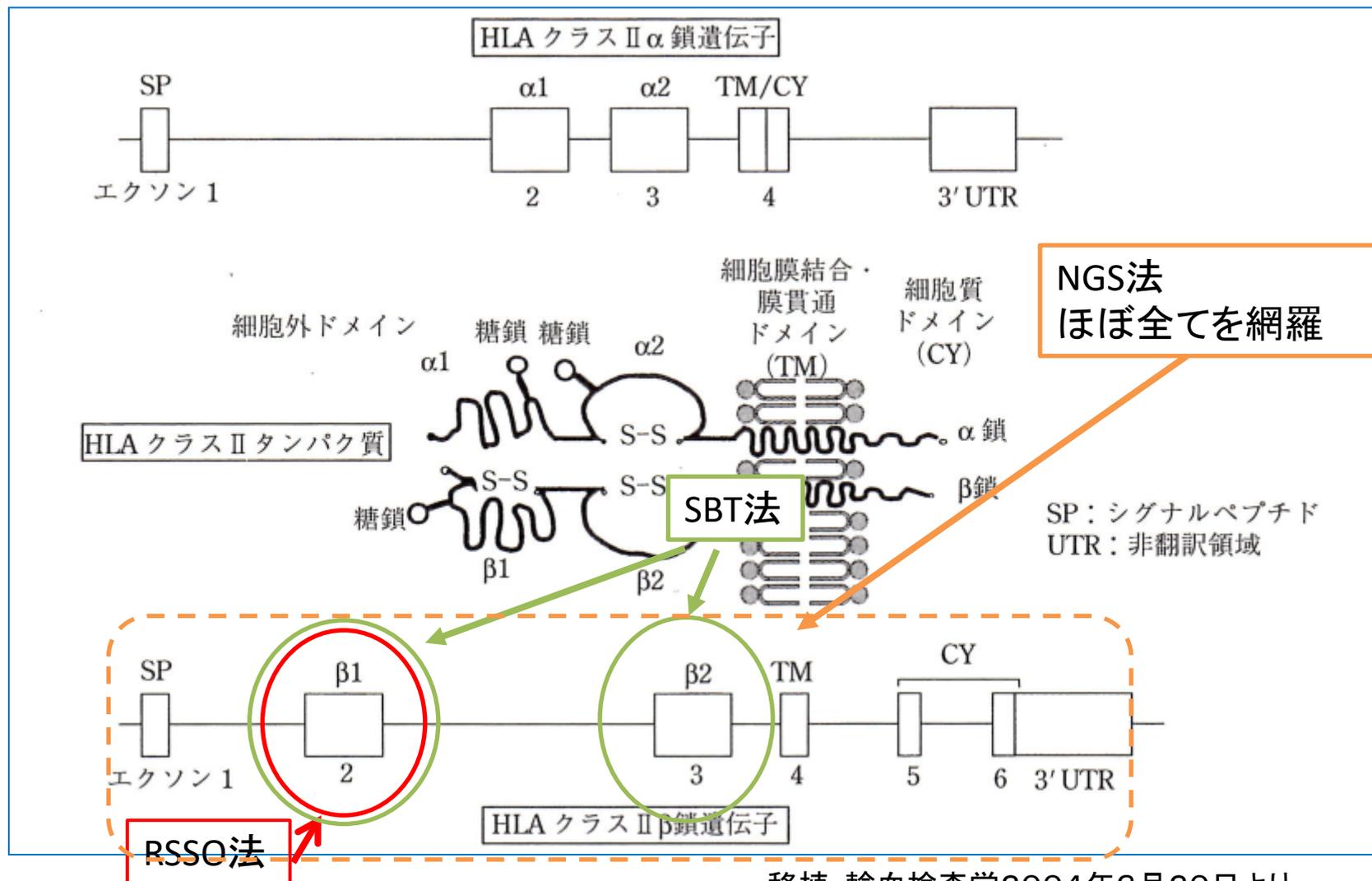


図 2.3 古典的 HLA クラス I 遺伝子構造と分子構造との関連性

# HLAタイピング (Class II)



# 解像度の違い



検査手法	Allele 1	Allele 2
SSP法 (SSPJPN)	XX1:=:24:02/24:02L/24:02Q/24:03/24:04/24:05/24:06/24:07/24:08/24:09N/24:10/24:11N/24:13/24:15/24:17/24:18/24:20/24:21/24:22/24:23/24:25/24:26/24:27/24:28/24:29/24:30/24:31/24:32/24:33/24:34/24:35/24:36N/24:37/24:38/24:39/24:40N/24:41/24:42/24:43/24:45N/24:46/24:47/24:48N/24:49/24:50/24:53/24:54/24:55/24:56/24:58/24:59/24:60N/24:61/24:62/24:63/24:66/24:67/24:68/24:69/24:70/24:72/24:73/24:74/24:75/24:76/24:78/24:79/24:80/24:82/24:83N/24:84N/24:85/24:86N/24:87/24:88/24:89/24:90N/24:91/24:95/24:96/24:97/24:98/24:99/24:100/24:101/24:102/24:103/24:104/24:106/24:107/24:108/24:109/24:110/24:111/24:112/24:113/24:114/24:115/24:116/24:117/24:118/24:119/24:121/24:122/24:123/24:124/24:125/24:126/24:127/24:128/24:129/24:130/24:131/24:132N/24:133/24:134/24:135/24:136/24:137/24:139/24:140/24:141/24:142/24:143/24:144/24:145/24:146/24:147/24:148/24:149/24:150/24:151/24:152/24:153/24:154/24:155N/24:156/24:157/24:158N/24:159/24:160/24:161/24:162/24:163N/24:164/24:165/24:166/24:167/24:168/24:169/24:170/24:171/24:172/24:173/24:174/24:175/24:176/24:177/24:178/24:179/24:180/24:181/24:182/24:183N/24:184/24:185N/24:186/24:187/24:189/24:190/24:192/24:193/24:194/24:195/24:196/24:197/24:198/24:199/24:200/24:201/24:202/24:203/24:204/24:205/24:206/24:207/24:208/24:209/24:210/24:211/24:212/24:213/24:214/24:215/24:216/24:217/24:218/24:219/24:220/24:221/24:222/24:223/24:224/24:225/24:226/24:227/24:228/24:229/24:230/24:231/24:232/24:233/24:234/24:235/24:236/24:237/24:238/24:242/24:243/24:244/24:245/24:247/24:249/24:250/24:251/24:253/24:254/24:257/24:258/24:261/24:263/24:264/24:265/24:266/24:267/24:268/24:269/24:270/24:271/24:272/24:275/24:276/24:279/24:280/24:283/24:284/24:286/24:287/24:289/24:290/24:292/24:293/24:294Q	XX2:=:33:01/33:03/33:03Q/33:04/33:05/33:06/33:07/33:08/33:09/33:10/33:11/33:12/33:14/33:15/33:16/33:17/33:18/33:19/33:20/33:22/33:23/33:25/33:26/33:27/33:28/33:29/33:30/33:31/33:32/33:33/33:34/33:35/33:36/33:37/33:39/33:40/33:41/33:42/33:43/33:44/33:45/33:46/33:47/33:49/33:50/33:52/33:54/33:55/33:56/33:57/33:58/33:59/33:60/33:62/33:63/33:64/33:65/33:66/33:67/33:68/33:70/33:71/33:72/33:73N/33:74N/33:75/33:76/33:77/33:78/33:79/33:80N/33:81/33:82/33:83/33:84/33:85/33:86/33:87/33:88/33:89/33:90/33:91/33:93/33:94/3
SSO法 (LABType SSO)	XX1:=:24:02/24:02Q/24:21/24:27/24:40N/24:48N/24:49/24:69/24:70/24:74/24:76/24:78/24:79/24:80/24:83N/24:86N/24:93/24:101/24:105/24:110/24:111/24:114/24:116/24:117/24:118/24:120/24:122/24:123/24:126/24:127/24:128/24:132N/24:135/24:137/24:140/24:141/24:142/24:144/24:147/24:150/24:152/24:153/24:154/24:155N/24:157/24:158N/24:159/24:161/24:163N/24:165/24:166/24:169/24:170/24:171/24:172/24:173/24:175/24:176/24:178/24:179/24:180/24:181/24:183N/24:185N/24:186/24:187/24:192/24:193/24:195/24:196/24:198/24:202/24:205/24:206/24:209/24:212/24:216/24:217/24:221/24:222N/24:223/24:224/24:225/24:231/24:232N/24:233/24:234/24:235/24:236/24:237/24:238/24:242/24:243/24:244/24:245/24:247/24:249/24:250/24:251/24:253/24:254/24:257/24:258/24:261/24:263/24:264/24:265/24:266/24:267/24:268/24:269/24:270/24:271/24:272/24:275/24:276/24:279/24:280/24:283/24:284/24:286/24:287/24:292/24:295/24:297/24:303N/24:305/24:306/24:311/24:312N	AJAFR:=:33:03/33:03Q/33:06/33:15/33:25/33:31/33:40/33:44/33:74N/33:77/33:78/33:79/33:80N/33:81/33:82/33:84/33:85/33:95
SSO法 (LABType XR)	XX1:=:24:02/24:292/24:295/24:303N/24:306/24:311	GNHZ:=:03/95
NGS	<b>24:02:01:01</b>	<b>33:03:01:01</b>

検査の目的に応じて試薬の選択を

# 抗HLA抗体検査

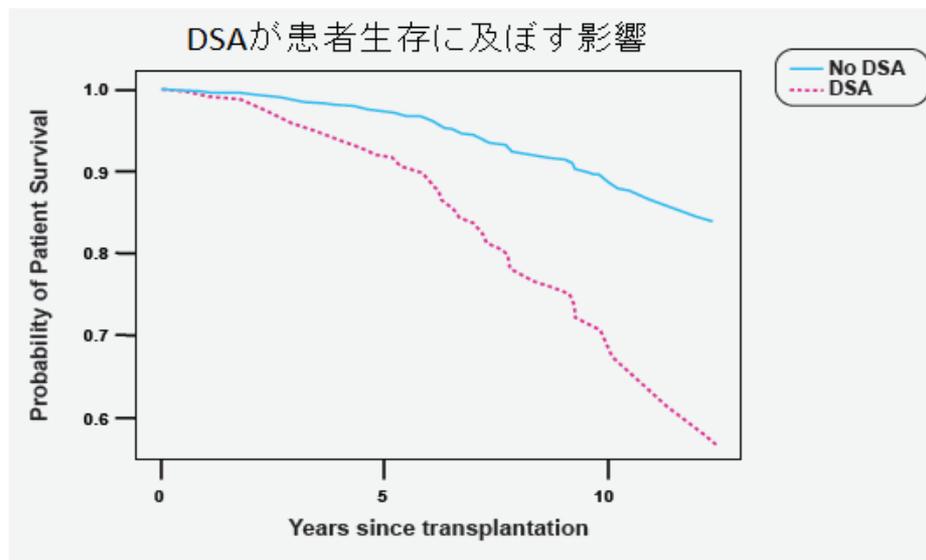
# なぜ抗体検査を行うのか

- 移植前
  - 患者の体内にドナーに対する抗体が存在することが移植後の臓器生着に影響を及ぼす
- 移植後
  - DSA(Donor Specific Antibody)の存在は生存率の低下につながる
  - 定期的に抗体検査を行いDSA発現の有無をモニタリングすることが重要

移植前後で抗体の有無を検査することが患者様の予後の改善につながる

# DSAとは

- Donor Specific Antibodyの略
- DSAの存在は臓器生着に影響している
- LABScreen Single Antigen試薬により算出されるnMFIの値 (normalized Mean Fluorescence Intensity: One Lambda社)をもとに DSAの有無を議論されることが主流



患者生存率予測曲線は移植後の任意の時点で心移植レシピエントにおける *de novo* DSAが出現した場合とDSA非出現の場合の影響を示している。<sup>17</sup>

# 保険収載内容 (2022/4時点)

- 臓器移植

実施時期	検査内容	点数
移植前	抗HLA抗体検査	4000点
移植後	スクリーニング検査(抗体の有無を見る)	1000点
	抗体特異性同定検査(スクリーニング検査で陽性の場合のみ、陽性のアレルを同定する)	4850点

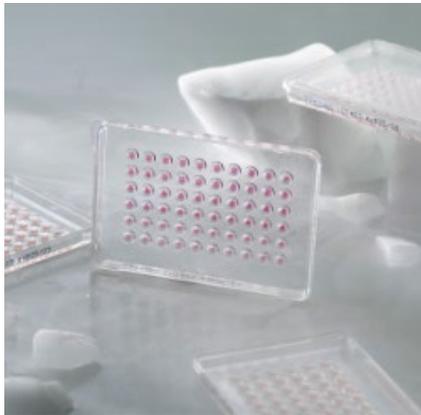
- 造血幹細胞移植

  - 移植前に抗HLA抗体検査を実施した場合に4000点

- 全ての検査において、検査方法・試薬の指定はない

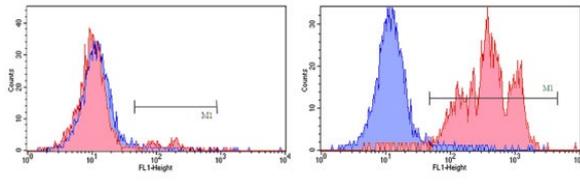
# 抗HLA抗体検査の歴史

- より大量検体へ
- より高感度へ
- より高精度へ



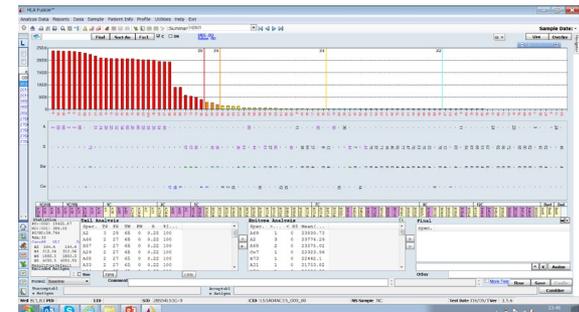
LAT  
(ELISA)

LCT  
(細胞障害性  
試験)



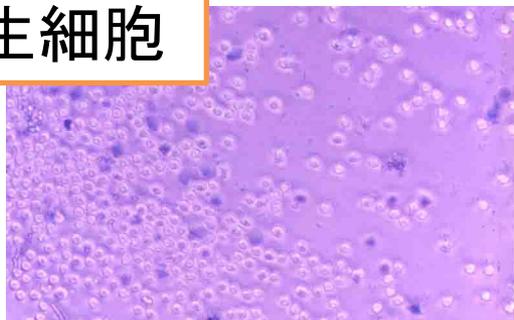
FlowPRA  
(フローサイト  
メーター)

LABScreen  
(Luminexビーズ)

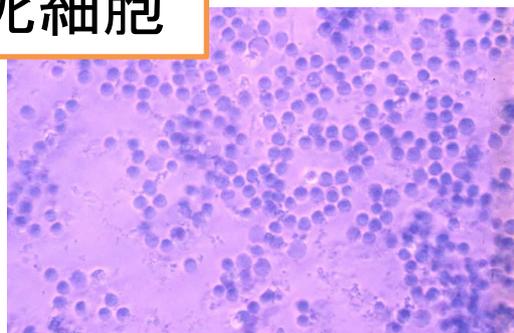


# LCT (リンパ球細胞障害試験)

生細胞



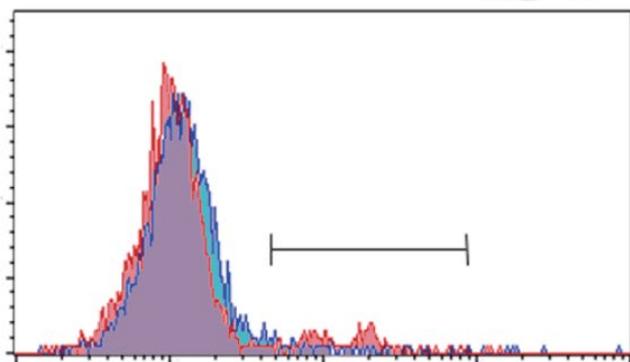
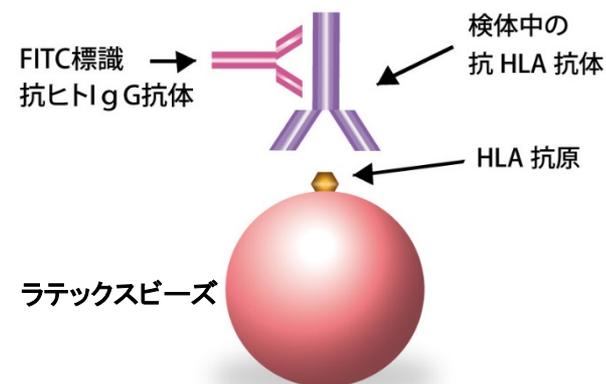
死細胞



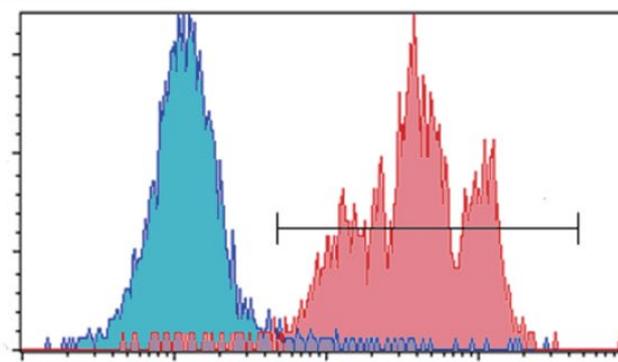
ビーズ結合性		(+) (−)		蛍光ビーズ法	
細胞結合性		(+) (−)		ダイレクト・クロスマッチ	
補体依存性細胞傷害活性		(+)	(−)	LCT, 補体結合補助試薬	
イムノグロブリン サブクラス	IgG	最重要	重要	注意	−
	IgM	重要	−	−	−

- 最も生体内の反応に近い
- 生細胞が必要になるため、実臨床においては検査ができないこともある

- フローサイトメーターを用いて抗HLA抗体の有無を判断
- 試薬の種類
  - FlowPRA Screening
  - FlowPRA Single Antigen



陰性

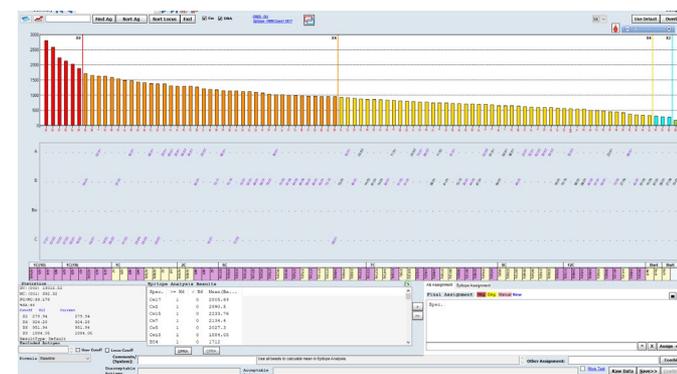
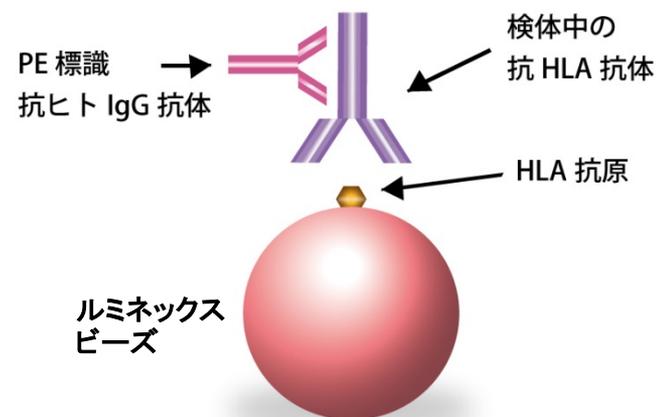


陽性

# LABScreen



試薬名	目的
LABScreen Mixed	スクリーニング
LABScreen PRA	スクリーニング ある程度の特異性
LABScreen Single Antigen	抗体特異性の同定 DSA(Donor Specific Antibody)の検出 nMFI値の算出
<ul style="list-style-type: none"> <li>LABScreen Single Antigen Supplement</li> <li>LABScreen Single Antigen ExPlex (LABScan3D専用)</li> </ul>	抗体の同定 DSA(Donor Specific Antibody)の検出 nMFI値の算出 日本人に特有なHLA抗原を多く含む

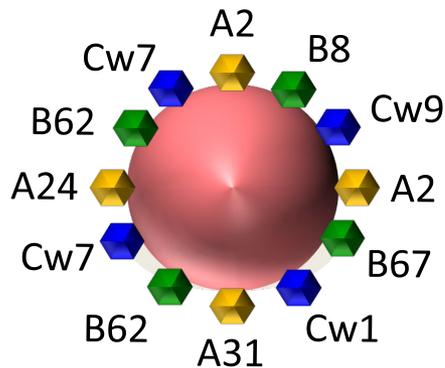


# Mixed, PRA, Single Antigenの違い

## スクリーニング試薬

### Mixed

17種ビーズ



Class I : 3パネル/1beads

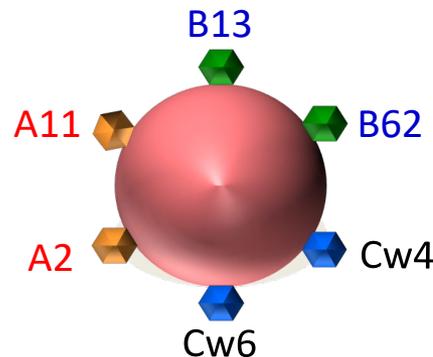
Class II : 5パネル/1beads

細胞株からの抽出抗原

### PRA

Class I : 56種ビーズ

Class II : 35種ビーズ



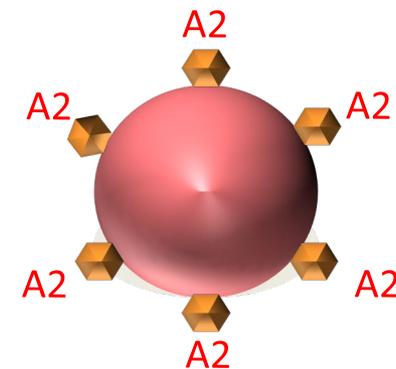
1パネル/1beads

## 特異性同定試薬

### Single Antigen

Class I : 97種ビーズ

Class II : 95種ビーズ

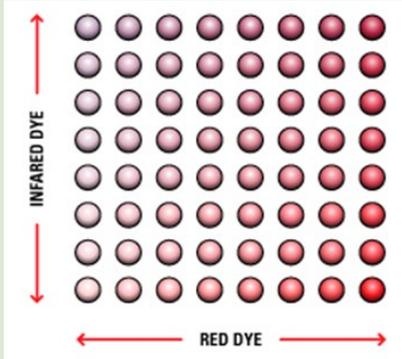
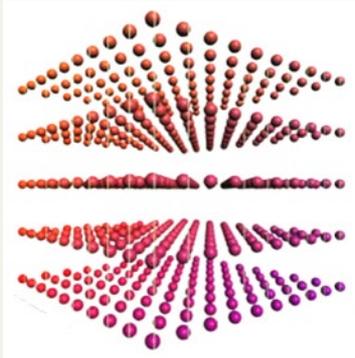


1抗原/1beads

組換え体からの精製抗原

\*1パネル=1人分のハプロタイプ

# LABScreenの測定装置 (LABScan/医療機器)

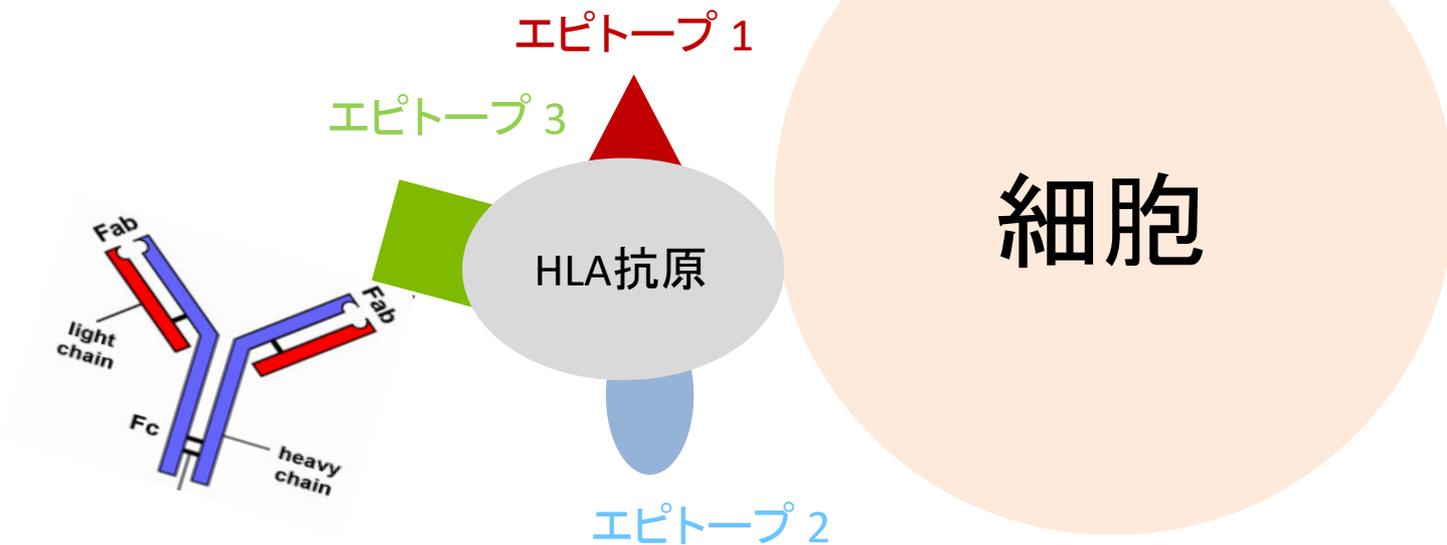
名称		ビーズ数	試薬
LABScan システム		100色 (10 × 10) 	ExPlexは使用不可
LABScan 3Dシステム		500色 (10 × 10 × 5) 	全て使用可能

# LABScreenの手技のポイント

- 非特異反応をできるだけ少なくするために、検体の凍結融解と遠心は必ず行う
- 検体は血清を推奨
- ビーズ試薬はボルテックス後にピペティングで混合
- Wash Bufferの希釈は用時調整
- LABScanで測定時はテンプレートファイルのロットを確認

# 生体内での抗HLA抗体の反応

- 抗HLA抗体はHLA抗原の特異的な構造(=アミノ酸配列)に対して産生される
- HLA抗原に結合するのではなく、エピトープに特異的に結合する



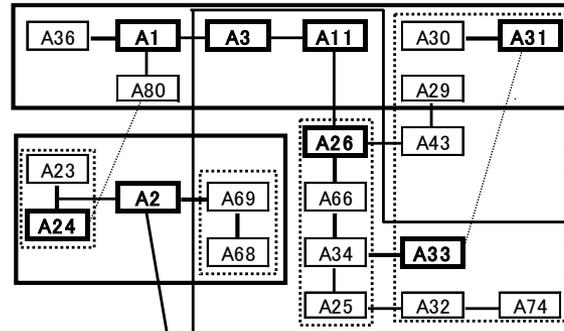
# CREG (Cross Reactive Group)

## 実際に見つかった抗血清の特異性

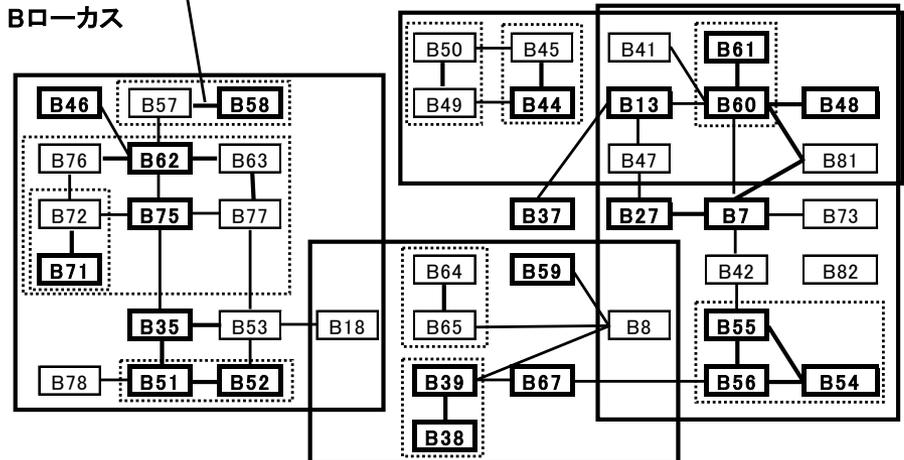
- A1+A36
- A1+A36+A80+A2
- A3+A24
- A3+A11
- A30+A31
- A31+A33
- A2+A24
- A2+A68+A69
- A2+B57+B58
- B62+B75
- B62+B57
- B35+51+B53
- B51+B52
- B38+B39+B67
- B44+B45
- B7+B27
- B7+B60+B48
- B60+B61+B13
- B54+B55
- B55+B56 etc.



Aローカス



Bローカス



\* Nakajima F. *MHC* Vol.13, No2: 2006

1C(10)		1C(19)				1C					2C											
A25(4)	A26	A34	A66	A29	A30	A31	A32(4)	A33	A74	A1	A36	A80	A43	A23(4)	A24(4)	A3	A11	A23(4)	A24(4)	A68	A69	A2

# CREG

## 交差反応性グループ

# vs

# Epitope

## 抗原決定基

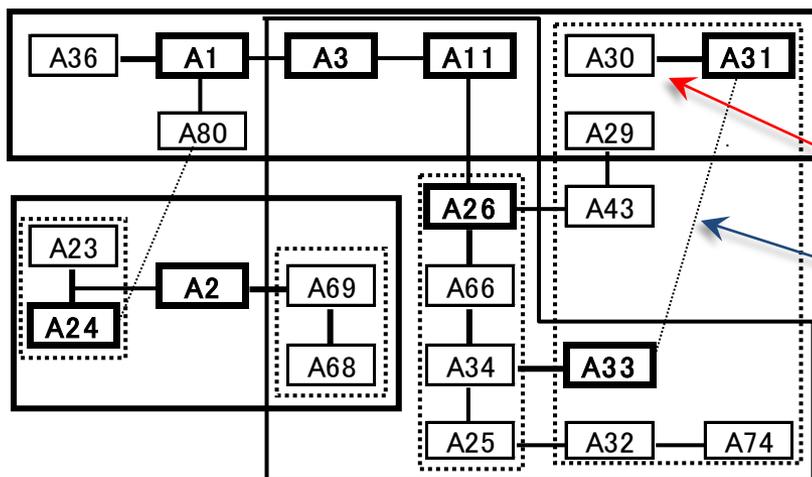


抗体特異性に基づく抗原の分類で、抗原をグループ化して類似性を図式化したもの

抗原のアミノ酸配列に基づく抗体認識部位の分類で、アミノ酸の位置と種類で示す

- 抗体の反応性に基づく分類 ↔ 抗原の設計図に基づく分類
- 旧来からの経験則 ↔ HLA遺伝子解析で明確化
- 実際の反応 ↔ 反応の予測
- 説明のつかない反応もある ↔ 予測どおりに反応しない場合もある

### Aローカス



HLA allele	$\alpha 1$ -domain
Position	11123333333444455566677777788889 37917940123456134824623567034678901230
Consensus	HYFSREADTQFVRF AQRRIQGQERNVHTDVLGTLRGA
HLA-A*01:01	-----K-----M--AN-----D
HLA-A*02:01	-----G-K-H-----
HLA-A*11:01	--Y-----Q-----D
HLA-A*24:02	--S-----E-GK--EN-RIALR--
HLA-A*26:01	--Y-----RN-----AN-----D
HLA-A*30:01	--S-S-----R-----Q-----
HLA-A*31:01	--T-----R-----I-----73I
HLA-A*33:03	--T-----RN-----I-----

\* Nakajima F. MHC Vol.13, No2: 2006(一部改変)

1つの抗体は複数の抗原と反応する

**検査精度向上のために**

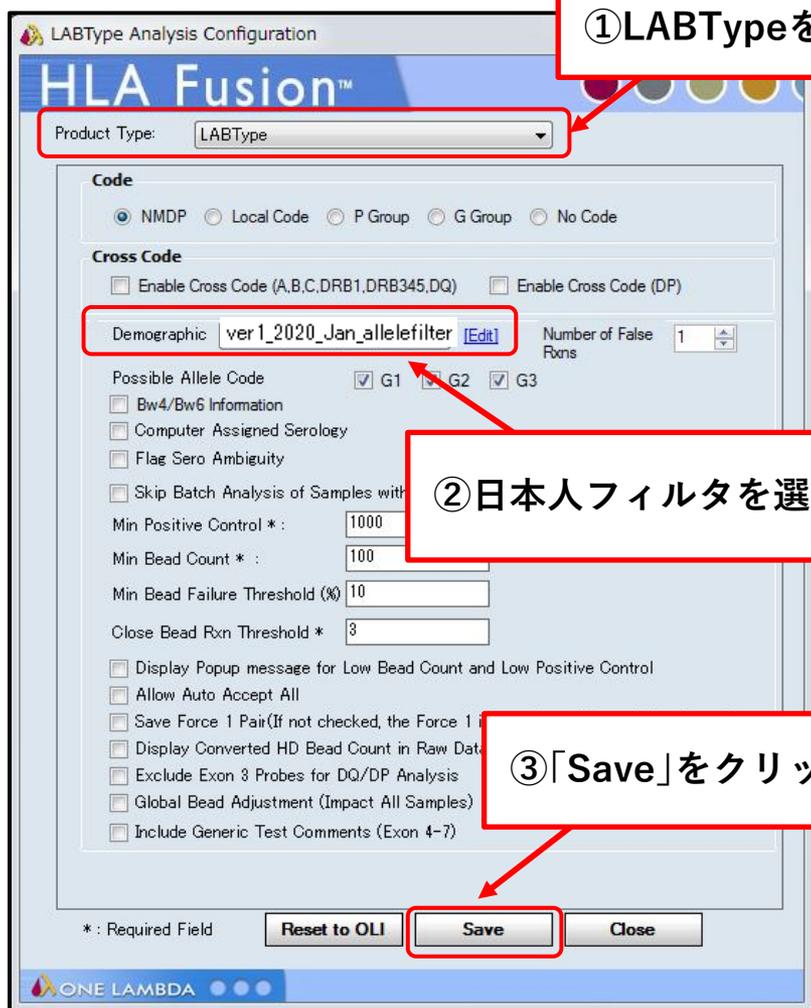
- 最新の解析ファイルを使用
  - 日本人フィルタはインポート後に解析に使用するための設定を行う
  - HLA Fusionのバージョンによる解析結果の違いはない
    - 最新のHLA FusionはFusion4.4
- ベリタスのホームページよりダウンロード可能
  - [https://www.veritastk.co.jp/hla/soft\\_file.html](https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html)

解析に必要なファイル	ファイル名
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	製品によって異なるためダウンロードをお願いします

- SSPJPNの解析はJPN用の日本人フィルタを使用

# HLA Fusion - 日本人フィルタの設定

## LABType



LABType Analysis Configuration

Product Type: LABType

Code:  NMDP  Local Code  P Group  G Group  No Code

Cross Code:  Enable Cross Code (A,B,C,DRB1,DRB345,DQ)  Enable Cross Code (DP)

Demographic: ver\_1\_2020\_Jan\_allelefilter [Edit] Number of False Rns: 1

Possible Allele Code:  G1  G2  G3

Bw4/Bw6 Information

Computer Assigned Serology

Flag Sero Ambiguity

Skip Batch Analysis of Samples with

Min Positive Control \*: 1000

Min Bead Count \*: 100

Min Bead Failure Threshold (%): 10

Close Bead Rxn Threshold \*: 3

Display Popup message for Low Bead Count and Low Positive Control

Allow Auto Accept All

Save Force 1 Pair (If not checked, the Force 1

Display Converted HD Bead Count in Raw Dat

Exclude Exon 3 Probes for DQ/DP Analysis

Global Bead Adjustment (Impact All Samples)

Include Generic Test Comments (Exon 4-7)

\*: Required Field

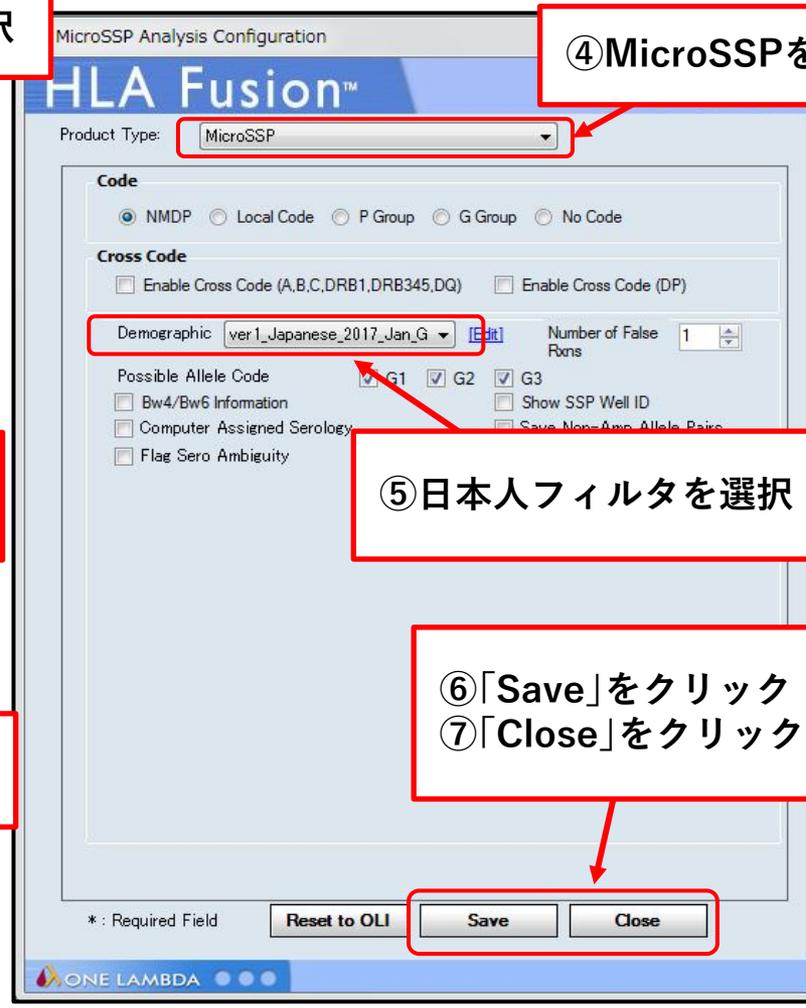
Reset to OLI Save Close

① LABTypeを選択

② 日本人フィルタを選択

③ 「Save」をクリック

## マイクロSSP



MicroSSP Analysis Configuration

Product Type: MicroSSP

Code:  NMDP  Local Code  P Group  G Group  No Code

Cross Code:  Enable Cross Code (A,B,C,DRB1,DRB345,DQ)  Enable Cross Code (DP)

Demographic: ver\_1\_Japanese\_2017\_Jan\_G [Edit] Number of False Rns: 1

Possible Allele Code:  G1  G2  G3

Bw4/Bw6 Information

Computer Assigned Serology

Show SSP Well ID

Save Non-App Allele Pairs

Flag Sero Ambiguity

\*: Required Field

Reset to OLI Save Close

④ MicroSSPを選択

⑤ 日本人フィルタを選択

⑥ 「Save」をクリック  
⑦ 「Close」をクリック

# HLA Fusion -SSPJPNの解析

- 血清型ファイル(IMGIT)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
- 早見表で結果を推測した後にFusionで確認することを推奨

The screenshot shows the HLA Fusion software interface. A red-bordered dialog box titled "HLA Fusion™" is displayed in the center, containing a red 'X' icon and the text "Error in saving results to the database." Below the dialog, the "Assigned Serology" section shows "A\*24:3" and "A\*24:3". The "Match" section shows "Possible Allele Code" and "Possible Serology".

A 及び C locus 早見表 : マイクロSSPAB/DRDQ JPN (lot#7)

This is a quick reference table for the A and C loci. It lists various alleles and their corresponding serology results. The table is organized into columns for different alleles and rows for different serology types. Blue squares indicate matches between alleles and serology types.

The screenshot shows the "System" and "Product Documents" sections of the Fusion software. The "System" section includes "Sero Equivalent: 3.37.0/2019July;" and "Database: (local)\#FUSION\_SQL14EXF". The "Product Documents" section shows a table of product documents.

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 Date	IMGIT Version	Catalog Description	Worksheet (8.5x11)	Worksheet (11x17)	Probe/Prin
SSPJPN_007_20	July 2019	3.37.0	Micro SSP™ Japanes...			

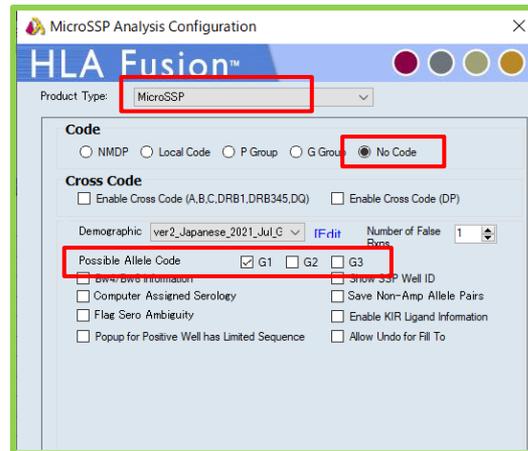
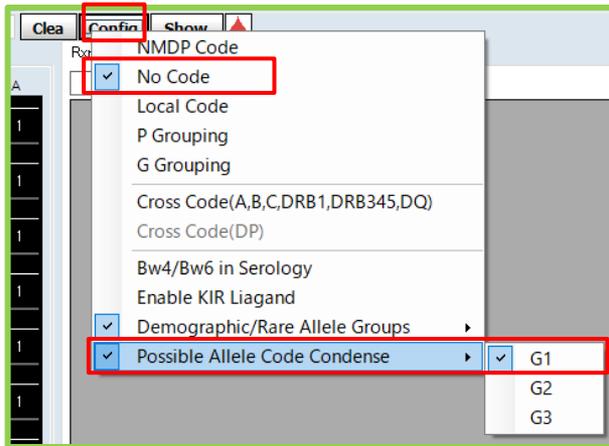
JPNの解析条件

# タイピング検査結果

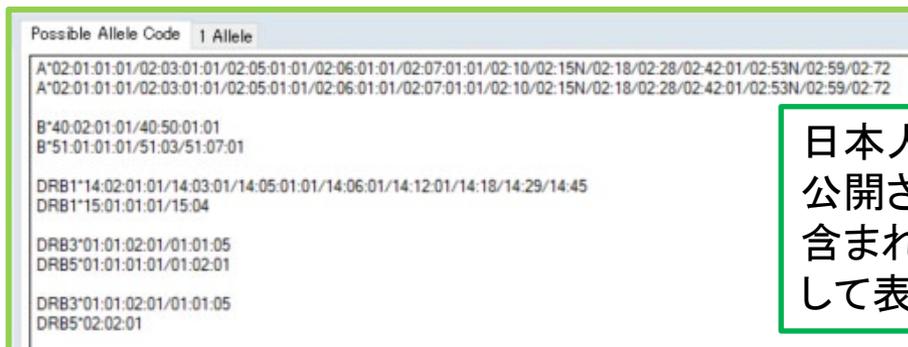
- DRとDQの連鎖、ハプロタイプを確認
- 日本組織適合性学会の報告ルールに準じて報告する場合は下記を参照
  - <http://jshi.umin.ac.jp/standarization/file/JSHI-hyoki-2017-2.pdf>
  - 例)Ambiguityは頻度の高い順に記載、組み合わせも加味して記載、ヌルの場合は「N」の表記を忘れない

# マイクロSSPの解析

- 判定に困るWellがあった場合はbpサイズを確認
- 解析結果の表示設定

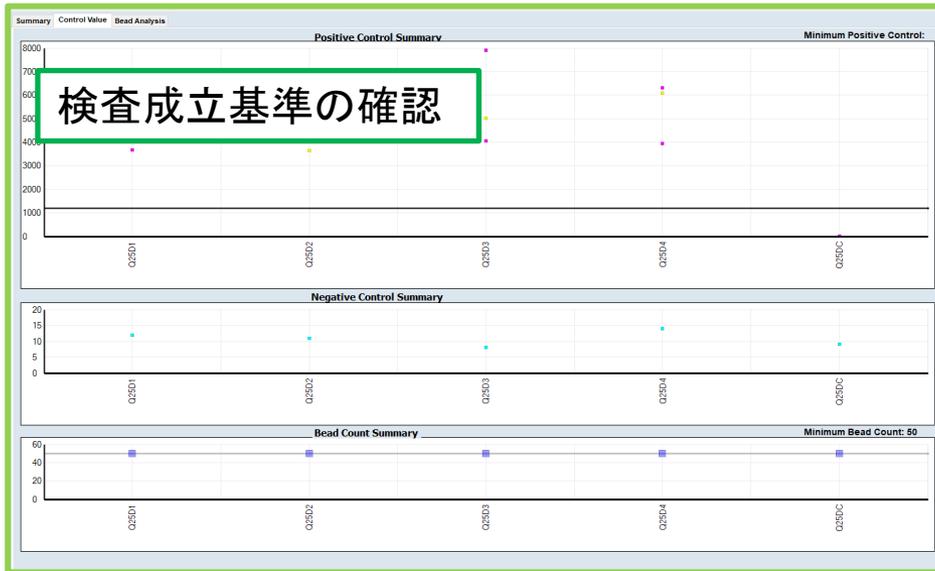


No Code、G1のみの表示に設定



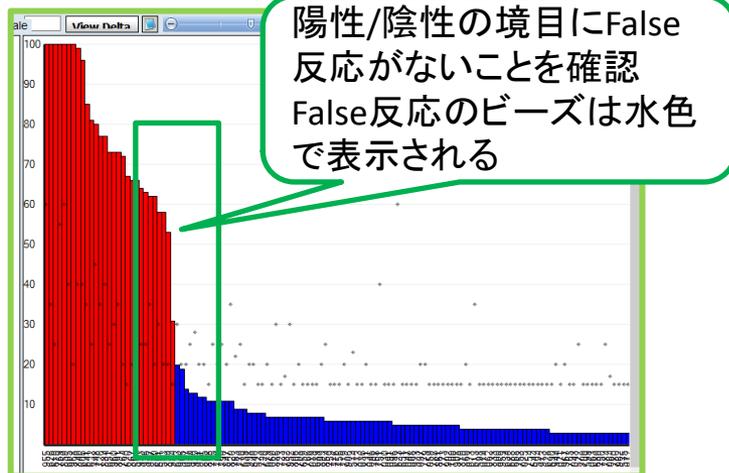
日本人フィルを使用している場合、JSHIより公開されているHLA 推定アレル一覧表に含まれるアレルのみがAmbiguityの候補として表示される

# LABTypeの解析



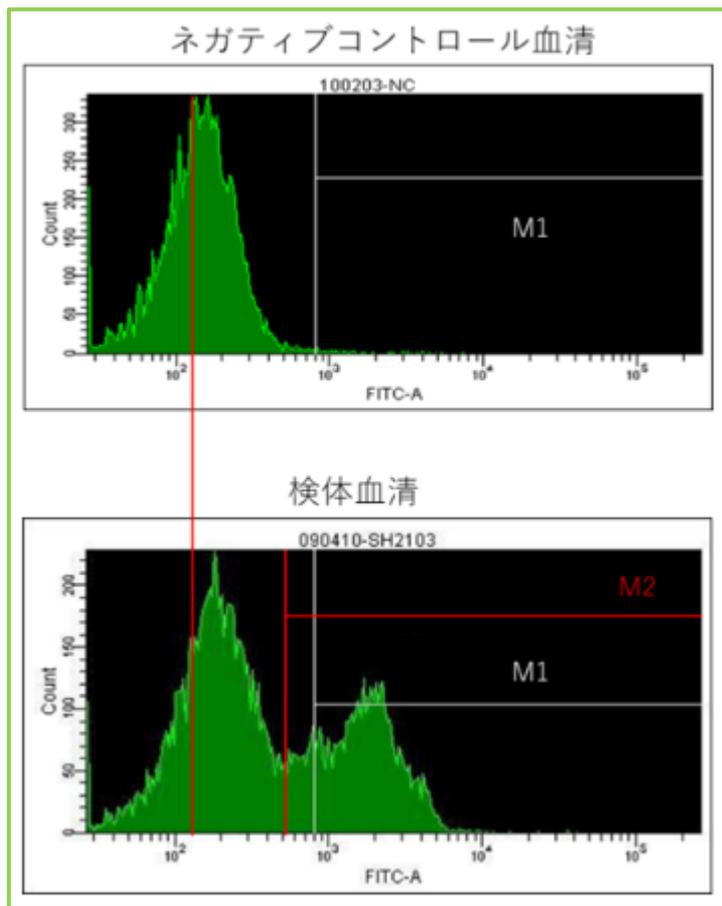
- 陽性コントロールが正確にタイピングされていること、陰性コントロールは蛍光値の高いビーズがないことの確認
- ビーズのカットオフ値を変更する際はビーズに結合しているプローブを必ず確認

陰性コントロールはRaw Dataが高いビーズがないことの確認



Bead ID	Rxn	Raw	Normal	Pos Ctl	PC Raw	NC	NC Raw	OLI Cutoff	Sample Cutoff	Luminex Bead Count
0001	1	50	1	0032	6084	0035	14	15	15	173
0002	1	232	3	0513	6317	0035	14	15	15	312
0003	1	142	2	0032	6084	0035	14	15	15	550
0004	1	154	2	0032	6084	0035	14	15	15	678
0005	1	143	2	0032	6084	0035	14	15	15	969
0006	1	230	3	0513	6317	0035	14	15	15	828
0007	1	14	0	0032	6084	0035	14	15	15	221
0008	1	213	3	0032	6084	0035	14	15	15	237
0009	1	41	0	0032	6084	0035	14	15	15	179
0010	1	168	2	0513	6317	0035	14	15	15	70
0011	1	35	0	0032	6084	0035	14	15	15	821

# FlowPRA



検体血清のネガティブピークがはっきり分かる場合、NC 血清で設定したM1をそのまま用いるのではなく、M2を再設定して%PRA を求める

- One LambdaのNC血清を使用
- 検査成立基準の確認

Position / Sample	Min BeadCnt	NC	PC	PCNCRatio
1(1,A1) Unknown1	100	75.78	11897.81	157.005
2(1,B1) Unknown2	100	25.98	14107.37	543.009
3(1,C1) Unknown3	100	24.25	15525.61	640.231
4(1,D1) Unknown4	100	0.73	14333.48	19634.9

- MinBead Cnt : 50以上
- NC : 1500以下
- PC : 500以上
- PC/NC Ratio : 2以上

- Single AntigenのDP及びDQのビーズには2種類のHLA抗原が貼りついているため、ビーズの反応が $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のどちらによる反応であるかを判断することが必要
- 患者とドナーのタイピング結果も活用しDSAの産生を見逃さないようにする

# 動画の紹介

- <https://www.veritastk.co.jp/sciencelibrary/learning/hla-video-compilation.html>
  - 抗体検査のいろは
  - マイクロSSPのいろは

HLA 講習会「抗体検査のいろは」  
vol.1 LABScreen 試薬とは



名称	ウェル数	試薬
LABScreen システム	100ウェル (10 × 10)	ExFlowは使用不可
LABScan システム	500ウェル (10 × 10 × 5)	全て使用可能

VERITAS 2021. Sep

HLA 講習会「マイクロ SSP のいろは」  
Vol.1 HLA とは～手技のポイント



Points of the procedure

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。



# 參考資料

# 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/)

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
<input type="text"/>							
▼		▼		▼		▼	

- 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)

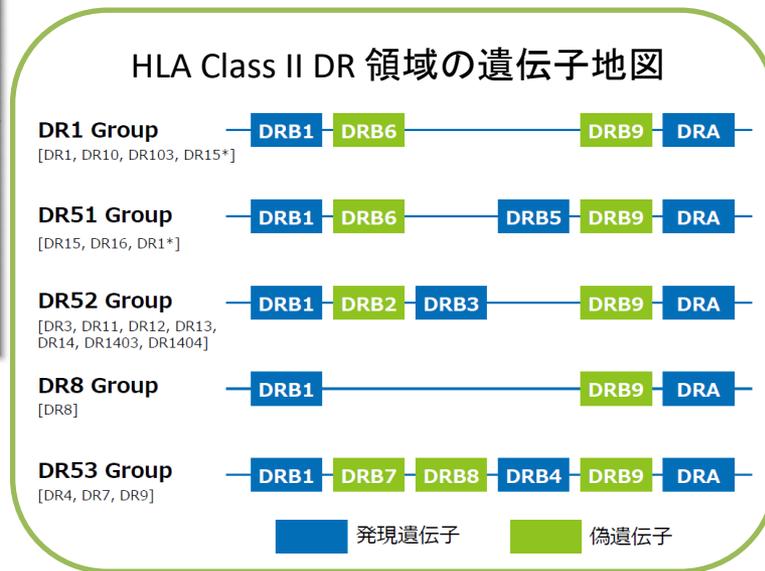
## ドナー登録者のハプロタイプ頻度 (A-B-C-DRB1)

- 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)

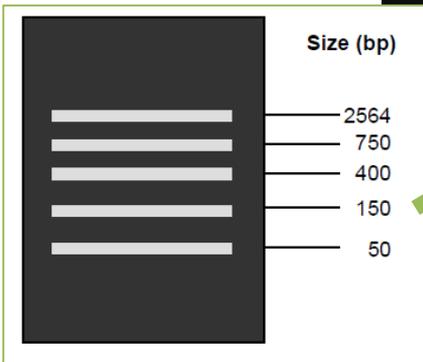
		DQB1										DRB1										
		DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*06:01	DQB1*06:02	DQB1*06:04	DQB1*06:09	DQB1*02:01	DQB1*02:02	DQB1*03:01	DQB1*03:02	DQB1*03:03	DQB1*04:01	DQB1*04:02							
DRB1	DQA1																					
	DRB345	DQA1*01:01	DQA1*01:02	DQA1*01:04	DQA1*01:03	DQA1*01:02	DQA1*05:01	DQA1*02:01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

(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

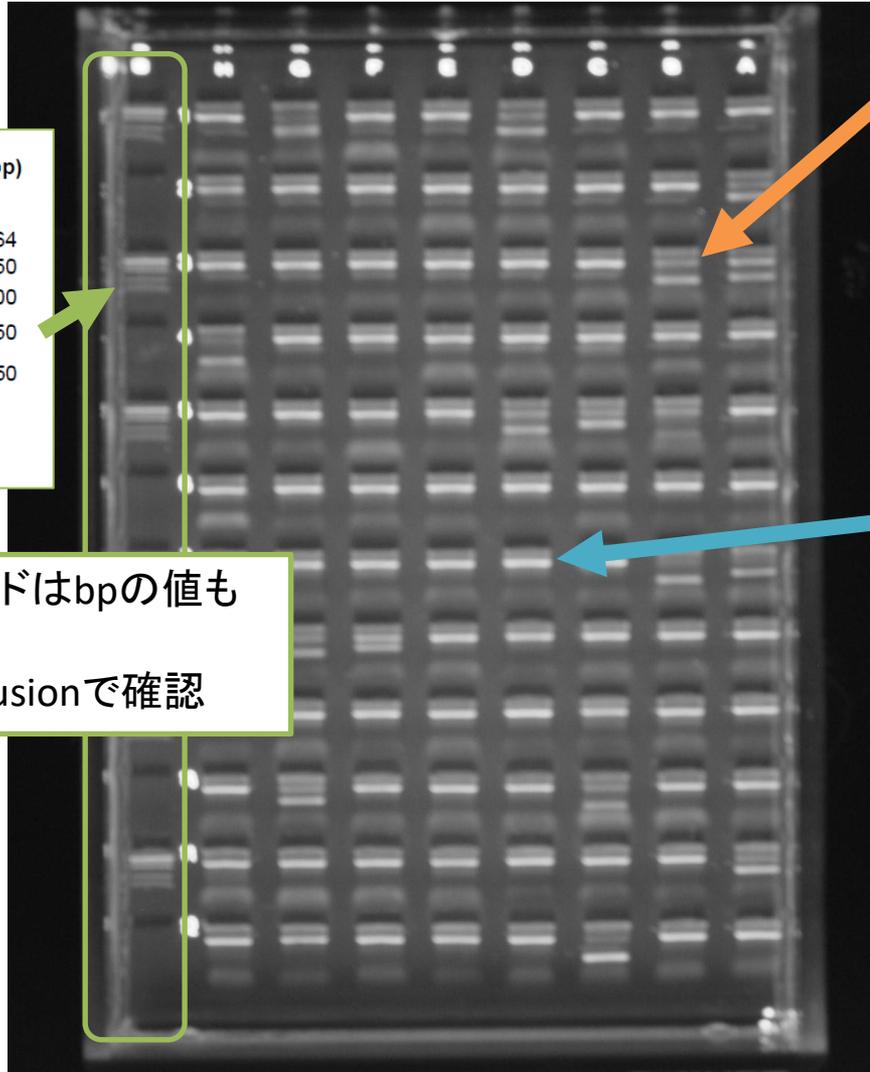


# マイクロSSP ゲルの見方

## サイズマーカー



判定に困るバンドはbpの値も参考にする  
bpの値はHLA Fusionで確認



## 陽性ウェル

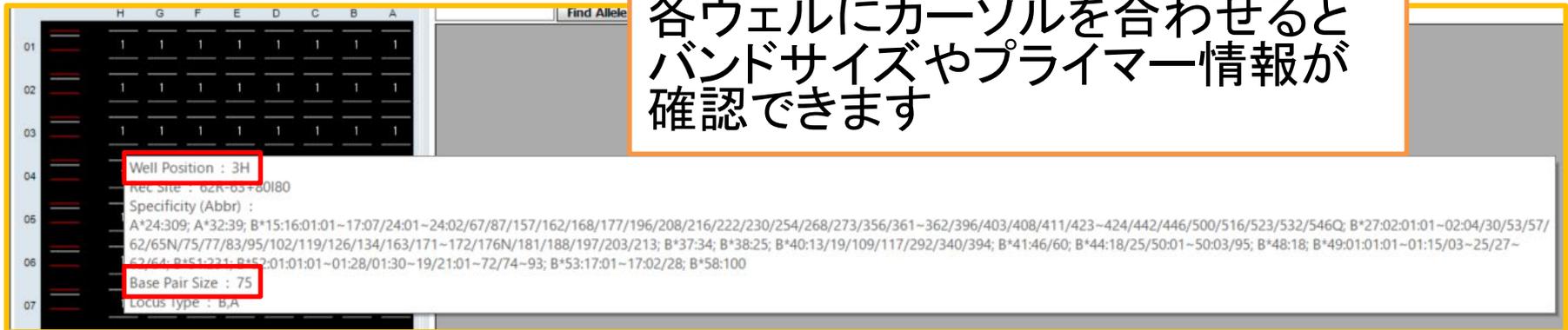
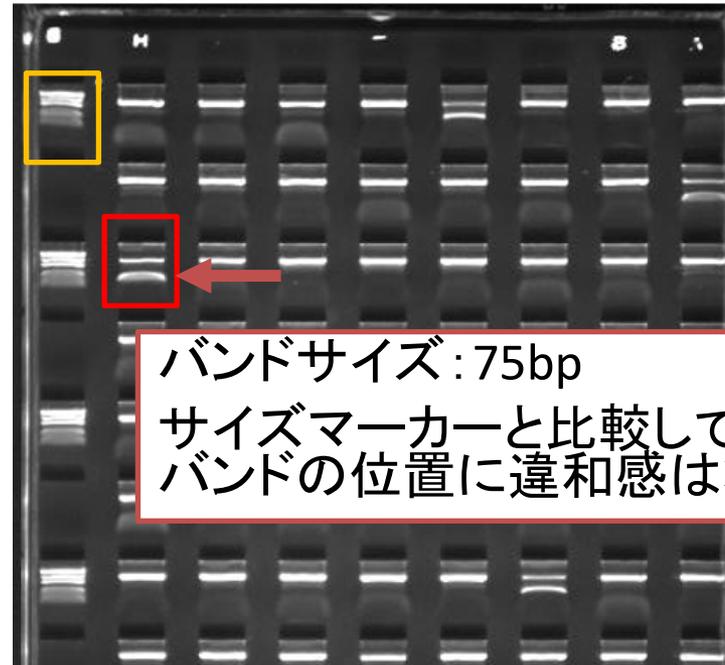
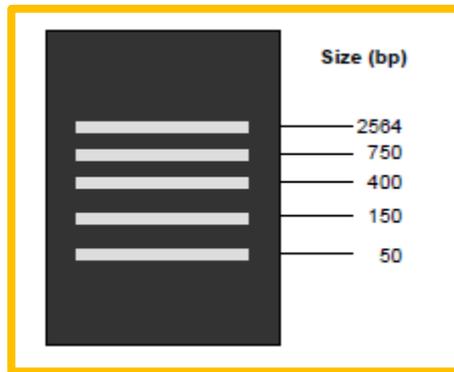
- コントロールバンドよりも下にアレルバンドがある

## 陰性ウェル

- コントロールバンドのみ

# マイクロSSP バンドサイズの確認

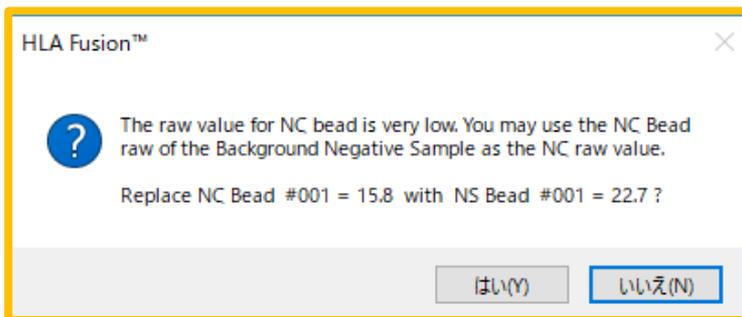
各ウェルにカーソルを合わせると  
バンドサイズやプライマー情報が  
確認できます

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 : 75bp  
サイズマーカーと比較しても  
バンドの位置に違和感はない

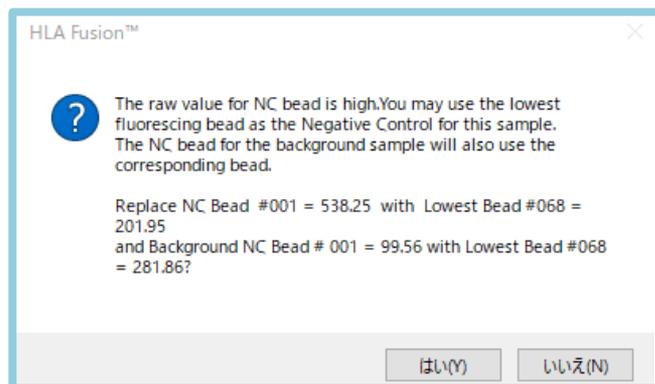
# LABScreen インポート時のメッセージ



\* 検体のNCビーズが、NC血清のNCビーズより低い時に表示されます

検体のNCビーズの値をNC血清のNCビーズの値と書き換えますか？

→「いいえ」を選択

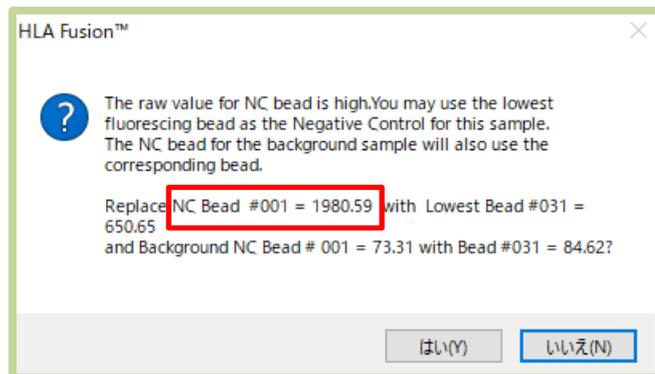


\* 検体のNCビーズが他のビーズより高い時に表示されます

検体のNCビーズの値が高いので、検体の一番低いビーズの値と書き換えますか？

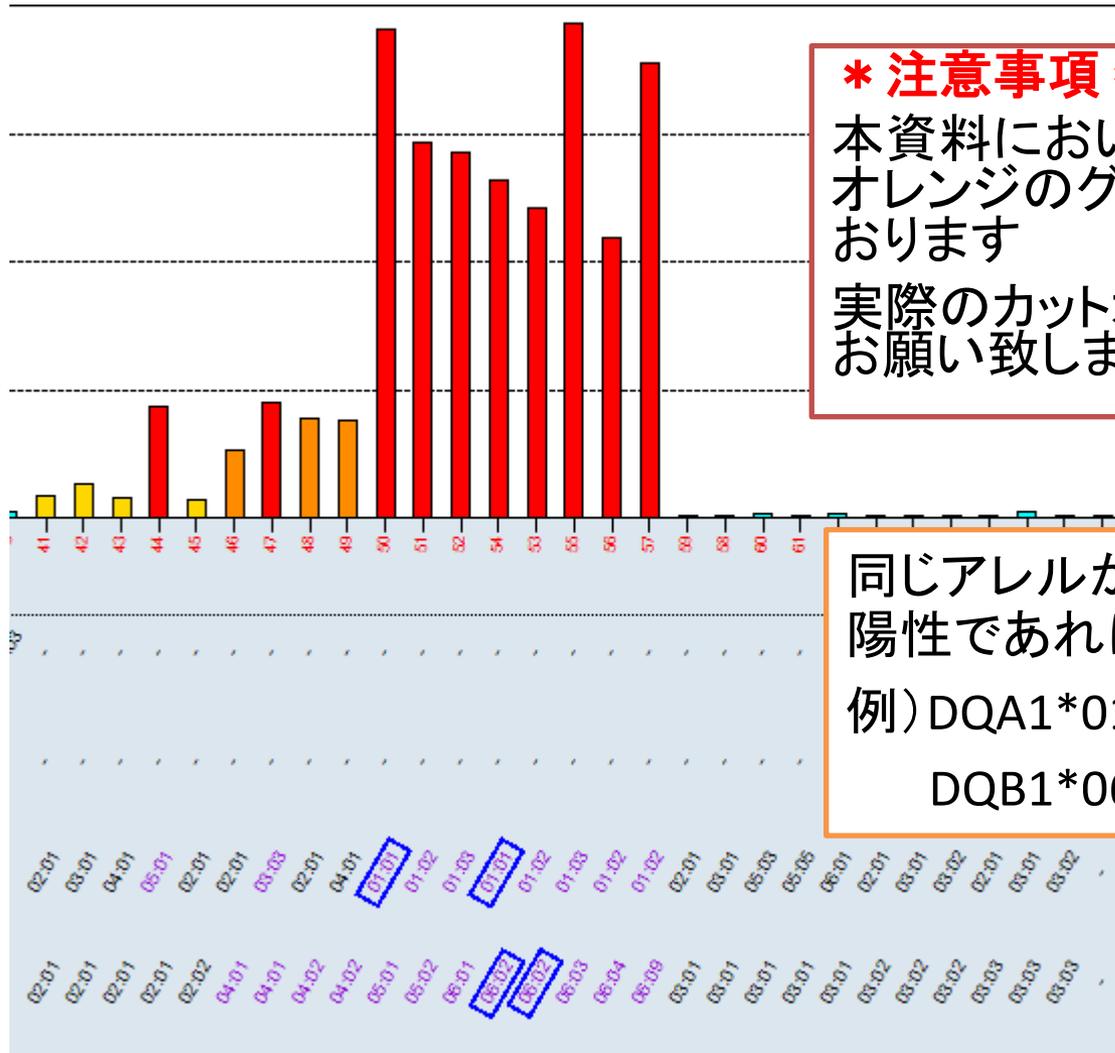
それに伴って、NC血清のNCビーズも変更しますか？

→「いいえ」を選択



検体のNCビーズ値が1500を超えている場合は再検査をしてください

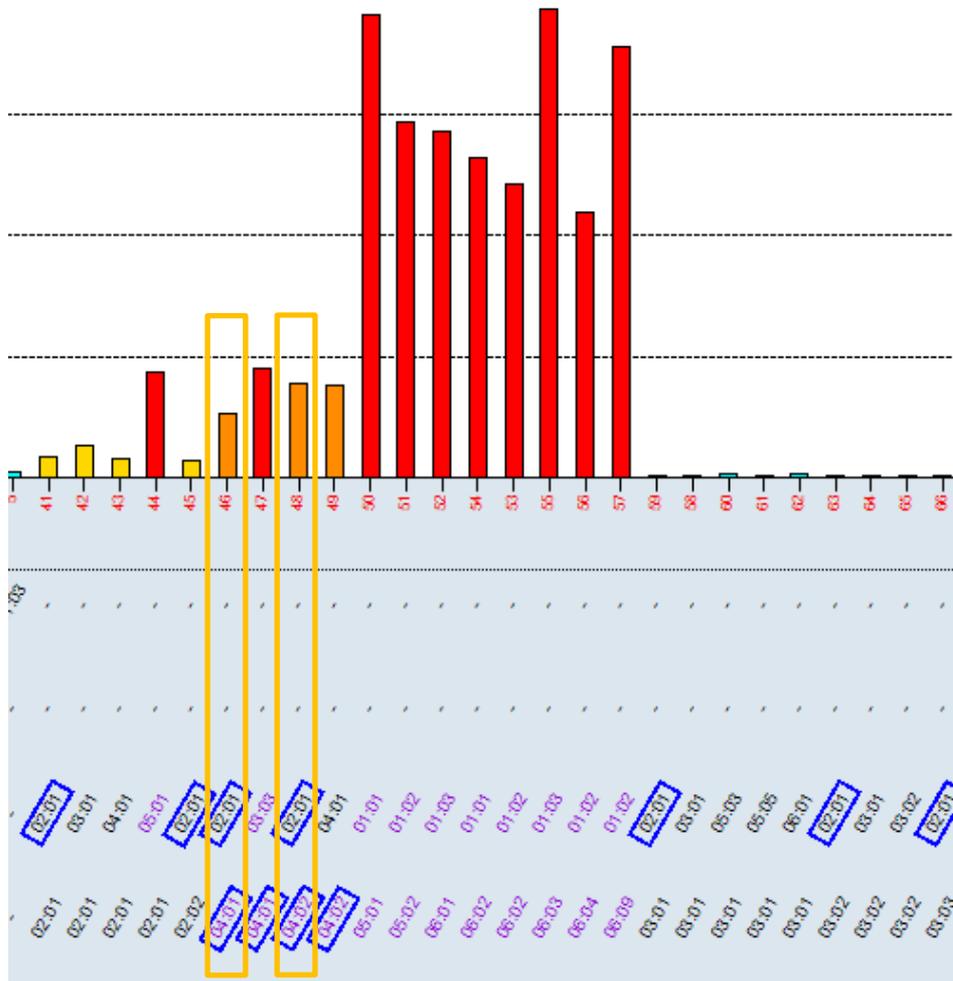
# Single Antigen クラス2の解析例-1



**\* 注意事項 \***  
 本資料においては、簡易的にx6以上(赤とオレンジのグラフ)を陽性と仮定し説明しております  
 実際のカットオフ値は各施設様でご検討をお願い致します

同じアレルが結合している全てのビーズが陽性であれば当該アレルは陽性と判定  
 例) DQA1\*01:01(50,54番ビーズ)  
 DQB1\*06:02(53,54番ビーズ)

# Single Antigen クラス2の解析例-2



同じアレルが結合しているビーズが陽性と陰性が混在する場合  
 DQA1\*02:01を例に説明します  
 DQA1\*02:01が結合しているビーズが7個ありますが、陰性のビーズがあるのでDQA1\*02:01は陰性です

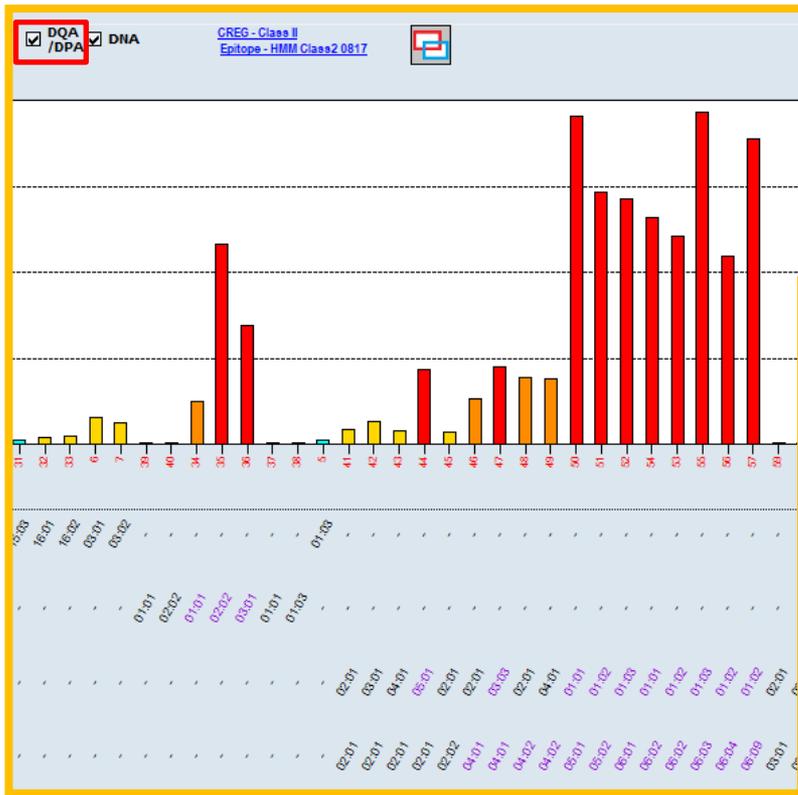
46と48番ビーズはなぜ陽性なのか？  
 →ビーズ構成を確認します

ビーズ番号	DQA1	DQB1
46	02:01	04:01
48	02:01	04:02

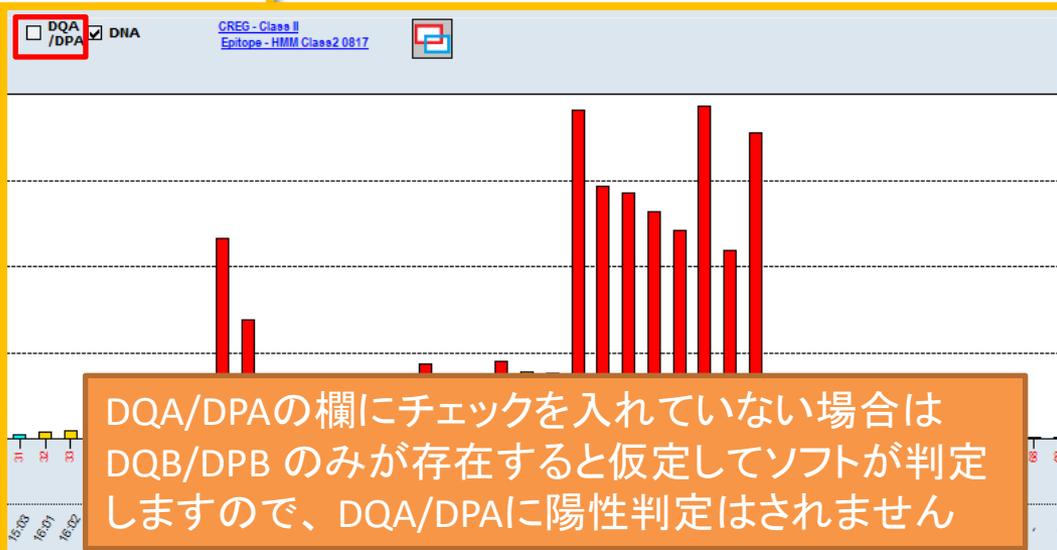
DQB1\*04:01は47番ビーズにも結合  
 →47番は陽性= DQB1\*04:01は陽性  
 DQB1\*04:02は49番ビーズにも結合  
 →49番は陽性= DQB1\*04:02は陽性

上記より46と48番ビーズはDQB1抗体による陽性反応であるため、DQA1\*02:01は陰性と判定ができます

# Single Antigen クラス2の解析例-3

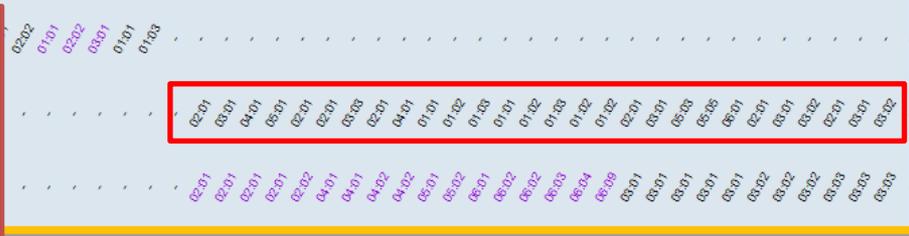


DQA/DPAの欄にチェックを入れた場合は、DQAの反応も考慮してソフトが自動判定を行います  
ソフトが陽性と判定したアレルは紫色で表示されます



DQA/DPAの欄にチェックを入れていない場合はDQB/DPBのみが存在すると仮定してソフトが判定しますので、DQA/DPAに陽性判定はされません

**\* 注意事項 \***  
ソフトの自動判定の結果をそのまま採用せず、前ページで説明した手順に沿ってご自身で判定をお願い致します



# 検体の前処理の意義

- NCBீーズ
  - NBG RatioやnMFIの値の算出に使用されるため、できるだけ低くすることが大切
  - 抗HLA抗体以外の物質の影響で高くなる
- PCBீーズ
  - 低い場合は、本来存在する抗HLA抗体がBீーズに結合していない可能性(偽陰性)がある
  - 補体活性が高いことやIgMが含まれることが原因で低くなる

方法(赤字は実施を推奨)	目的	結果に与える影響
凍結融解、Adsorb Out、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCBீーズの値を下げる
EDTA	補体活性型抗体の影響を取り除く	PCBீーズの値を上げる
DTT	IgMの影響を取り除く	PCBீーズの値を上げる