

NGS法を含めたHLAタイピング技術の比較とNGS法のグローバル状況調査

○横沢 佑弥¹、小林 貴弘¹、益尾 清恵¹、奥平 裕子²、梶屋 安里²、朝治 桜子²、猪子 英俊²

1. 株式会社ベリタス 2. ジェノダイブファーマ株式会社



1. 目的

HLAのDNAタイピングはSSP法を始め、SSO法、SBT法などが利用されている。そのような中、昨今では次世代シーケンサー(NGS)を用いたHLAタイピング試薬が新たな手法として認知され始めている。そこで本研究では現在日本市場で利用されている手法を様々な観点から比較することで、DNAタイピング検査の手法選択に関して検討しやすい情報を提供することを目的とした。

更にNGS法は日本でも数施設で実施されつつあるが、日本における今後の方向性を探る一助として諸外国でNGS法がどのように利用されているかも調査した。

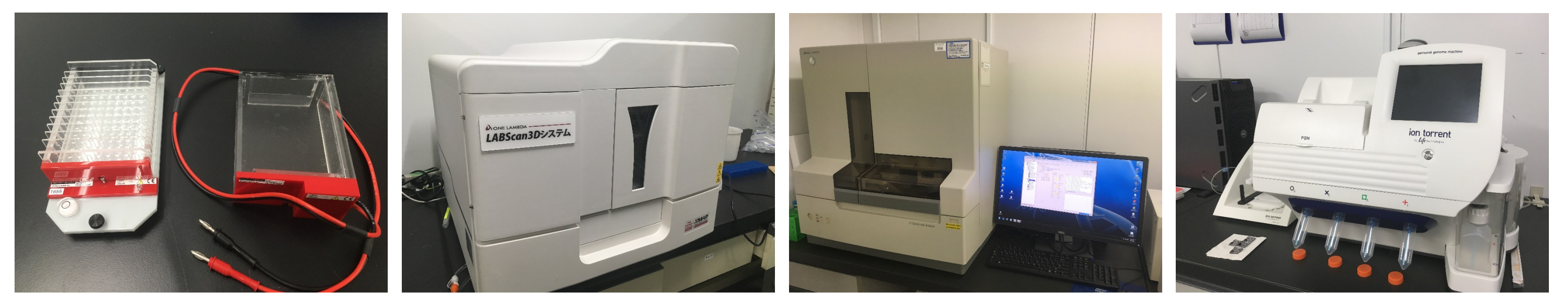
2. 方法

日本組織適合性学会QCWS検体を含めた対象検体を用いて、試薬及び消耗品コスト、ハンズオンタイム、結果を得るまでに要する時間、解像度(Ambiguity数)を比較した。NGS法の諸外国での状況はASHI(アメリカ組織適合性学会)などを通じて調査した。

● 検討条件

- I. 検体数: 8検体
- II. 対象ローカス: A, B, DR
- III. 測定者: 各1名
- IV. 装置及び試薬(右表)
- V. 試薬及び消耗品コスト計算はメーカー希望小売価格を使用

手法	試薬	器具・機器
SSP法	MicroSSP ABC/DRDQ JPN (One Lambda)	Micro SSP専用ゲル電気泳動装置
RSSO法	LABType CWD, LABType XR(One Lambda)	LABScan3Dシステム
SBT法	SeCore SBT(One Lambda)	ABI 3130xl Generic Analyzer
NGS法	NXType (One Lambda)	Ion PGM



3. 結果

● コスト

	試薬	周辺試薬	消耗品	コスト/ローカス	備考1 キット検体数	備考2
MicroSSP	3,133	-	-	3,133	10	キットはDP/DQ含めた6ローカス 消耗品は低コストなので考慮せず
LABType CWD	5,430	102	15	5,547	100	キットはローカス毎に価格が異なる のでその平均値を用いた
LABType XR	7,206	102	15	7,324	100	
SeCore SBT	9,093	30	221	9,344	25	
NXType	2,813	1,417		4,230	96	キットはClass I、II(計9ローカス) コスト/ローカスは9ローカスで算出

- ローカスあたりのコストで換算した場合に最もCost effectiveであったのはSSP法で、その次がNGSであった。ただしNGSの場合にはそのアッセイの特性上、1回あたりの検体数に大きく影響する事がわかった。

● ハンズオンタイム及び結果を得るまでに要する時間

	ハンズオンタイム	結果までの時間	備考
MicroSSP	40 min.	2.5 hours	左は2検体を実施
LABType	120 min.	4 hours	LABType及びNGSの場合は検体数が 増加してもハンズオンタイムはそれほ ど変化なし
SeCore	180 min.	16 hours	
NXType	720 min.	2.5 days	

- 現段階ではNGSは圧倒的にハンズオンタイム及び結果までの時間がかかる事がわかった。ただし検体数及びローカス数を同レベルにした場合には、状況が変わるのでその部分も考慮する必要がある。

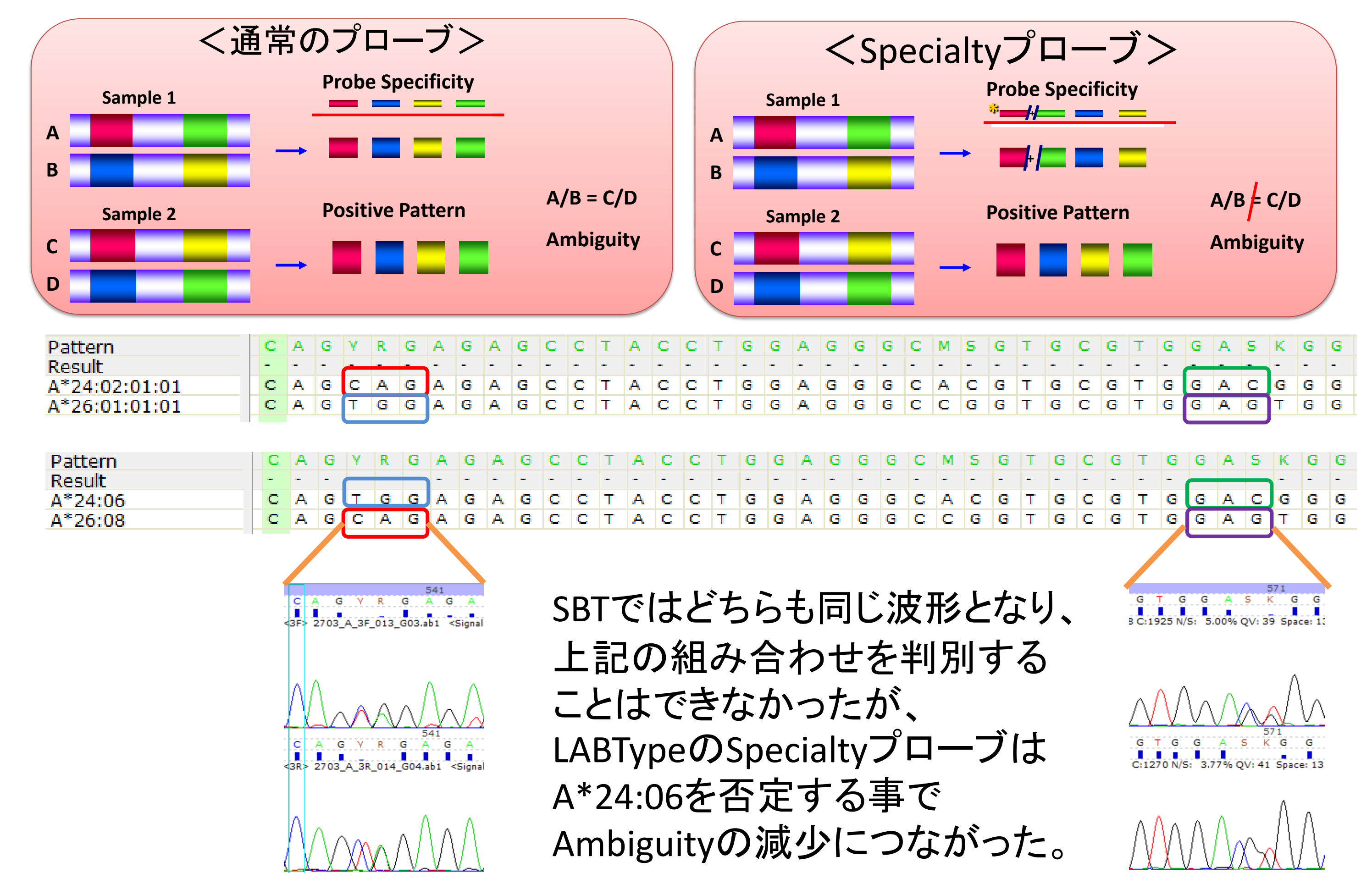
● 解像度(4桁レベルでのAmbiguity数の比較)(Allele 1, Allele 2の数)

データ解析後にIMGT/HLA 3.23.0(Jan. 2016)を対象にしてAmbiguityの数を4桁レベルで比較した。なお、橙色で示した部分は2桁でAmbiguityが存在していたものを示している。

		2601	2602	2603	2604	2701	2702	2703	2704								
A	MSSP	113	98	592	303	237	303	303	104	592	214	214	303	216	113	595	595
	CWD	43	41	9	2	97	2	129	1	16	5	92	133	129	15	-	-
	XR	4	3	1	1	5	1	7	1	1	1	6	4	7	1	7	2
	SeCore	4	3	2	2	2	2	1	1	2	3	11	12	15	15	2	2
B	NXType	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MSSP	75	42	41	6	132	89	138	32	38	16	32	32	149	46	28	37
	CWD	34	23	25	2	61	18	55	22	7	7	18	18	3	32	10	16
	XR	8	2	2	1	2	1	5	8	2	1	2	3	1	2	2	7
DRB1	SeCore	8	6	2	2	15	15	6	5	2	2	1	1	1	1	3	3
	NXType	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MSSP	59	22	88	22	143	108	7	108	88	30	88	93	49	22	54	108
	CWD	8	11	8	11	23	7	1	5	1	5	8	1	8	11	20	6
DRB1	XR	3	3	1	3	10	2	1	1	1	4	1	1	3	3	8	2
	SeCore			3	4	4	4	1	1	2	1	1	1	1	2	5	5
	NXType	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1

● RSSO vs SBT (Phase Ambiguityの観点から)(2702 A のケース)

RSSOのSpecialty Probe技術により通常のSBT法では解決できないPhase Ambiguityが解決できた例



● 解像度(8桁レベルでのAmbiguity数の比較)(組合せ候補数)

		2601	2602	2603	2604	2701	2702	2703	2704
A	CWD	2338	32	267	192	180	26505	4394-	
	XR	359	8	41	66	25	3340	594	29
	SBT	10	3	6	6	13	24	31	4
	NGS	1	1(New)	1(New)	1	1	1	1	1
B	CWD	1855	111	1860	3060	120	336	134	589
	XR	338	26	260	719	30	63	15	242
	SBT	8	3	43	22	1	3	2	14
	NGS	1	1	1	1	1	1	1	1
DRB1	CWD	161	217	396	22	18	30	161	435
	XR	42	54	143	14	15	16	42	164
	SBT		4	9	4	3	2	2	6
	NGS	2	2	1	1	2(New)	1	2	1

4. 考察

コスト及び解像度などを総合的にパフォーマンスが高いと思われたのはLABType XR(SSO法)であった。NXType(NGS法)はコスト高の印象が強いが、実際には他法と比較すると検体数によっては割安であり、多くのアプリケーションに対しての多くの可能性を考慮すると今後の動きに注目すべきである。なお、ASHIではNGS法による演題も多く、特に自動化、解析ソフト、Quality Controlなどが臨床へ使用する際のポイントになると思われた。

諸外国のNGS法の利用に関しては、各国の骨髄バンクがドナー登録を中心にNGSに動いている。NMDP(アメリカ)、NHSBT(イギリス)は既に開始されており、ABMDR(オーストラリア)などがその方針となっている。NGSは新技術であり、その操作が煩雑である事が指摘されていたが、各社Library Preparation部分をBiomek等で自動化し、Template作製部分は自社で開発している傾向であった。昨年まではルーチン検査に導入することが困難な状況ではあったが、既にルーチン検査として使用できるレベルに達してきている。



- 今回の検討においてはSSP法は最も国内で利用されているMicroSSP JPNを使用した事もあり、4桁のAmbiguityでは圧倒的に数が多くなった。
- プローブを用いるRSSO法であってもLABTypeに含まれるSpecialty Probeの存在により、SBT法では区別できないようなAmbiguityを解決することで解像度を上げる事が出来る事がわかった。
- 全領域をカバーしているNXType(Class I)ではAmbiguityは認められなかったが、Exon2-3をカバーしているNXType(Class II)ではExon 4に多型がある3検体/8検体においてAmbiguityが認められた。