

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

(第25回 日本組織適合性学会大会 ポスター演題P7-2改変)

○横沢 佑弥¹、小林 貴弘¹、益尾 清恵¹、奥平 裕子²、柵屋 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Sequence Specific Primer (SSP)法を始め、Sequence Specific Oligonucleotide (SSO)法、Sequencing Based Typing (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 (Next Generation Sequencing: 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。本研究ではDNAタイピング検査における手法選択の参考になるよう、現在日本市場で利用されているDNAタイピング手法を様々な観点から比較した。

2. 方法

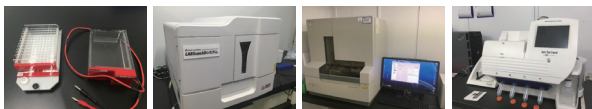
各手法の試薬及び消耗品コスト、ハンズオンタイム、結果を得るまでに要する時間、解像度 (Ambiguity数)を比較した。検体は日本組織適合性学会QCワークショップで配布されたものを用いた。なお諸外国でのNGS法の利用状況は、ASHI (アメリカ組織適合性学会)などを通じて調査した。

● 検討条件

- I. 検体数: 8検体
- II. 対象ローカス: A, B, DRB1
- III. 測定者: 各1名
- IV. 装置及び試薬 (表1)
- 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

表1. 検討手法一覧

手法	試薬	器具・機器
SSP法	Micro SSP ABC/DRDQ JPN (One Lambda)	Micro SSP専用 ゲル電気泳動装置
SSO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

表2. ローカスあたりのタイピングコスト

	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
Micro SSP	3,760	-	-	3,760	10	キットは5ローカス (A, B, C, DRB1, DQ) タイピングする為、コスト計算は5ローカスで算出
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	7,207	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で計9ローカスタイピングする為、コスト計算は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低コストであったのはSSP法で、その次がNGS法であった。ただしNGS法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

表3. 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
Micro SSP	40 min.	2.5 hours	左は2検体を実施時の時間
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に大きな差は無かった
SeCore	180 min.	16 hours	
NXType	720 min.	2.5 days	

▶ 現段階ではNGS法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）

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。

表4. 4桁レベルでのAmbiguity数の比較 (アレル毎のAmbiguity数)

サンプル名		アレル1のAmbiguity																アレル2のAmbiguity															
サンプルID	2601	2602	2603	2604	2701	2702	2703	2704	2桁レベルでのAmbiguityが存在																								
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																
	NXType	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1																
B	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																
	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																
DRB1	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																
	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	2	1	1																	

MSSP=Micro SSP

▶SSP法は2桁タイピングで用いるMicro SSP JPNキットを使用したこともあり、4桁のAmbiguityでは圧倒的に数が多くなった。

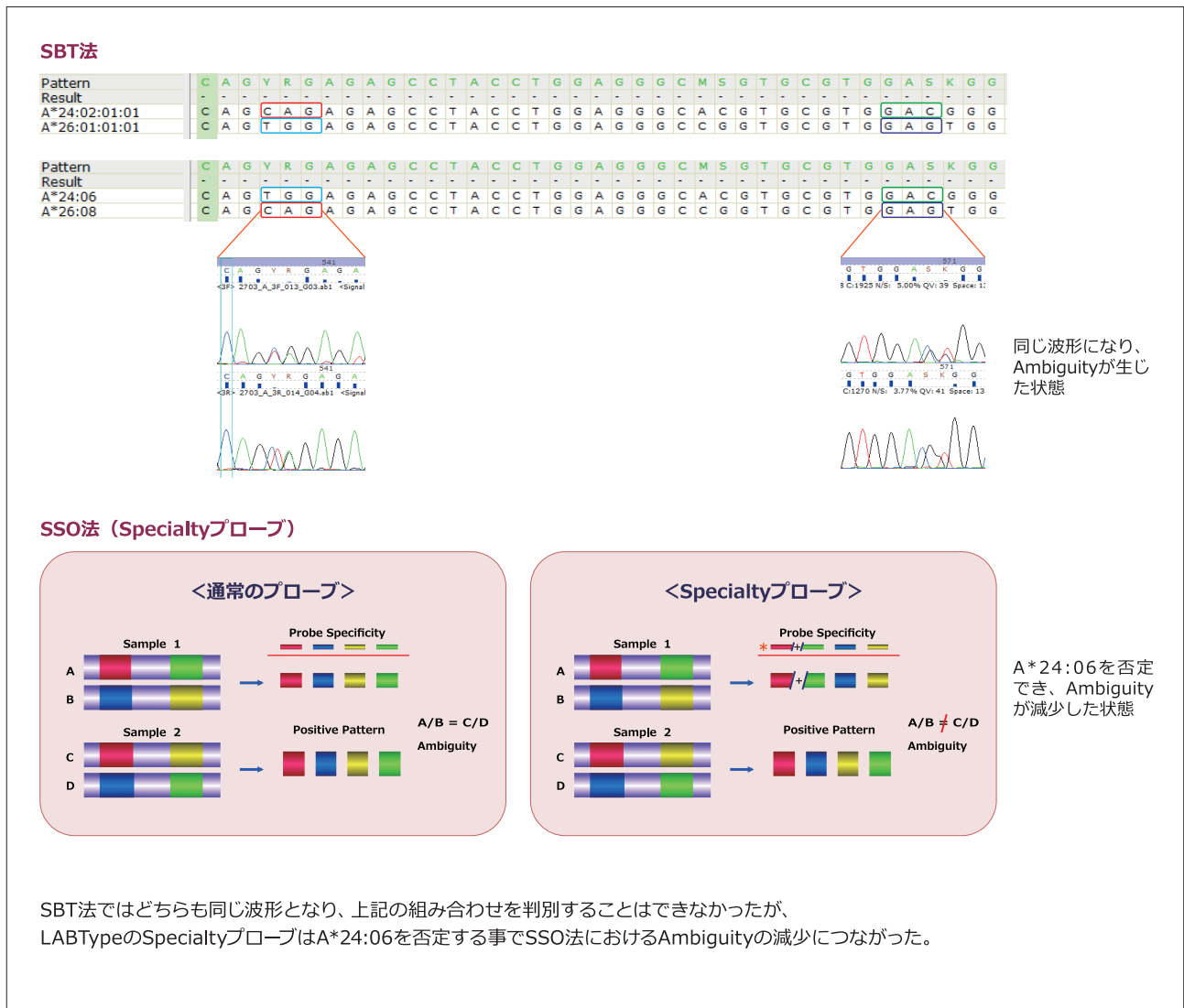
▶SSO法はLABTypeに含まれるSpecialty Probeの存在によりSBT法では区別できないようなAmbiguityを解決し、解像度が上がる事がわかった(図1)。

▶NGS法は全Exon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、Exon 2-3をカバーしているNXType(Class II)ではExon 4に多型がある3検体においてAmbiguityが認められた。

●SSO法 vs SBT法の比較

塩基配列の組み合わせによるAmbiguity(=Phase Ambiguity)の観点から、SSO法の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(表4-注1)を図1に示した。

図1. SSO法の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）

表5. 8桁レベルでのAmbiguity数の比較（組み合わせ候補数）

	サンプルID	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



Ion Chef



Ion S5

4.考察

今回の検討でコスト及び解像度などを比較し、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をすると検体数によっては割安である。さらに、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、昨今の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。

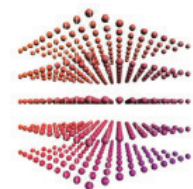
諸外国における主なNGS法の活用は、骨髄バンクによるドナー登録が挙げられる。NMDP(アメリカ)、NHSBT(イギリス)では既にNGS法での運用が開始されており、ABMDR(オーストラリア)などがその方針となっている。また、NGS法は操作が煩雑である事が指摘されていたが、メーカー側で自動化に向けた開発を進め、煩雑さを改善する動きが進んでいる。具体的にはライブラリー調製部分をBiomek(ベックマン・コールター社)等で自動化し、テンプレート作製部分は自社で開発している傾向であった。

昨年まではNGS法をルーチン検査に導入することは困難な状況であったが、世界的にNGS法の活用や自動化が進められており、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と考えられる。

関連製品 紹介1:

HLA-DNAタイピングキット LABType CWD/XR

LABType CWD/XRは「LABScan 3Dシステム」専用のHLA-DNAタイピングキットです。500色の蛍光ビーズを使用し、従来法よりさらに高解像度でアンビグイティが非常に少ないタイピング結果が得られます。



LABType CWD

CWD (Common and Well-Documented) アリルをアンビグイティ無くタイピングする為にデザインされた試薬です。CWDアリルとは、14万件のSBTデータとハプロタイプ頻度から決定された415アリル (Common)、記録に基づいた707アリル (Well-Documented) の合計1,122アリルです*。

*Common and Well-Documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. Tissue Antigens, 2013, 81, 194-203

LABType XR

LABType CWDでは解決できない、さらにレアなアリルのアンビグイティまで解消できるようにデザインされたキットです。Luminex試薬で最も高解像度であり、SBT試薬に匹敵します。

LABType製品のプローブ数比較

プローブ数は製品ロットにより変更される場合があります。

LABType 製品		XR	CWD	HD	SSO
Locus	A	1308	316	1081	79
	B	1301	346	1111	100
	C	1064	206	957	61
	DRB1	482	213	448	71
	DQB1/DQA1	—	—	—	93
	DPB1/DPA1	—	—	—	100
測定機器	LABScan 3D システム	○	○	○	○
	LABScan システム	×	×	○	○

関連製品 紹介2:

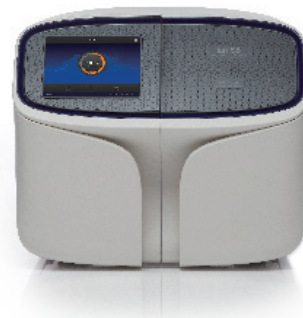
HLA-DNAタイピングキット NXType NGS

NXType NGS は、次世代シーケンサーの技術を使用し、HLA-A, B, C, DPB1, DQB1, DRB1, DRB345, DPA1, DQA1 遺伝子を非常に高解像度にタイピングする為の試薬です。

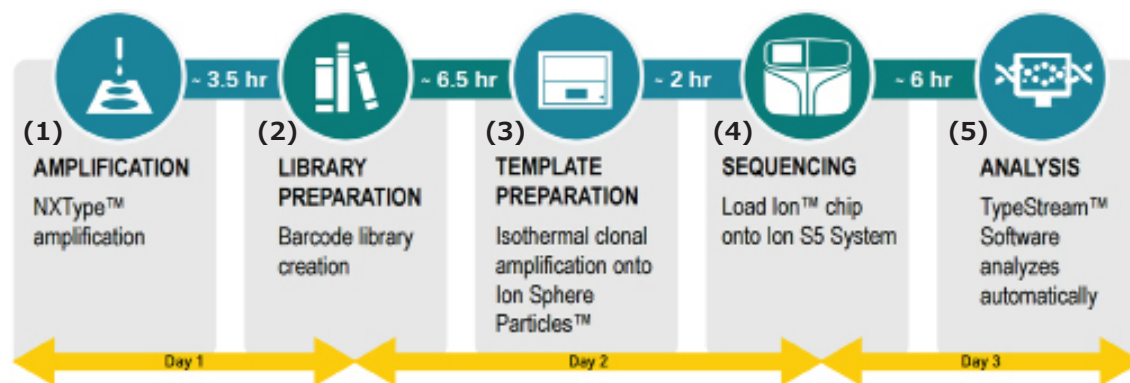
マルチプレックスPCRにより、NXType Class IではHLA-A, B, Cを、NXType Class IIではHLA-DRB1, DRB345, DPB1, DQB1を同時に増幅させることが可能なため、より効率的な試薬調製が可能です。

特長

- マルチプレックスPCR法を採用し、より効率的なワークフローを実現
- Long range PCRにより、5'-UTRから3'-UTRまでをカバー (Class I)
- 次世代シーケンサー Ion S5対応
- 測定終了後に専用解析ソフトTypeStreamが自動解析を開始
- サンプル調整～測定～解析まで最大96サンプルをわずか2.5日間でタイピング可能
- Ion Chefによるテンプレート調製の自動化にも対応



操作の流れ



増幅可能な遺伝子領域

商品名	遺伝子増幅領域
NXType NGS Class I Typing Test	HLA-A, B, C : 全遺伝子領域
NXType NGS Class II Typing Test	HLA-DRB1, 3, 4, 5 : Exon 2-Intron 3 HLA-DQB1 : Exon 2 - Intron 3 HLA-DPB1 : Exon 2 - 3' UTR
NXType NGS Class II DQA1 Typing Test	HLA-DQA1 : 全遺伝子領域を増幅
NXType NGS Class II DPA1 Typing Test	HLA-DPA1 : 全遺伝子領域を増幅

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度
OLI-NXT1ABCX	NXType NGS Class I A,B,C Typing Test	96 tests	冷凍 (-20℃)
OLI-NXT2RQP1X	NXType NGS Class II DRB1, DQB1, DPB1, DRB 3,4,5 Typing Kit	96 tests	冷凍 (-20℃)
OLI-NXT2QA1X	NXType NGS Class II DQA1 Typing Test	24 tests	冷凍 (-20℃)
OLI-NXT2PA1X	NXType NGS Class II DPA1 Typing Test	24 tests	冷凍 (-20℃)

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14
住友東新橋ビル3号館5階
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076
E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<http://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレーサーは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の理解を得てお届けしています。
ご質問・ご意見は(株)ベリタス技術グループ (TEL: 03-5776-0040 E-Mail: techservice@veritastk.co.jp)までお願い致します。