(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第5172657号
(P5172657)
(45)発行日 平成25年3月27日(2013.3.27)　(24)登録日 平成25年1月11日(2013.1.11)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N 15/09	(2006.01)		C12N	15/00	ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)		C12N	5/00	101
C12P 21/02	(2006.01)		C12P	21/02	C
G01N 33/53	(2006.01)		G01N	33/53	N
G01N 33/543	(2006.01)		G01N	33/543	597

請求項の数 31　(全 20 頁)

(21)出願番号　特願2008-506252(P2008-506252)
(86)(22)出願日　平成19年3月13日(2007.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/JP2007/054986
(87)国際公開番号　WO2007/108368
(87)国際公開日　平成19年9月27日(2007.9.27)
審査請求日　平成22年3月3日(2010.3.3)
(31)優先権主張番号　特願2006-81236(P2006-81236)
(32)優先日　平成18年3月23日(2006.3.23)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000231729
日本赤十字社
東京都港区芝大門１丁目１番３号
(73)特許権者　000250100
湧永製薬株式会社
大阪府大阪市淀川区宮原４丁目５番３６号
(74)代理人　100075812
弁理士　吉武　賢次
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野　昭男
(74)代理人　100107342
弁理士　横田　修孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】顆粒球抗体の検出に用いられるパネル細胞

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ＨＮＡ抗体を検出するためのパネル細胞であって、
前記抗ＨＮＡ抗体に対応するＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡを、検出操作に用いられる条件下において発現可能な形で細胞中に導入することにより得られるものであり、
前記ＤＮＡを導入する前の細胞がＫ５６２細胞である、パネル細胞。
【請求項２】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－１ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－１ａ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項３】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－１ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－１ｂ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項４】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－２ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－２ａ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項５】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－４ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－４ａ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項６】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－４ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－

４ｂ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項７】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－５ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－５ａ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項８】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－５ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－５ｂ抗原である、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項９】
前記ＤＮＡが細胞のゲノム中に組み込まれている、請求項１に記載のパネル細胞。
【請求項１０】
抗ＨＮＡ抗体を検出するためのパネル細胞を製造する方法であって、
Ｋ５６２細胞を用意する工程、および
前記抗ＨＮＡ抗体に対応するＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡを、検出操作に用いられる条件下において発現可能な形で前記細胞中に導入する工程
を含んでなる、方法。
【請求項１１】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－１ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－１ａ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－１ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－１ｂ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－２ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－２ａ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－４ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－４ａ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－４ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－４ｂ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１６】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－５ａ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－５ａ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１７】
前記抗ＨＮＡ抗体が抗ＨＮＡ－５ｂ抗体であり、これに対応するＨＮＡ抗原がＨＮＡ－５ｂ抗原である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＤＮＡが細胞のゲノム中に組み込まれる、請求項１０に記載の方法。
【請求項１９】
被検サンプル中の抗ＨＮＡ抗体を検出する方法であって、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載のパネル細胞を用意する工程、および
（ｂ）被検サンプルに前記パネル細胞を接触させ、該パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合を検出する工程
を含んでなる、方法。
【請求項２０】
前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合が、フローサイトメトリーによって検出される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】

請求項１～９のいずれか一項に記載のパネル細胞を含んでなる、抗ＨＮＡ抗体を検出するための試薬。

【請求項２３】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項２２に記載の試薬。

【請求項２４】

被験体において抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患を検出するための方法であって、
（ａ）請求項１～９のいずれか一項に記載のパネル細胞を用意する工程、および
（ｂ）前記被験体からの血清サンプルに前記パネル細胞を接触させ、該パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合を検出する工程
を含んでなる、方法。

【請求項２５】

抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患が、同種免疫性新生児好中球減少症、造血幹細胞移植後同種免疫性好中球減少症、顆粒球輸血不応、輸血関連急性肺障害、原発性自己免疫性好中球減少症、二次性自己免疫性好中球減少症、および非溶血性輸血副作用からなる群から選択されるものである、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項２４に記載の方法。

【請求項２７】

前記パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合が、フローサイトメトリーによって検出される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２８】

請求項１～９のいずれか一項に記載のパネル細胞を含んでなる、抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患の診断用試薬。

【請求項２９】

抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患が、同種免疫性新生児好中球減少症、造血幹細胞移植後同種免疫性好中球減少症、顆粒球輸血不応、輸血関連急性肺障害、原発性自己免疫性好中球減少症、二次性自己免疫性好中球減少症、および非溶血性輸血副作用からなる群から選択されるものである、請求項２８に記載の診断用試薬。

【請求項３０】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項２８に記載の診断用試薬。

【請求項３１】

ＨＮＡ抗原を製造する方法であって、
請求項１～９のいずれか一項に記載のパネル細胞を培養する工程、および
培養物からＨＮＡ抗原を単離する工程
を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の参照】

【０００１】

本特許出願は、先に出願された日本国における特許出願である特願２００６－８１２３６号（出願日：２００６年3月２３日）に基づく優先権の主張を伴うものである。特願２００６－８１２３６号における全開示内容は、引用することにより本明細書の一部とされる。

【発明の背景】

【０００２】

発明の分野

本発明は、臨床検査の分野に関し、より詳細には、顆粒球（好中球）減少症や輸血副作用の原因の一つと考えられている血清中の顆粒球抗原に対する抗体（顆粒球抗体）を正確かつ迅速に検出する方法、および該方法に用いられるパネル細胞に関する。

【０００３】

背景技術

近年、様々な臨床状況において、顆粒球（好中球）抗体が関与している疾患が報告されている。同種抗体が関与する疾患として、同種免疫性新生児好中球減少症、造血幹細胞移植後同種免疫性好中球減少症、顆粒球輸血不応、輸血関連急性肺障害、非溶血性輸血副作用などがある。また、自己抗体が関与するものとして、原発性自己免疫性好中球減少症、二次性自己免疫性好中球減少症などがある。これらの疾患では、顆粒球抗体だけでなく、抗ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）抗体も混在している場合があり、両者を正確かつ迅速に判別・同定する検査方法が求められている。

【０００４】

顆粒球抗体検査では、通常、血中の顆粒球をパネル細胞（判定用細胞）として用いるフローサイトメーターにより顆粒球抗体を検出する方法（ＧＩＦＴ法）、顆粒球の凝集を指標とする方法（ＧＡＴ法）、血清とマウスモノクローナル抗体を顆粒球に反応させ、形成される抗原抗体複合物を測定する方法（ＭＡＩＧＡ法）、顆粒球（もしくは顆粒球抽出抗原）を固相化したプレートを用い、これに検体を反応させ、結合した抗体と抗ヒトＩｇＧ感作血球（もしくは感作ビーズ）との凝集を指標に判定する方法（ＭＰＨＡ法）、ＭＰＨＡ法における検出工程を標識抗体を用いて行なう方法（ＥＩＡ法）などが利用される。ヒト顆粒球を用いる方法では、測定ごとに血液提供者より採血し、得られた血液から顆粒球を分離してこれをパネル血球として用いるため、顆粒球抗体との反応性に個体差が生ずる。また、ヒト顆粒球をパネル細胞として用いる方法では、フローサイトメーター等による測定結果において高いバックグラウンドが示され、そのバックグラウンドの高さも用いる顆粒球個体によって異なるため、安定して正確な検査結果を得ることは困難である。よって、安定して正確な検査結果を得ることを可能とする顆粒球抗体検出用のパネル細胞株の開発が望まれている。

【０００５】

これまでに、国内外の研究者が、顆粒球抗体検出用のパネル細胞株の開発を試みている。Justus Liebig UniversityのJ.Buxらは、顆粒球抗原としてＨＮＡ－１ａ、ＨＮＡ－１ｂ、およびＨＮＡ－ＳＨをコードする遺伝子をＣＨＯ細胞（Chinese hamster ovary cell line）に導入することにより、これら抗原を発現するパネル細胞株を作製している（Blood, vol.93, No.1, 1999: pp357-362）。また、北海道赤十字血液センターの宮崎らは、ＨＮＡ－１ａおよびＨＮＡ－１ｂを発現するＣＨＯ細胞およびＣＯＳ－７細胞（African green monkey kidney cell line）（日本輸血学会雑誌 50、2、2004: pp297）、ならびにＨＮＡ－２ａを発現する２９３Ｔ細胞（Human kidney cell line）（日本輸血学会雑誌 51、2、2005: pp188）を作製している。

【発明の概要】

【０００６】

本発明者らは、抗ＨＬＡ抗体、抗ＨＮＡ抗体および健常者からの血清と反応しない細胞中に、ＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡを発現可能な形で組み込んだパネル細胞を用いることにより、血清中の顆粒球抗体を正確かつ迅速に検出しうることを見出した。本発明はこの知見に基づくものである。

【０００７】

従って、本発明の目的は、顆粒球抗体の正確かつ迅速な検出を可能とするパネル細胞を提供することにある。

【０００８】

そして、本発明によるパネル細胞は、抗ＨＮＡ抗体を検出するためのパネル細胞であって、前記抗ＨＮＡ抗体に対応するＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡを、検出操作に用いられる条件下において発現可能な形で細胞中に導入することにより得られるものであり、前記ＤＮＡを導入する前の細胞が、抗ＨＬＡ－ＡＢＣ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＱ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＰ抗体、抗ＨＮＡ－１抗体、抗ＨＮＡ－２ａ抗体、抗ＨＮＡ－３ａ抗体、抗ＨＮＡ－４抗体、抗ＨＮＡ－５抗体、および健常者からの血清との間で、検出操作によって検出可能な反応を示さないものである、パネル細胞である。

【０００９】

本発明によれば、顆粒球抗体の検出において、バックグラウンドが低く、安定して正確な検査結果を得ることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】細胞中にＨＮＡ遺伝子を導入するためのベクターの構造を示す図である。

【図２】ＫＹ－１ａ細胞およびＫＹ－１ｂ細胞におけるＨＮＡ発現を解析するためのフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図３】ＫＹ－１ａ細胞をパネル細胞として用いるフローサイトメトリーにより、ヒト血清中の抗ＨＮＡ抗体を検出した結果を示す図である。

【図４】ＫＹ－１ｂ細胞をパネル細胞として用いるフローサイトメトリーにより、ヒト血清中の抗ＨＮＡ抗体を検出した結果を示す図である。

【図５】ＫＹ－２ａ細胞におけるＨＮＡ発現を解析するためのフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図６】ＫＹ－２ａ細胞をパネル細胞として用いるフローサイトメトリーにより、ヒト血清中の抗ＨＮＡ抗体を検出した結果を示す図である。

【図７】ＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞におけるＨＮＡ発現を解析するためのフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図８】ＣＤ１１ａ遺伝子とＣＤ１１ｂ遺伝子の多形性を示す図である。

【図９】ＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞、ＫＹ－５ｂ細胞およびＫＹ－ｍｏｃｋ　ｐｎ細胞における導入遺伝子の発現を示す電気泳動写真である。

【図１０】ＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞、ＫＹ－５ｂ細胞およびＫＹ－ｍｏｃｋ　ｐｎ細胞におけるコントロール遺伝子（Ｇ３ＰＤＨ）の発現を示す電気泳動写真である。

【発明の具体的説明】

【００１１】

本発明において遺伝子導入の対象とする細胞は、抗ＨＬＡ－ＡＢＣ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＱ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＰ抗体、抗ＨＮＡ－１抗体、抗ＨＮＡ－２ａ抗体、抗ＨＮＡ－３ａ抗体、抗ＨＮＡ－４抗体、抗ＨＮＡ－５抗体、および健常者からの血清との間で、検出操作によって検出可能な反応を示さないものである。ここで、「検出操作によって検出可能な反応を示さない」とは、この細胞に対して抗ＨＮＡ抗体の検出に用いる手順を行なったときに、上記の各抗体または血清との間で全く反応しないか、または検出限界以下の反応を示すことを意味する。このような条件を満たす細胞は、抗ＨＮＡ抗体の検出に用いる手順に従って、上記の抗体および血清との反応性を調べることにより選択することができる。このような細胞は、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくは非接着性細胞から選択される。また、上記の条件を満たす細胞としては、骨髄性白血病細胞であるＫ５６２細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＣＬ－２４３、理研バイオリソースセンター細胞バンクにおけるＲＣＢ番号：ＲＣＢ００２７）が挙げられる。

【００１２】

本発明によるパネル細胞は、上記の細胞中に、検出対象の抗ＨＮＡ抗体に対応するＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡを、検出操作に用いられる条件下において発現可能な形で導入することによって作製される。

【００１３】

ヒト顆粒球抗原としては、抗ＨＮＡ－１ａ抗体、抗ＨＮＡ－１ｂ抗体、抗ＨＮＡ－１ＳＨ抗体、抗ＨＮＡ－２ａ抗体、抗ＨＮＡ－３ａ抗体、抗ＨＮＡ－４ａ抗体、および抗ＨＮＡ－５ａ抗体に対応して、ＨＮＡ－１ａ抗原、ＨＮＡ－１ｂ抗原、ＨＮＡ－１ＳＨ抗原、ＨＮＡ－２ａ抗原、ＨＮＡ－３ａ抗原、ＨＮＡ－４ａ抗原、およびＨＮＡ－５ａ抗原があり、検出の対象とする抗体に応じて選択される。また、ヒト顆粒球抗原として、抗ＨＮＡ－４ｂ抗体または抗ＨＮＡ－５ｂ抗体に対応するＨＮＡ－４ｂ抗原またはＨＮＡ－５ｂ抗原を用いることもできる。

【００１４】

本発明の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－１ａ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－１ａ抗原である。ＨＮＡ－１ａ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＨＮＡ－１ａ抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＨＮＡ－１ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号１で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号２で表されるアミノ酸配列をコードしている。ＨＮＡ－１ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号１中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００１５】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－１ｂ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－１ｂ抗原である。ＨＮＡ－１ｂ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＨＮＡ－１ｂ抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＨＮＡ－１ｂ抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号３で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号４で表されるアミノ酸配列をコードしている。ＨＮＡ－１ｂ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号３中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００１６】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－２ａ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－２ａ抗原である。ＨＮＡ－２ａ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＨＮＡ－２ａ抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＨＮＡ－２ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号５で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号６で表されるアミノ酸配列をコードしている。ＨＮＡ－２ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号５中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００１７】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－４ａ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－４ａ抗原である。ＨＮＡ－４ａ抗原はＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）抗原とＣＤ１８抗原との複合体であり、ＨＮＡ－４ａ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）抗原遺伝子およびＣＤ１８抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号７で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号８で表されるアミノ酸配列をコードしている。また、ＣＤ１８抗原遺伝子のｃＤＮＡのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１５および１６で表される。ＨＮＡ－４ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号７および配列番号１５中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００１８】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－４ｂ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－４ｂ抗原である。ＨＮＡ－４ｂ抗原はＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）抗原とＣＤ１８抗原との複合体であり、ＨＮＡ－４ｂ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）抗原遺伝子およびＣＤ１８抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号９で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号１０で表されるアミノ酸配列をコードしている。また、ＣＤ

１８抗原遺伝子のｃＤＮＡのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１５および１６で表される。ＨＮＡ－４ｂ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号９および配列番号１５中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００１９】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－５ａ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－５ａ抗原である。ＨＮＡ－５ａ抗原はＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）抗原とＣＤ１８抗原との複合体であり、ＨＮＡ－５ａ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）抗原遺伝子およびＣＤ１８抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号１１で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号１２で表されるアミノ酸配列をコードしている。また、ＣＤ１８抗原遺伝子のｃＤＮＡのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１５および１６で表される。ＨＮＡ－５ａ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号１１および配列番号１５中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００２０】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、検出対象の抗ＨＮＡ抗体は抗ＨＮＡ－５ｂ抗体とされ、これに対応するＨＮＡ抗原はＨＮＡ－５ｂ抗原である。ＨＮＡ－５ｂ抗原はＣＤ１１ａＯｎｄ（－）抗原とＣＤ１８抗原との複合体であり、ＨＮＡ－５ｂ抗原をコードするＤＮＡとしては、ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）抗原遺伝子およびＣＤ１８抗原遺伝子のゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを好適に用いることができる。ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）抗原遺伝子のｃＤＮＡとしては配列番号１３で表されるヌクレオチド配列を含むＤＮＡが挙げられ、該ＤＮＡは配列番号１４で表されるアミノ酸配列をコードしている。また、ＣＤ１８抗原遺伝子のｃＤＮＡのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号１５および１６で表される。ＨＮＡ－５ｂ抗原遺伝子のｃＤＮＡは、例えば、この抗原を発現する細胞から得られるｍＲＮＡを鋳型とし、配列番号１３および配列番号１５中の５’末端部分および３’末端部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いるＲＴ－ＰＣＲにより増幅することができる。

【００２１】

細胞中にＤＮＡを発現可能な形で導入する方法は、当技術分野において周知の標準的な技術に従って行なうことができる。例えば、細胞中で機能するプロモーターをもつベクターに目的のＤＮＡを組み込み、これにより得られた発現ベクターを用いて細胞を形質転換することができる。プロモーターとしては、構成的プロモーター、誘導性プロモーター等、いずれの種類のプロモーターを用いてもよく、例えば、哺乳動物細胞中で強力な活性を示すＣＭＶ（サイトメガロウイルス）プロモーターなどが好適に用いられる。ベクターとしては、細胞中で目的のＤＮＡを発現させうる様々な発現ベクターを用いることができる。本発明においては、特に、ＨＮＡ抗原をコードするＤＮＡは細胞のゲノム中に組み込まれることが好ましく、この目的のためには、アデノ随伴ウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターなどが好適に用いられる。例えば、前記ＤＮＡの下流にＩＲＥＳ遺伝子をはさんで薬剤耐性遺伝子（例えばピューロマイシン耐性遺伝子）をつないだフラグメントをレトロウイルスベクターに組み込み、同ベクターを組換えウイルスの形で細胞に感染させることによって、該細胞中に前記ＤＮＡを発現可能な形で導入することができる。この方法では、レトロウイルスベクターを用いることで確実に標的細胞の染色体への目的遺伝子の導入が保証され、さらにＩＲＥＳ遺伝子によって薬剤存在下で生存している細胞での目的遺伝子の発現が保証される。

【００２２】

本発明によるパネル細胞は、被検サンプル中の抗ＨＮＡ抗体を検出するために用いるこ

とができる。従って、本発明によれば、被検サンプル中の抗ＨＮＡ抗体を検出する方法が提供され、該方法は、（ａ）被検サンプルを用意する工程、（ｂ）本発明によるパネル細胞を用意する工程、および（ｃ）前記被検サンプルに前記パネル細胞を接触させ、該パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合を検出する工程を含んでなる。被検サンプルとしては、抗体を含むサンプル、特に血液または血清サンプルが好適に用いられる。

【００２３】

パネル細胞と抗ＨＮＡ抗体との結合は、当技術分野において公知の方法によって検出することができる。このような方法としては、例えば、フローサイトメーターを用いる方法（ＧＩＦＴ法）、パネル細胞の凝集を指標とする方法（ＧＡＴ法）、血清とマウスモノクローナル抗体をパネル細胞に反応させ、形成される抗原抗体複合物を測定する方法（ＭＡＩＧＡ法）、パネル細胞を固定したプレートに被検サンプルを接触させ、結合した抗体と抗ヒトＩｇＧ感作血球（もしくは感作ビーズ）との凝集を指標に判定する方法（ＭＰＨＡ法）、ＭＰＨＡ法における検出工程を標識抗体で行なう方法（ＥＩＡ法）などがある。パネル細胞と抗ＨＮＡ抗体との結合は、好ましくはフローサイトメトリーによって検出される。

【００２４】

上記の抗ＨＮＡ抗体の検出法において、本発明によるパネル細胞は担体に固定して使用することができる。担体としては、ポリスチレンなどの熱可塑性合成樹脂よりなるプレートやビーズが好ましいが、ニトロセルロースやナイロンなどのフィルター、ガラスファイバー、ガラスビーズ、磁性体ビーズ、有機高分子ビーズ、微生物、血球、細胞膜片なども使用できる。有機高分子ビーズとしては、例えば、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等の天然高分子粒子やポリスチレンなどの熱可塑性合成樹脂ビーズが挙げられる。熱可塑性合成樹脂としては、ポリスチレン以外にポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリル／スチレン樹脂、アクリロニトリル／ブタジエン／スチレン樹脂メタクリル樹脂、塩化ビニルなどが挙げられる。

【００２５】

担体への細胞の固定は、無処理混合または物理化学的修飾、結合剤の使用などにより、物理化学的結合（共有結合、イオン結合、ファンデルワールス結合、水素結合、金属結合、機械的結合、磁力結合など）や生物学的結合（抗原抗体結合、受容体－リガンド結合、受容体－リガンド結合、酵素－基質結合、核酸相補結合など）を利用して行なうことができる。

【００２６】

上記の抗ＨＮＡ抗体の検出法において、本発明によるパネル細胞は抗ＨＮＡ抗体を検出するための試薬となる。従って、本発明によれば、本発明によるパネル細胞を含んでなる、抗ＨＮＡ抗体を検出するための試薬が提供される。本発明による試薬においては、このパネル細胞は、上述のように担体に固定されたものであってもよい。

【００２７】

さらに、抗ＨＮＡ抗体は、疾患に関与することが知られている。従って、本発明によれば、被験体（特にヒト被験体）において、抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患を検出または診断するための方法が提供され、該方法は、（ａ）前記被験体からの血清サンプルを用意する工程、（ｂ）本発明によるパネル細胞を用意する工程、および（ｃ）前記血清サンプルに前記パネル細胞を接触させ、該パネル細胞と前記抗ＨＮＡ抗体との結合を検出する工程を含んでなる。パネル細胞と抗ＨＮＡ抗体との結合の検出については、上述したとおりである。抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患としては、同種免疫性新生児好中球減少症、造血幹細胞移植後同種免疫性好中球減少症、顆粒球輸血不応、輸血関連急性肺障害、原発性自己免疫性好中球減少症、二次性自己免疫性好中球減少症、非溶血性輸血副作用などが挙げられる。さらに、上述の本発明による試薬は、これら疾患の検出用または診断用の試薬となる。

【００２８】

さらに、本発明によるパネル細胞は、各種ＨＮＡ抗原の製造に用いることができる。従って、本発明によればＨＮＡ抗原を製造する方法が提供され、該方法は、本発明によるパ

ネル細胞を培養する工程、およびその培養物からＨＮＡ抗原を単離する工程を含んでなる。

【００２９】

本発明によるパネル細胞は、上述のように、被検サンプル中の抗ＨＮＡ抗体の検出ならびに被験体（特にヒト被験体）における抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患の診断に用いることができる。従って、本発明によれば、被検サンプル中の抗ＨＮＡ抗体を検出するための、本発明によるパネル細胞の使用、ならびに抗ＨＮＡ抗体を検出するための試薬の製造における、本発明によるパネル細胞の使用が提供される。さらに、本発明によれば、被験体（特にヒト被験体）において抗ＨＮＡ抗体が関与する疾患を診断するための試薬の製造における、本発明によるパネル細胞の使用が提供される。

【実施例】

【００３０】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【００３１】

参考例１：細胞の選択

パネル細胞の作製に用いる細胞株を選択するために、６種類の非接着性細胞（Ｋ５６２細胞、Ｊｕｒｋａｔ細胞、ＴＨＰ－１細胞、Ｎａｍａｌｗａ細胞、ＣＭＫ細胞およびＬ細胞）、ならびに５種類の接着性細胞（Ｈｅｌａ細胞、２９３Ｔ細胞、ＣＯＳ－７細胞、３Ｔ３細胞およびＣＨＯ細胞）について、次の試験を行った。まず、各細胞と３種類の健常人血清（ノーマル血清）との反応性をフローサイトメーターで測定し、各々の細胞のバックグラウンドの増大の有無を解析した。次に、各細胞と抗ＨＬＡ抗体（抗ＨＬＡ－ＡＢＣ抗体および抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体）または抗ＨＮＡ抗体（抗ＨＮＡ－１抗体、抗ＨＮＡ－２ａ抗体、抗ＨＮＡ－３ａ抗体、抗ＨＮＡ－４抗体および抗ＨＮＡ－５抗体）との反応性を、抗体標識として用いたフルオレセイン（ＦＩＴＣ）およびフィコエリスリン（ＰＥ）を指標としてフローサイトメーターで測定し、各々の細胞のバックグラウンドの増大の有無を解析した。また、Ｋ５６２細胞については抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＱ抗体および抗ＨＬＡ－ＤＰ抗体の混合物との反応性も解析した。なお、抗ＨＮＡ－３ａ抗体との反応性は抗ＨＮＡ－３ａ血清を用いて解析し、その他の抗体との反応性はそれぞれのモノクローナル抗体を用いて解析した。これらの結果を表１に示す。

【００３２】

【表１】

表1：形質導入候補細胞の健常人血清との反応性ならびにHLA発現およびHNA発現の比較

		非接着性細胞株						接着性細胞株				
		K562	Jurkat	THP-1	Namalwa	CMK	L-細胞	Hela	293T	COS-7	3T3	CHO
ノーマル血清 #1		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	1/3	2/3	0/3	2/3	2/3 弱
HLA#2	ABC	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	DR	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
	DR,DQ,DP	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HNA	1#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 弱
	2a#4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3a#5	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	4#6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	5#6	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

#1 ３種の正常ヒト血清とともにインキュベートした後に、FITC-抗-ヒトIgGを用いた間接的免疫蛍光試験により測定

#2 FITC-抗-HLA-ABC抗体、PE-抗-HLA-DR抗体、ならびにPE-抗-HLA-DR抗体とPE-抗-HLA-DQ抗体とPE-抗-HLA-DP抗体との混合物を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#3 FITC-TAG-1、FITC-TAG-2およびTAG-3を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#4 FITC-TAG-4を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#5 HNA-3a-反応性血清とともにインキュベートした後に、FITC-抗-ヒトIgGを用いた間接的免疫蛍光試験により測定

#6 PE-抗-HNA4抗体(抗-Mac-1抗体)およびFITC-抗-HNA5抗体(抗-LFA1抗体)を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

【００３３】

表１に示されるように、Ｌ細胞、Ｈｅｌａ細胞、２９３Ｔ細胞、３Ｔ３細胞、およびＣＨＯ細胞は、ノーマル血清との高い反応性を示した。一方で、５種類の非接着性細胞（Ｋ５６２細胞、Ｊｕｒｋａｔ細胞、ＴＨＰ－１細胞、Ｎａｍａｌｗａ細胞、及びＣＭＫ細胞）および１種類の接着性細胞（ＣＯＳ－７細胞）は、ノーマル血清に対して殆ど反応性を示さなかった。さらに、ノーマル血清に対して反応性を示さない細胞のうち、Ｋ５６２細胞だけが、抗ＨＬＡ抗体または抗ＨＮＡ抗体のいずれに対しても反応性を示さなかった。

これらのことから、ＨＮＡ遺伝子を導入する細胞としてＫ５６２細胞を選択した。

【００３４】

実施例１：ＨＮＡ－１ａ、ＨＮＡ－１ｂおよびＨＮＡ－２ａの各抗原を発現する細胞の調製

ＨＮＡ－１ａ抗原、ＨＮＡ－１ｂ抗原およびＨＮＡ－２ａ抗原の各ｃＤＮＡは、ＨＮＡ－１ａ／ａ、ＨＮＡ－１ｂ／ｂまたはＨＮＡ－２ａ／ａの遺伝子型を持つ健常人から得た末梢血単核球からそれぞれ調製した。すなわち、それぞれの細胞から全ＲＮＡを分取し、ＲＴ－ＰＣＲによりｃＤＮＡを合成した。得られたｃＤＮＡを市販のプラスミドｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（Invitrogen, Carlsbad, CA）中にクローニングし、ＨＮＡ－１ａ遺伝子、ＨＮＡ－１ｂ遺伝子またはＨＮＡ－２ａ遺伝子のＤＮＡ配列を確認した。ＨＮＡ－１ａのｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号１および配列番号２に示す。ＨＮＡ－１ｂのｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号３および配列番号４に示す。ＨＮＡ－２ａのｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号５および配列番号６に示す。

【００３５】

次いで、それぞれのｃＤＮＡを、市販のレトロウィルスベクターであるｐＱＣＸＩＰ（Becton Dickinson, SanJose, CA）中のＢａｍＨＩサイトとＮｏｔＩサイトの間にサブクローニングした。ＨＮＡ－１ａ、ＨＮＡ－１ｂおよびＨＮＡ－２ａのｃＤＮＡを含むベクターを、それぞれｐＱＣＸＩＰ－１ａ、ｐＱＣＸＩＰ－１ｂおよびｐＱＣＸＩＰ－２ａと命名した。これらベクターの構造は、図１に示されるとおりである。

【００３６】

次に、Lipofetamine Plus試薬（Invitrogen）を用い、その標準プロトコールに従って、ｐＱＣＸＩＰ－１ａ、ｐＱＣＸＩＰ－１ｂもしくはｐＱＣＸＩＰ－２ａとｐＶＳＶ－Ｇ（Becton Dickinson）とを、ｇｐ－２９３Ｔパッケージング細胞株（Becton Dickinson）中に遺伝子導入した。その際、ＨＮＡ遺伝子を導入していないｐＱＣＸＩＰのみを同様の操作で遺伝子導入したものも作製した。

【００３７】

上記の遺伝子導入したｇｐ－２９３Ｔ細胞を４８時間培養し、$１０^{５}$個／ｍｌの組換えウィルス粒子を含む上清を得た。この上清０．１ｍｌに、０．９ｍｌの感染用培地（１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地に終濃度８μｇ／ｍｌのポリブレンを添加）に懸濁した$１×１０^{６}$個のＫ５６２細胞を加え、２時間培養した後、Ｒ１０培地（１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地）で２回洗浄し、その後、Ｒ１０培地で２日間培養した。次に、組換えウイルスを感染させた細胞のうち、ピューロマイシン耐性のものを限界希釈法によりクローニングし、ＨＮＡ－１ａ、ＨＮＡ－１ｂおよびＨＮＡ－２ａをそれぞれ発現するＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞およびＫＹ－２ａ細胞、ならびにベクターのみが導入されたＫＹ－ｍｏｃｋ細胞をそれぞれ得た。

【００３８】

実施例２：ＨＮＡ－４ａ、ＨＮＡ－４ｂ、ＨＮＡ－５ａおよびＨＮＡ－５ｂの各抗原を発現する細胞の調製

ＨＮＡ－４ａ抗原、ＨＮＡ－４ｂ抗原、ＨＮＡ－５ａ抗原およびＨＮＡ－５ｂ抗原の各ｃＤＮＡは、ＨＮＡ－４ａ／ａ、ＨＮＡ－４ｂ／ｂ、ＨＮＡ－５ａ／ａ、およびＨＮＡ－５ｂ／ｂの遺伝子型を持つ健常人から得た抹消血単核球からそれぞれ調製した。すなわち、それぞれの、細胞から全ＲＮＡを抽出し、ＲＴ－ＰＣＲによりｃＤＮＡを合成した。得られたｃＤＮＡを市販のプラスミドｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（Invitrogen, Carlsbad, CA）中にクローニングし、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）遺伝子（ＨＮＡ－４ａの多形性を決定している遺伝子）、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）遺伝子（ＨＮＡ－４ｂの多形性を決定している遺伝子）、ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）遺伝子（ＨＮＡ－５ａの多形性を決定している遺伝子）、ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）遺伝子（ＨＮＡ－５ｂの多形性を決定している遺伝子）、およびＣＤ１８遺伝子（ＨＮＡ－４およびＨＮＡ－５において共通に発現している遺伝子）のＤＮＡ配列を確認した。ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）のｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号７および配列番号８に示す。ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）のｃＤＮＡ配列お

よびアミノ酸配列を配列番号９および配列番号１０に示す。ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）のｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号１１および配列番号１２に示す。ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）のｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号１３および配列番号１４に示す。ＣＤ１８のｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を配列番号１５および配列番号１６に示す。

【００３９】

次いで、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）、ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）、ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）、ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）のｃＤＮＡを、ｐＱＣＸＩＰ中のＰａｃＩサイトとＮｏｔＩサイトの間にサブクローニングし、それぞれｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）と命名した。さらに、ＣＤ１８のｃＤＮＡを、市販のレトロウイルスベクターであるｐＱＣＸＩＮ（ｐＱＣＸＩＰ中のｐｕｒｏｍｙｃｉｎ耐性遺伝子をｎｅｏｍｙｃｉｎ耐性遺伝子に置き換えたもの、Becton Dickinson, SanJose, CA）中のＰａｃＩサイトとＮｏｔＩサイトの間にサブクローニングし、ｐＱＣＸＩＮ－ＣＤ１８と命名した。これらベクターの構造は、図１に示されるとおりである。

【００４０】

次に、Lipofetamine Plus試薬（Invitrogen）を用い、その標準プロトコールに従って、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）もしくはｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）と、ｐＱＣＸＩＮ－ＣＤ１８およびｐＶＳＶ－Ｇ（Becton Dickinson）とを、ｇｐ－２９３Ｔパッケージング細胞株（Becton Dickinson）中に遺伝子導入した。その際、ＨＮＡ遺伝子を導入していないｐＱＣＸＩＰおよびｐＱＣＸＩＮのみを同様の操作で遺伝子導入したものも作製した。

【００４１】

上記の遺伝子導入したｇｐ－２９３Ｔ細胞を４８時間培養し、$１０^{５}$個／ｍｌの組換えウイルス粒子を含む上清を得た。ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（＋）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ｂＭａｒｔ（－）、ｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（＋）もしくはｐＱＣＸＩＰ－ＣＤ１１ａＯｎｄ（－）を遺伝子導入したｇｐ－２９３Ｔ細胞の培養上清０．１ｍｌに、ｐＱＣＸＩＮ－ＣＤ１８を遺伝子導入したｇｐ－２９３Ｔ細胞の培養上清０．１ｍｌを添加し、これに０．８ｍｌの感染用培地（１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地に終濃度８μｇ／ｍｌのポリブレンを添加）に懸濁した$１×１０^{６}$個のＫ５６２細胞を加え、２時間培養した後、Ｒ１０培地（１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地）で２回洗浄し、その後、Ｒ１０培地で２日間培養した。次に、組換えウイルスを感染させた細胞のうち、ピューロマイシン耐性およびネオマイシン耐性のものを限界希釈法によりクローニングし、ＨＮＡ－４ａ、ＨＮＡ－４ｂ、ＨＮＡ－５ａ、ＨＮＡ－５ｂをそれぞれ発現するＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞をそれぞれ得た。また、ベクター（ｐＱＣＸＩＰおよびｐＱＣＸＩＮ）のみを導入したＫＹ－ｍｏｃｋ　ｐｎも作製した。

【００４２】

実施例３：フローサイトメーター（ＦＣＭ）による解析

（１）ＫＹ－１ａ細胞およびＫＹ－１ｂ細胞におけるＨＮＡ発現の検討

ＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞およびＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）で標識されたＦＩＴＣ－ＴＡＧ１（ＨＮＡ－１ａ抗原に対するモノクローナル抗体）またはＦＩＴＣ－ＴＡＧ２（ＨＮＡ－１ｂ抗原に対するモノクローナル抗体）とともに、４℃で１５分間インキュベートした。その後、各細胞と各抗体との結合についてフローサイトメーター（ＦＣＭ）を用いて解析した。その結果を、図２に示す。

【００４３】

図２に示される各パネル中には、左側に示される抗体を用いて得られたグラフと、対照としてイソタイプの一致したマウスＩｇＧを用いて得られたグラフとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のグラフがマウスＩｇＧを用いて得ら

れたものである。図２によれば、ＨＮＡ－１ａ遺伝子を導入したＫＹ－１ａ細胞は抗ＨＮＡ－１ａ抗体のみと反応し、よってＨＮＡ－１ａ抗原を特異的に発現することが示される。また、ＨＮＡ－１ｂ遺伝子を導入したＫＹ－１ｂ細胞は抗ＨＮＡ－１ｂ抗体のみと反応し、よってＨＮＡ－１ｂ抗原を特異的に発現することが示される。対照細胞であるＫＹ－ｍｏｃｋ細胞には、非特異的な反応は見られなかった。

【００４４】

（２）ＫＹ－１ａ細胞およびＫＹ－１ｂ細胞をパネル細胞として用いたヒト血清中の抗ＨＮＡ抗体の検出

１０種類の抗ＨＬＡ抗体陽性の血清および２０種類のノーマル血清を用いて、ＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞、およびＫＹ－ｍｏｃｋ細胞の反応性をフローサイトメーター（ＦＣＭ）により検討した。その結果、いずれの細胞もこれら血清には反応しなかった。

【００４５】

次に、２種類の抗ＨＮＡ－１ａ抗体を含む血清（抗ＨＮＡ－１ａ血清）または３種類の抗ＨＮＡ－１ｂ抗体を含む血清（そのうちの１種類の血清は、抗ＨＬＡクラスＩ抗体も含んでいる）（抗ＨＮＡ－１ｂ血清）と、ＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞、およびＫＹ－ｍｏｃｋ細胞との反応性をフローサイトメーター（ＦＣＭ）により解析した。その結果を図３および図４に示す。

【００４６】

図３は、ＫＹ－１ａ細胞についての結果を示す。図３に示される各パネル中には、ＫＹ－１ａ細胞を用いて得られたグラフと、対照としてＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたグラフとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のグラフがＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたものである。図３によれば、ＫＹ－１ａ細胞は抗ＨＮＡ－１ａ血清のみと反応し、さらに、その反応の強度は血清中の抗ＨＮＡ－１ａ抗体の濃度に依存することが示される。

【００４７】

図４は、ＫＹ－１ｂ細胞についての結果を示す。図４に示される各パネル中には、ＫＹ－１ｂ細胞を用いて得られたグラフと、対照としてＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたグラフとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のグラフがＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたものである。図４によれば、ＫＹ－１ｂ細胞は抗ＨＮＡ－１ｂ血清のみと反応し、さらに、その反応の強度は血清中の抗ＨＮＡ－１ｂ抗体の濃度に依存することが示される。

【００４８】

（３）ＫＹ－２ａ細胞におけるＨＮＡ発現の検討

ＫＹ－２ａ細胞を、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）で標識されたＦＩＴＣ－ＴＡＧ１、ＦＩＴＣ－ＴＡＧ２、ＦＩＴＣ－ＴＡＧ３（ＨＮＡ－１抗原に対するモノクローナル抗体）、ＦＩＴＣ－ＴＡＧ４（ＨＮＡ－２ａ抗原に対するモノクローナル抗体）とともに、４℃で１５分間インキュベートした。その後、ＫＹ－２ａ細胞と各抗体との結合についてフローサイトメーター（ＦＣＭ）を用いて解析した。その結果を、図５に示す。

【００４９】

図５に示される各パネル中には、上側に示される抗体を用いて得られたグラフと、対照としてイソタイプの一致したマウスＩｇＧを用いて得られたグラフとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のグラフがマウスＩｇＧを用いて得られたものである。図５によれば、ＨＮＡ－２ａ遺伝子を導入したＫＹ－２ａ細胞は抗ＨＮＡ－２ａ抗体のみと反応し、よってＨＮＡ－２ａ抗原を特異的に発現することが示される。

【００５０】

（４）ＫＹ－２ａ細胞をパネル細胞として用いたヒト血清中の抗ＨＮＡ抗体の検出

１０種類の抗ＨＬＡ抗体陽性の血清および２０種類のノーマル血清を用いて、ＫＹ－２ａ細胞の反応性をフローサイトメーター（ＦＣＭ）により検討した。その結果、ＫＹ－２ａ細胞はこれら血清には反応しなかった。

【００５１】
次に、２種類の抗ＨＮＡ－１ａ血清、３種類の抗ＨＮＡ－１ｂ血清、または２種類の抗ＨＮＡ－２ａ抗体を含む血清（抗ＨＮＡ－２ａ血清）と、ＫＹ－２ａ細胞およびＫＹ－ｍｏｃｋ細胞との反応性をフローサイトメーター（ＦＣＭ）により解析した。その結果を図６に示す。
【００５２】
図６に示される各パネル中には、ＫＹ－２ａ細胞を用いて得られたグラフと、対照としてＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたグラフとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のグラフがＫＹ－ｍｏｃｋ細胞を用いて得られたものである。図６によれば、ＫＹ－２ａ細胞は抗ＨＮＡ－２ａ血清のみと反応し、さらに、その反応の強度は血清中の抗ＨＮＡ－２ａ抗体の濃度に依存することが示される。
【００５３】
（５）<u>ＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞におけるＨＮＡ発現の検討</u>
ＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞を、フルオレセインイソシアネート（ＦＩＴＣ）で標識されたＦＩＴＣ－ＣＤ１１ａ抗体（ＨＮＡ－５抗原に対するモノクローナル抗体）もしくはＦＩＴＣ－ＣＤ１１ｂ抗体（ＨＮＡ－４抗原に対するモノクローナル抗体）およびフィコエリトリン（ＰＥ）で標識されたＣＤ１８抗体（ＨＮＡ－４抗原はＣＤ１１ｂとＣＤ１８との複合体であり、ＨＮＡ－５抗原はＣＤ１１ａとＣＤ１８との複合体である。ＣＤ１８抗体はＨＮＡ－４抗原とＨＮＡ－５抗原に共通のＣＤ１８に対するモノクローナル抗体である。）とともに、４℃で１５分間インキュベートした。その後、各細胞と各抗体との結合についてフローサイトメーター（ＦＣＭ）を用いて解析した。その結果を、図７に示す。
【００５４】
図７に示される各パネル中には、左側に示される抗体を用いて得られたヒストグラムと、対照としてイソタイプの一致したマウスＩｇＧを用いて得られたヒストグラムとが示されている。これら２つのグラフが重なっていない場合には、左側のヒストグラムがマウスＩｇＧを用いて得られたものである。図７によれば、ＨＮＡ－４ａ遺伝子を導入したＫＹ－４ａ細胞またはＨＮＡ－４ｂ遺伝子を導入したＫＹ－４ｂ細胞は、抗ＨＮＡ－４抗体（ＣＤ１１ｂ）のみと反応し、よってＨＮＡ－４ａ抗原またはＨＮＡ－４ｂ抗原を特異的に発現することが示される。また、ＨＮＡ－５ａ遺伝子を導入したＫＹ－５ａ細胞またはＨＮＡ－５ｂ遺伝子を導入したＫＹ－５ｂ細胞は、抗ＨＮＡ－５抗体（ＣＤ１１ａ）のみと反応し、よってＨＮＡ－５ａ抗原またはＨＮＡ－５ｂ抗原を特異的に発現することが示される。また、ＨＮＡ－４抗原およびＨＮＡ－５抗原に共通のＣＤ１８分子の発現もＣＤ１８抗体によって確認された。
【００５５】
<u>実施例４：ＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞およびＫＹ－２ａ細胞における抗原発現の安定性</u>
実施例１において作製したＫＹ－１ａ細胞、ＫＹ－１ｂ細胞およびＫＹ－２ａ細胞における導入遺伝子の発現（抗原発現）の安定性を調べた。すなわち、終濃度０．５μｇ／ｍｌのピューロマイシンを添加したＲ１０培地において上記３種類の細胞を培養し、これら細胞における抗原の発現を、各抗原に対するモノクローナル抗体（ＦＩＴＣ－ＴＡＧ1、ＦＩＴＣ－ＴＡＧ2、およびＦＩＴＣ－ＴＡＧ4）を用いて、フローサイトメーター（ＦＣＭ）により経時的に測定した。ＫＹ－１ａ細胞およびＫＹ－１ｂ細胞では、調製後０、１、３、６ヶ月の時点で抗原発現に変化はなく、非常に安定であった。また、ＫＹ－２ａ細胞も調製後３ヶ月まで安定して抗原を発現していた。
【００５６】
<u>実施例５：ＲＴ－ＰＣＲ法を用いたＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞の導入遺伝子発現の確認</u>
実施例２において作製したＫＹ－４ａ細胞、ＫＹ－４ｂ細胞、ＫＹ－５ａ細胞およびＫ

Ｙ－５ｂ細胞における導入遺伝子発現をＲＴ－ＰＣＲ法により検討した。すなわち、それぞれの細胞から全ＲＮＡを抽出し、ＲＴ－ＰＣＲによりｃＤＮＡを合成し、ＨＮＡ－４（ＣＤ１１ｂ抗原上に存在）もしくはＨＮＡ－５（ＣＤ１１ａ抗原上に存在）の多形性を決定している部位を含むヌクレオチド配列を特異的プライマーで増幅し、多形性によって異なるヌクレオチド配列の違いを制限酵素の切断パターンによって判別した。

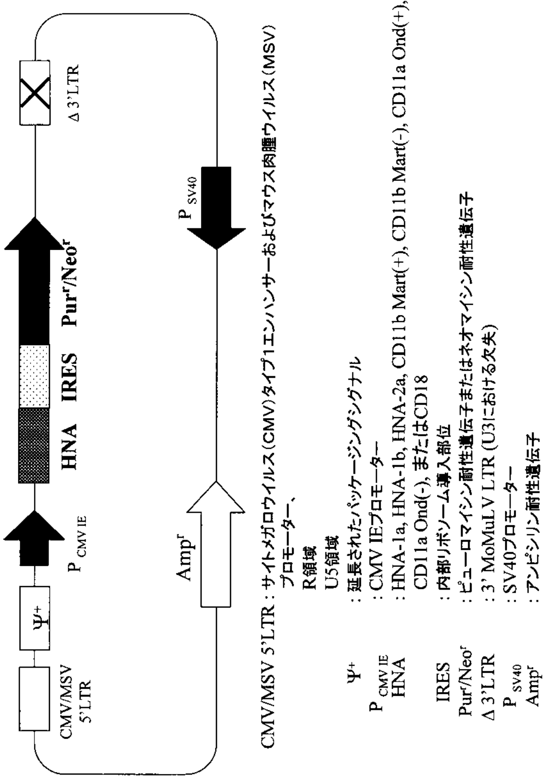
【００５７】

図８に示すように、ＨＮＡ－４抗原をコードする遺伝子（ＣＤ１１ｂ）は、その遺伝子内部に制限酵素ＡｃｉＩ切断部位を２箇所もつＨＮＡ－４ａ遺伝子と同切断部位を１箇所しか持たないＨＮＡ－４ｂ遺伝子が存在する多形性を示す。また、ＨＮＡ－５抗原をコードする遺伝子（ＣＤ１１ａ）は、その遺伝子内部に制限酵素Ｂｓｐ１２８６Ｉ切断部位を２箇所もつＨＮＡ－５ａ遺伝子と同切断部位を１箇所しか持たないＨＮＡ－５ｂ遺伝子が存在する多形性を示す。各細胞から調製したＲＴ－ＰＣＲ増幅産物を制限酵素で切断した後、電気泳動をおこなった結果を図９に示す。

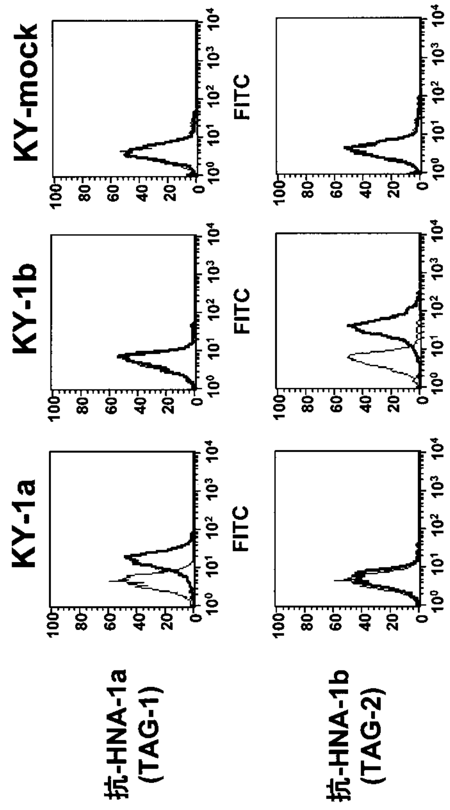
【００５８】

図９に示すように、ＨＮＡ－４ａ遺伝子またはＨＮＡ－４ｂ遺伝子を導入したＫＹ－４ａ細胞またはＫＹ－４ｂ細胞より合成したｃＤＮＡを鋳型にして、多形性部位を特異的に増幅するプライマーでＰＣＲを行った結果、特異的な増幅産物が観察された（ＣＤ１１ｂ、ＲＴ＋、　ｅｎｚｙｍｅ－）。この増幅産物はＫＹ－ｍｏｃｋ　ｐｎのｃＤＮＡを鋳型にした場合は観察されなかった。さらに、この増幅産物に制限酵素ＡｃｉＩを反応させると、ＨＮＡ－４ａ遺伝子を導入したＫＹ－４ａ細胞のものではそれぞれ２７２ｂｐ、２０８ｂｐおよび１２４ｂｐに相当する３本のバンド（切断部位が２箇所）が観察され、ＫＹ－４ｂ細胞ではそれぞれ４８０ｂｐおよび１２４ｂｐに相当する２本のバンド（切断部位が１箇所）が観察された。このことは、ＫＹ－４ａ細胞およびＫＹ－４ｂ細胞においてそれぞれＨＮＡ－４ａ遺伝子およびＨＮＡ－４ｂ遺伝子のｍＲＮＡが特異的に発現していることを意味するものである。同様の検討をＫＹ－５ａ細胞およびＫＹ－５ｂ細胞でも行い、それぞれＨＮＡ－５ａ遺伝子およびＨＮＡ－５ｂ遺伝子のｍＲＮＡの特異的な発現を観察した。さらに、本検討に用いた全ＲＮＡ量（ｃＤＮＡ量）に各細胞間で差がないことを、Ｇ３ＰＤＨの発現量を調べることで確認した（図１０）。

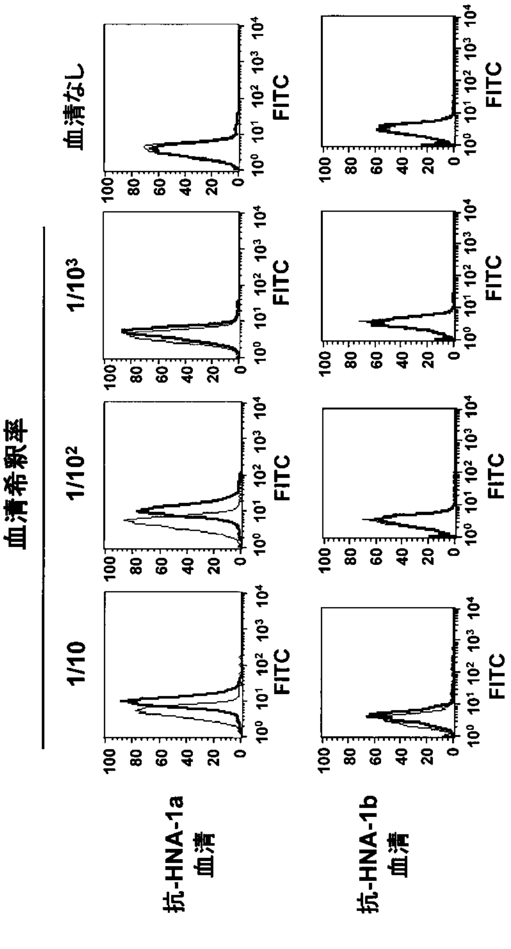
【図1】


CMV/MSV 5'LTR
Ψ+
P CMV IE
HNA
IRES
Purr/Neor
Δ 3'LTR
P SV40
Ampr
CMV/MSV 5'LTR : サイトメガロウイルス(CMV)タイプ1エンハンサーおよびマウス肉腫ウイルス(MSV)プロモーター、R領域、U5領域
Ψ+ : 延長されたパッケージングシグナル
P CMV IE : CMV IEプロモーター
HNA : HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, CD11b Mart(+), CD11b Mart(-), CD11a Ond(+), CD11a Ond(-), またはCD18
IRES : 内部リボソーム導入部位
Purr/Neor : ピューロマイシン耐性遺伝子またはネオマイシン耐性遺伝子
Δ 3'LTR : 3' MoMuLV LTR (U3における欠失)
P SV40 : SV40プロモーター
Ampr : アンピシリン耐性遺伝子

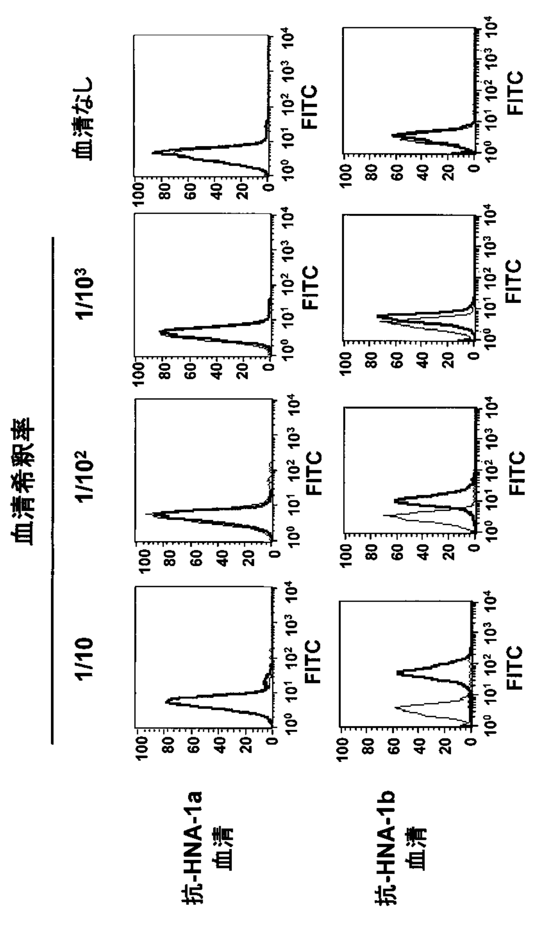
【図2】


KY-1a
KY-1b
KY-mock
抗-HNA-1a (TAG-1)
抗-HNA-1b (TAG-2)
FITC

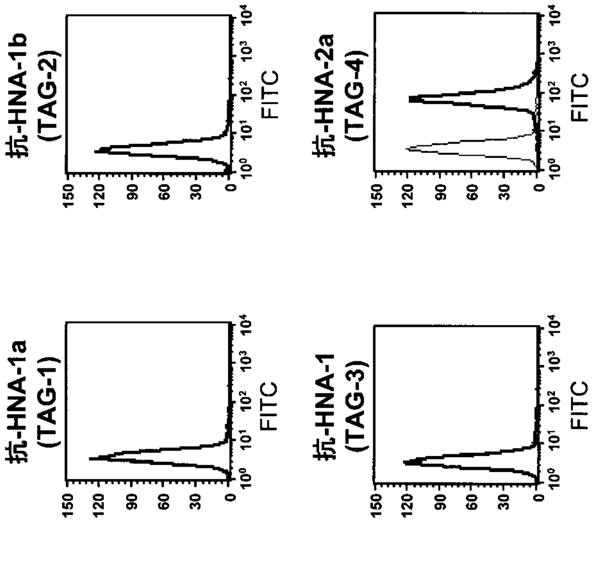
【図3】


血清希釈率
1/10
1/10²
1/10³
血清なし
抗-HNA-1a 血清
抗-HNA-1b 血清
FITC

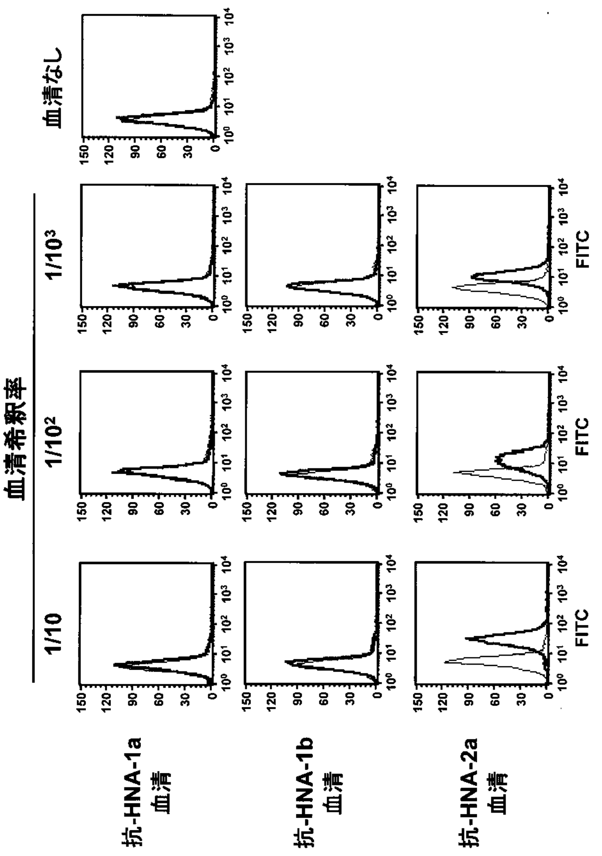
【図4】


血清希釈率
1/10
1/10²
1/10³
血清なし
抗-HNA-1a 血清
抗-HNA-1b 血清
FITC

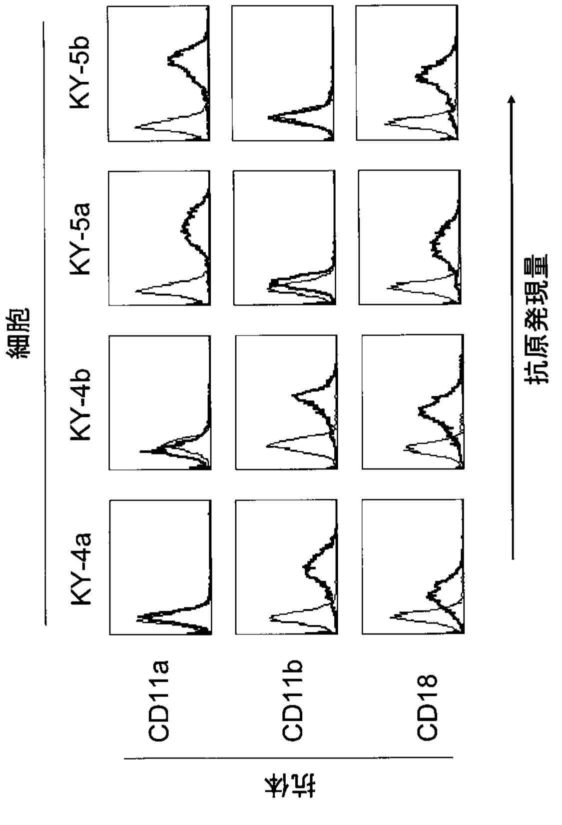
【図５】


抗-HNA-1a
(TAG-1)
抗-HNA-1b
(TAG-2)
抗-HNA-1
(TAG-3)
抗-HNA-2a
(TAG-4)
FITC

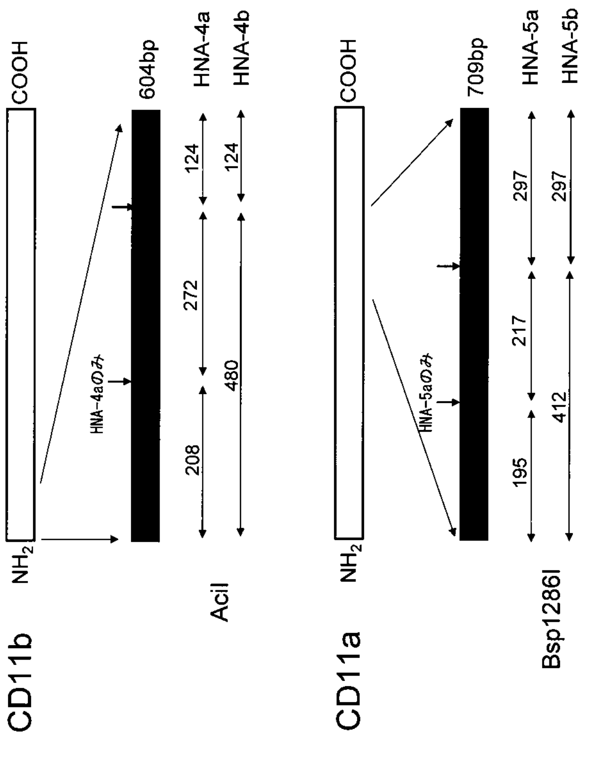
【図６】


血清希釈率
1/10
1/10²
1/10³
血清なし
抗-HNA-1a
血清
抗-HNA-1b
血清
抗-HNA-2a
血清
FITC

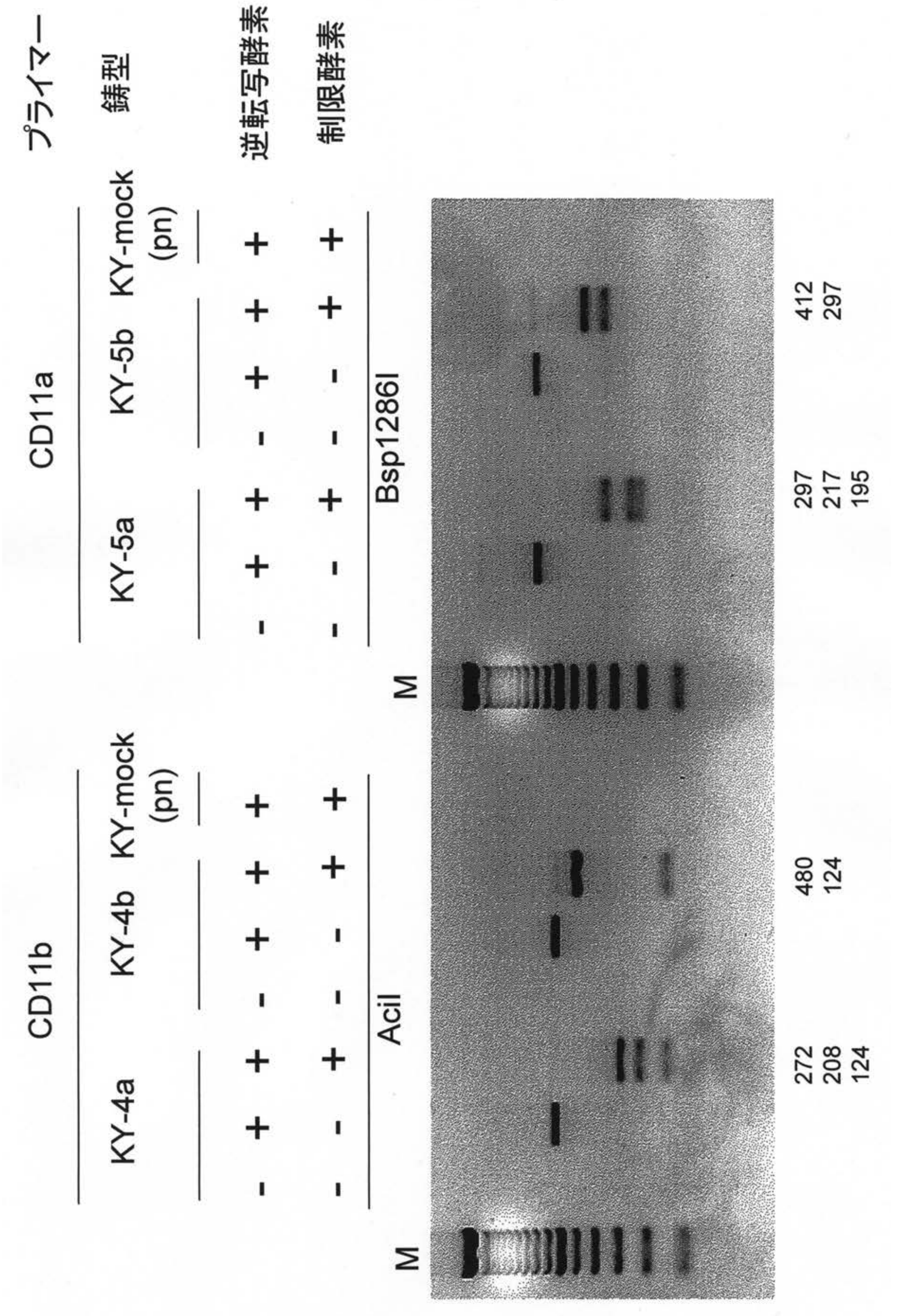
【図７】


細胞
KY-4a
KY-4b
KY-5a
KY-5b
抗体
CD11a
CD11b
CD18
抗原発現量

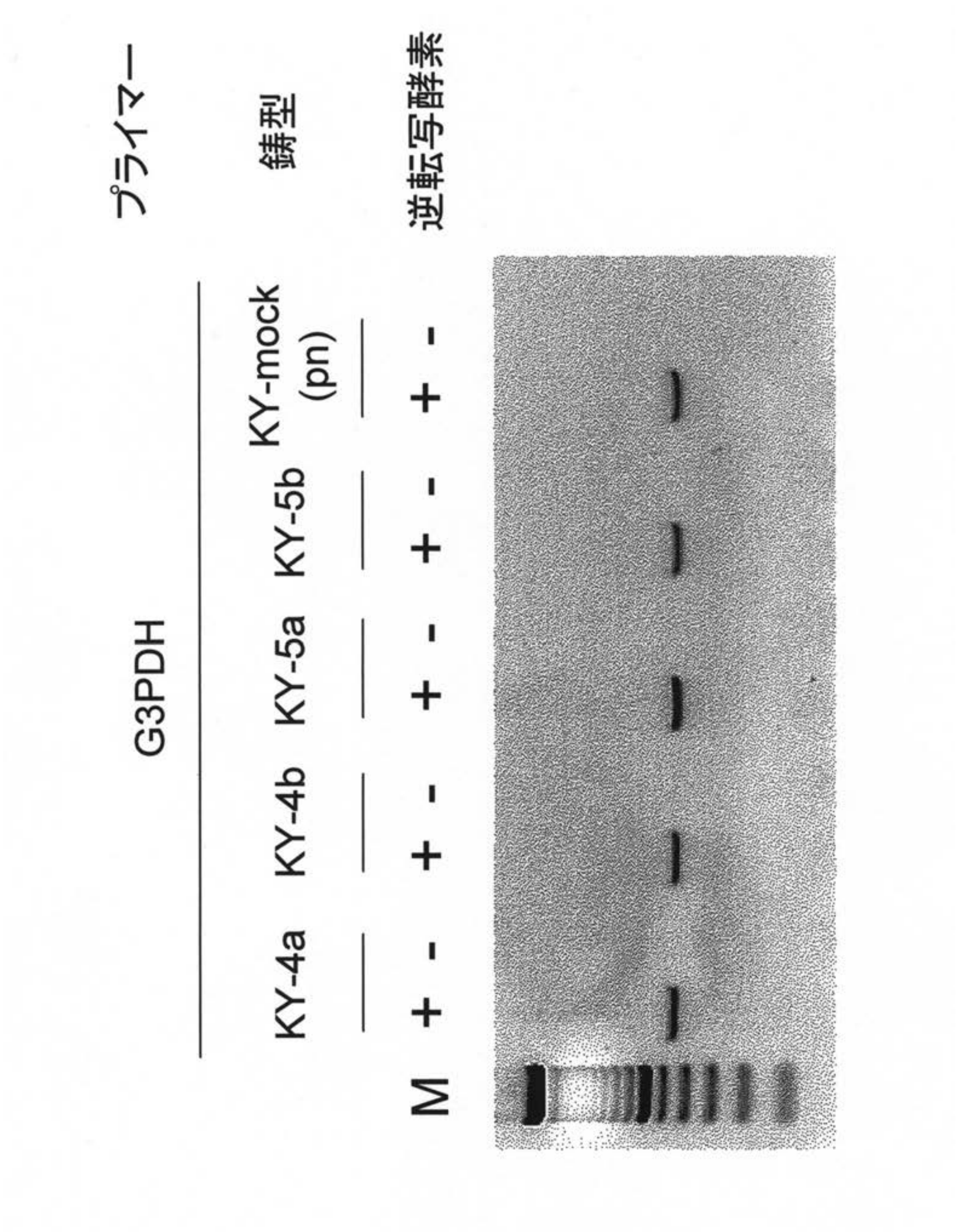
【図８】


CD11b
NH2
COOH
604bp
HNA-4aのみ
HNA-4a
HNA-4b
208
272
124
480
124
AciI
CD11a
709bp
HNA-5aのみ
HNA-5a
HNA-5b
195
217
297
412
297
Bsp1286I

【図９】


プライマー
鋳型
逆転写酵素
制限酵素
CD11b
KY-4a
KY-4b
KY-mock (pn)
AciI
CD11a
KY-5a
KY-5b
KY-mock (pn)
Bsp1286I
M
M
272
208
124
480
124
297
217
195
412
297

【図１０】



【配列表】
0005172657000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　保　井　一　太
大阪府大阪市城東区森之宮２丁目４番４３号　大阪府赤十字血液センター内
(72)発明者　平　山　文　也
大阪府大阪市城東区森之宮２丁目４番４３号　大阪府赤十字血液センター内
(72)発明者　古　田　里　佳
大阪府大阪市城東区森之宮２丁目４番４３号　大阪府赤十字血液センター内
(72)発明者　松　山　宣　樹
大阪府大阪市城東区森之宮２丁目４番４３号　大阪府赤十字血液センター内
(72)発明者　小　島　芳　隆
大阪府大阪市城東区森之宮２丁目４番４３号　大阪府赤十字血液センター内
(72)発明者　宮　崎　　　孔
北海道札幌市西区山の手２条２丁目３－３７　北海道赤十字血液センター内
(72)発明者　池　田　久　實
北海道札幌市西区山の手２条２丁目３－３７　北海道赤十字血液センター内
(72)発明者　渡　辺　嘉　久
東京都江東区辰巳２－１－６７　日本赤十字社　血液事業本部　中央血液研究所内

審査官　柴原　直司

(56)参考文献　米国特許出願公開第２００５／０００３４８４（ＵＳ，Ａ１）
日本輸血学会雑誌，(2004)，50，[2]，P.297(P57-0)

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N　15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

patsnap

专利名称(译)	用于检测粒细胞抗体的平板细胞
公开(公告)号	JP5172657B2
公开(公告)日	2013-03-27
申请号	JP2008506252
申请日	2007-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	日本红十字会
申请(专利权)人(译)	日本红十字会 Wakunagaseiyaku有限公司
当前申请(专利权)人(译)	日本红十字会 Wakunagaseiyaku有限公司
[标]发明人	保井一太 平山文也 古田里佳 松山宣樹 小島芳隆 宮崎孔 池田久實 渡辺嘉久
发明人	保 井 一 太 平 山 文 也 古 田 里 佳 松 山 宣 樹 小 島 芳 隆 宮 崎 孔 池 田 久 實 渡 辺 嘉 久
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/543
CPC分类号	G01N33/6854 C12N2510/00 G01N33/564 G01N2333/70539 G01N2800/22
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.101 C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/543.597
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi
优先权	2006081236 2006-03-23 JP
其他公开文献	JPWO2007108368A1
外部链接	Espacenet

摘要(译)

公开了用于检测抗HNA抗体的组细胞。通过将编码对应于抗HNA抗体的HNA抗原的DNA导入细胞中以使得能够在用于检测程序的条件下表达DNA而获得组细胞，其中用于DNA引入的细胞展示与抗HLA-ABC抗体，抗HLA-DR抗体，抗HLA-DQ抗体，抗HLA-DP抗体，抗HNA-1抗体，抗HNA-2a抗体，抗HNA-无可检测的反应在检测过程中，3a抗体，抗HNA-4抗体，抗HNA-5抗体和来自正常受试者的血清。小组细胞允许准确和快速检测粒细胞抗体。

【表１】

表1:形質導入候補細胞の健常人血清との反応性ならびにHLA発現およびHNA発現の比較

		非接着性細胞株						接着性細胞株				
		K562	Jurkat	THP-1	Namalwa	CMK	L-細胞	Hela	293T	COS-7	3T3	CHO
ノーマル血清#1		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	1/3	2/3	0/3	2/3	2/3 弱
HLA#2	ABC	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	DR	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
	DR,DQ,DP	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HNA	1#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	± 弱
	2a#4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3a#5	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	4#6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	5#6	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

#1 ３種の正常ヒト血清とともにインキュベートした後に、FITC-抗-ヒトIgGを用いた間接的免疫蛍光試験により測定

#2 FITC-抗-HLA-ABC抗体、PE-抗-HLA-DR抗体、ならびにPE-抗-HLA-DR抗体とPE-抗-HLA-DQ抗体とPE-抗-HLA-DP抗体との混合物を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#3 FITC-TAG-1、FITC-TAG-2およびTAG-3を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#4 FITC-TAG-4を用いた直接的免疫蛍光試験により測定

#5 HNA-3a-反応性血清とともにインキュベートした後に、FITC-抗-ヒトIgGを用いた間接的免疫蛍光試験により測定

#6 PE-抗-HNA4抗体(抗-Mac-1抗体)およびFITC-抗-HNA5抗体(抗-LFA1抗体)を用いた直接的免疫蛍光試験により測定