

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/108368

発行日 平成21年8月6日 (2009.8.6)

(43) 国際公開日 平成19年9月27日 (2007.9.27)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 B | 4 B O 6 4 |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 C | 4 B O 6 5 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 N | |
| G O 1 N 33/543 (2006.01) | G O 1 N 33/543 5 9 7 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

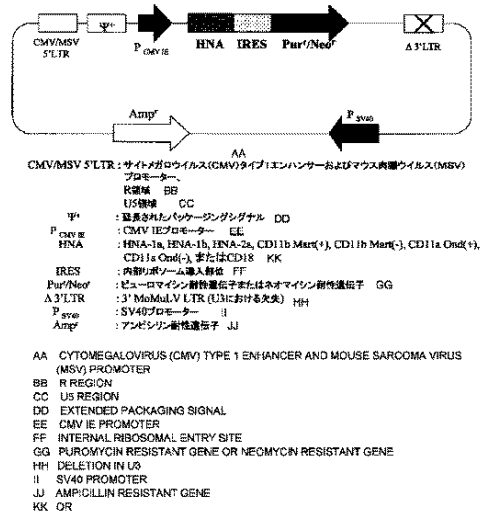
| | |
|---|---|
| 出願番号 特願2008-506252 (P2008-506252) | (71) 出願人 000231729 日本赤十字社 東京都港区芝大門1丁目1番3号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/054986 | |
| (22) 国際出願日 平成19年3月13日 (2007.3.13) | |
| (31) 優先権主張番号 特願2006-81236 (P2006-81236) | (71) 出願人 000250100 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号 |
| (32) 優先日 平成18年3月23日 (2006.3.23) | |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP) | |
| | (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) 【要約】

抗HNA抗体を検出するためのパネル細胞が開示される。このパネル細胞は、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は、抗HLA-A/B/C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。このパネル細胞により、顆粒球抗体の正確かつ迅速な検出が可能となる。



【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、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。

【請求項 2】

前記DNAを導入する前の細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 に記載のパネル細胞。

【請求項 3】

前記哺乳動物細胞が非接着性細胞である、請求項 2 に記載のパネル細胞。

【請求項 4】

前記非接着性細胞がK562細胞である、請求項 3 に記載のパネル細胞。

【請求項 5】

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 6】

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 7】

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 8】

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 9】

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 10】

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 11】

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 12】

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 13】

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、

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 14】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記哺乳動物細胞が非接着性細胞である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記非接着性細胞が K 5 6 2 細胞である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 1 a 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 1 a 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 1 b 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 1 b 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 2 a 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 2 a 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 4 a 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 4 a 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 4 b 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 4 b 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 5 a 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 5 a 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗 H N A 抗体が抗 H N A - 5 b 抗体であり、これに対応する H N A 抗原が H N A - 5 b 抗原である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 D N A が細胞のゲノム中に組み込まれる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

被検サンプル中の抗 H N A 抗体を検出する方法であって、

(a) 被検サンプルを用意する工程、

(b) 請求項 1 ~ 1 2 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

(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 H N A 抗体との結合を検出する工程
を含んでなる、方法。

【請求項 2 6】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記パネル細胞と前記抗 H N A 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 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のパネル細胞を含んでなる、抗 H N A 抗体を検出するための試薬。

【請求項 2 9】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項 2 8 に記載の試薬。

【請求項 3 0】

被験体において抗 H N A 抗体が関与する疾患を検出するための方法であって、

(a) 前記被験体からの血清サンプルを用意する工程、

(b) 請求項 1 ~ 1 2 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

(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 H N A 抗体との結合を検出する工程
を含んでなる、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

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 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

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 3 0 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 1 2 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 3 5】

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 3 4 に記載の診断用試薬。

【請求項 3 6】

前記パネル細胞が担体に固定されたものである、請求項 3 4 に記載の診断用試薬。

20

【請求項 3 7】

HNA抗原を製造する方法であって、請求項 1 ~ 1 2 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】

【0 0 0 1】

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 2 0 0 6 - 8 1 2 3 6 号（出願日：2 0 0 6 年 3 月 2 3 日）に基づく優先権の主張を伴うものである。特願 2 0 0 6 - 8 1 2 3 6 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。

30

【発明の背景】

【0 0 0 2】

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。

【0 0 0 3】

背景技術

40

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。

【0 0 0 4】

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

50

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。

10

【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。

20

【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ようを見出した。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。

30

【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。

40

【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

50

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-mockpn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。

10

【図10】KY-4a細胞、KY-4b細胞、KY-5a細胞、KY-5b細胞およびKY-mockpn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。

20

【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。

30

【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】

40

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】

50

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】

10

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】

20

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。

30

【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、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-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。

40

【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

50

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 (MA

I G A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I g G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(M P H A法)、M P H A法における検出工程を標識抗体で行なう方法(E I A法)などがある。パネル細胞と抗H N A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H N A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。

10

【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。

20

【0026】

上記の抗H N A抗体の検出法において、本発明によるパネル細胞は抗H N A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H N A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H N A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H N A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H N A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H N A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H N A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。

30

【0028】

さらに、本発明によるパネル細胞は、各種H N A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H N A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H N A抗原を単離する工程を含んでなる。

40

【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H N A抗体の検出ならびに被験体(特にヒト被験体)における抗H N A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H N A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H N A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H N A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。

50

【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。

10

20

【0032】

【表1】

表1: 形質導入候補細胞の健康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 | 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 |
| HNA | 1#3 | - | - | - | - | - | - | - | - | ±弱 |
| | 2a#4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 3a#5 | - | 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。

10

【0035】

次いで、それぞれのcDNAを、市販のレトロウイ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。

20

【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のもも作製した。

【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の組換えウイ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 $8\mu\text{g/ml}$ 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。

30

【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

40

50

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, San Jose, 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 $8\mu\text{g/ml}$ 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 p n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°C 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

としてイソタイプ的一致したマウス I g G 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 I g G を用いて得られたものである。図 2 によれば、HNA-1 a 遺伝子を導入した KY-1 a 細胞は抗 HNA-1 a 抗体のみと反応し、よって HNA-1 a 抗原を特異的に発現することが示される。また、HNA-1 b 遺伝子を導入した KY-1 b 細胞は抗 HNA-1 b 抗体のみと反応し、よって HNA-1 b 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-moc k 細胞には、非特異的な反応は見られなかった。

【0044】

(2) KY-1 a 細胞および KY-1 b 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

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-1 a 細胞、KY-1 b 細胞、および KY-moc k 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-1 a 抗体を含む血清 (抗 HNA-1 a 血清) または 3 種類の抗 HNA-1 b 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-1 b 血清) と、KY-1 a 細胞、KY-1 b 細胞、および KY-moc k 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】

20

図 3 は、KY-1 a 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-1 a 細胞を用いて得られたグラフと、対照として KY-moc k 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-moc k 細胞を用いて得られたものである。図 3 によれば、KY-1 a 細胞は抗 HNA-1 a 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-1 a 抗体の濃度に依存することが示される。

【0047】

図 4 は、KY-1 b 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-1 b 細胞を用いて得られたグラフと、対照として KY-moc k 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-moc k 細胞を用いて得られたものである。図 4 によれば、KY-1 b 細胞は抗 HNA-1 b 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-1 b 抗体の濃度に依存することが示される。

30

【0048】

(3) KY-2 a 細胞における HNA 発現の検討

KY-2 a 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-2 a 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-2 a 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。

40

【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的一致したマウス I g G 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 I g G を用いて得られたものである。図 5 によれば、HNA-2 a 遺伝子を導入した KY-2 a 細胞は抗 HNA-2 a 抗体のみと反応し、よって HNA-2 a 抗原を特異的に発現することが示される。

【0050】

(4) KY-2 a 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-2

50

a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-2 a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-1 a血清、3種類の抗HNA-1 b血清、または2種類の抗HNA-2 a抗体を含む血清（抗HNA-2 a血清）と、KY-2 a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-2 a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-2 a細胞は抗HNA-2 a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-2 a抗体の濃度に依存することが示される。

【0053】

(5) KY-4 a細胞、KY-4 b細胞、KY-5 a細胞およびKY-5 b細胞におけるHNA発現の検討

KY-4 a細胞、KY-4 b細胞、KY-5 a細胞およびKY-5 b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的一致したマウス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-4 a遺伝子を導入したKY-4 a細胞またはHNA-4 b遺伝子を導入したKY-4 b細胞は、抗HNA-4抗体（CD11b）のみと反応し、よってHNA-4 a抗原またはHNA-4 b抗原を特異的に発現することが示される。また、HNA-5 a遺伝子を導入したKY-5 a細胞またはHNA-5 b遺伝子を導入したKY-5 b細胞は、抗HNA-5抗体（CD11a）のみと反応し、よってHNA-5 a抗原またはHNA-5 b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】

実施例4：KY-1 a細胞、KY-1 b細胞およびKY-2 a細胞における抗原発現の安定性

実施例1において作製したKY-1 a細胞、KY-1 b細胞およびKY-2 a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0.5 μg/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-1 a細胞およびKY-1 b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-2 a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】

実施例5：RT-PCR法を用いたKY-4 a細胞、KY-4 b細胞、KY-5 a細胞お

よびKY-5b細胞の導入遺伝子発現の確認

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KY-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。

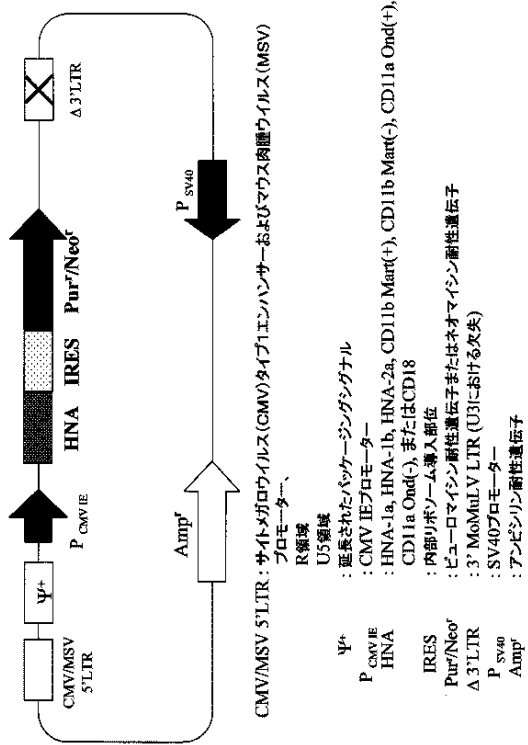
【0057】

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。

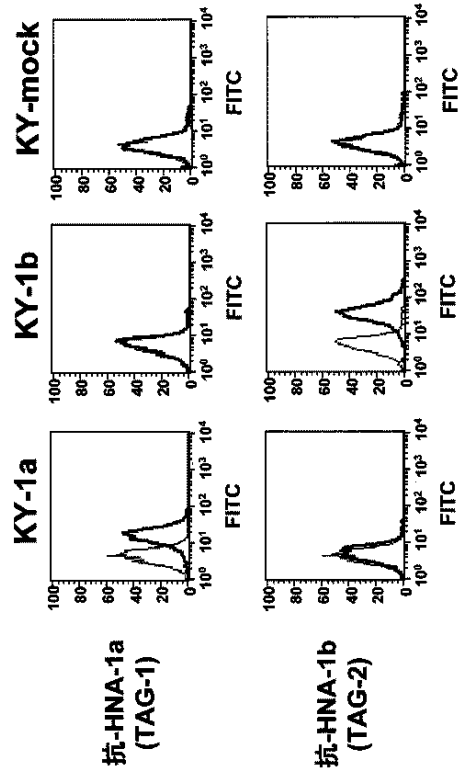
【0058】

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)。

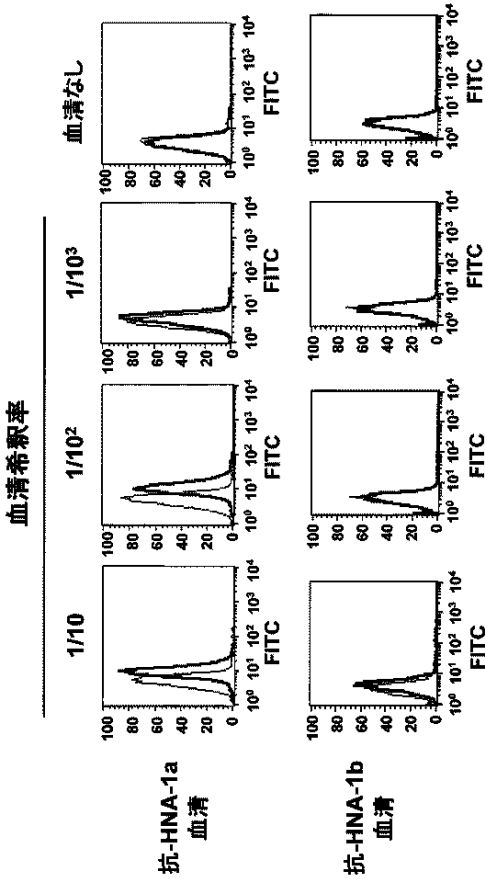
【図 1】



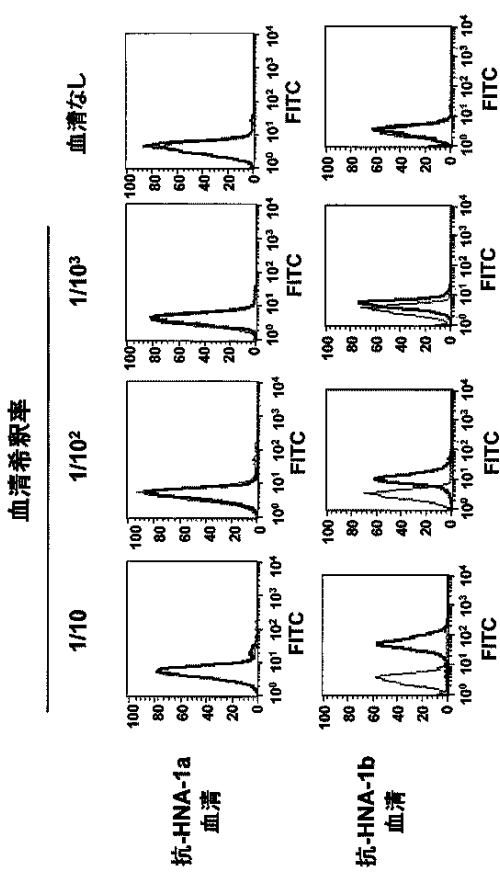
【図 2】



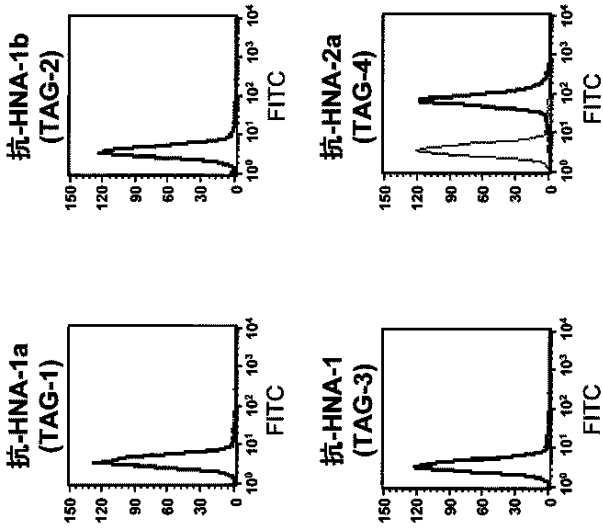
【図 3】



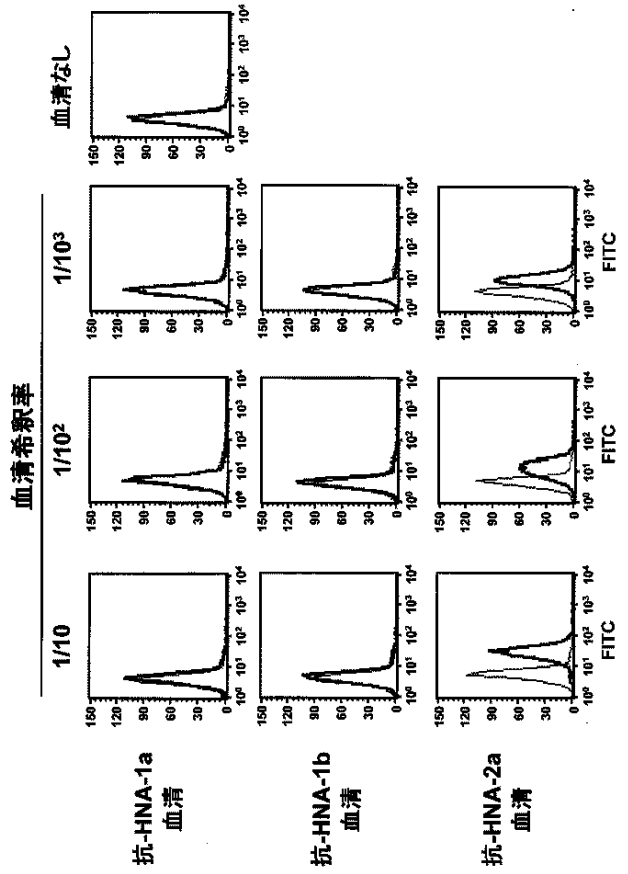
【図 4】



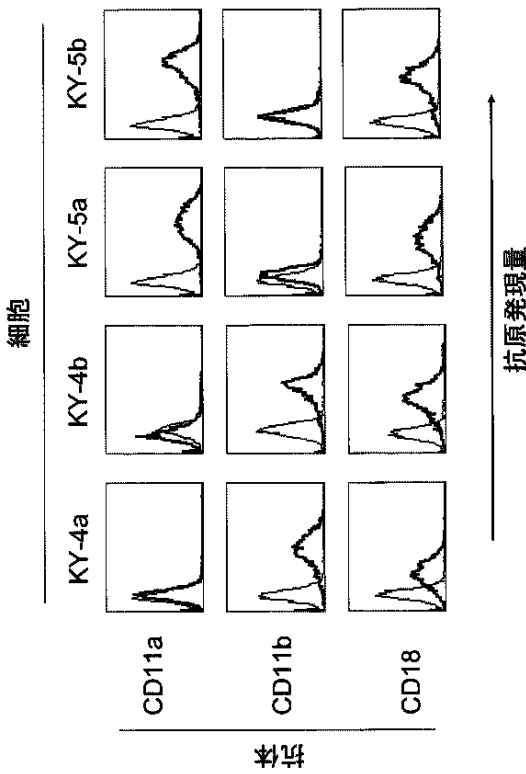
【図 5】



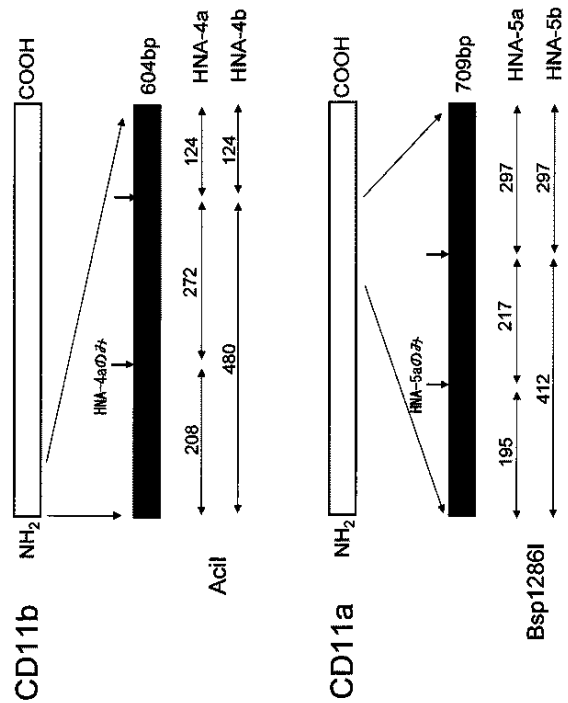
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図9】

プライマー

| CD11b | | CD11a | | |
|--------------|--------------|--------------|-------|---------|
| KY-4a | KY-4b | KY-5a | KY-5b | KY-mock |
| KY-mock (pn) | KY-mock (pn) | KY-mock (pn) | | |

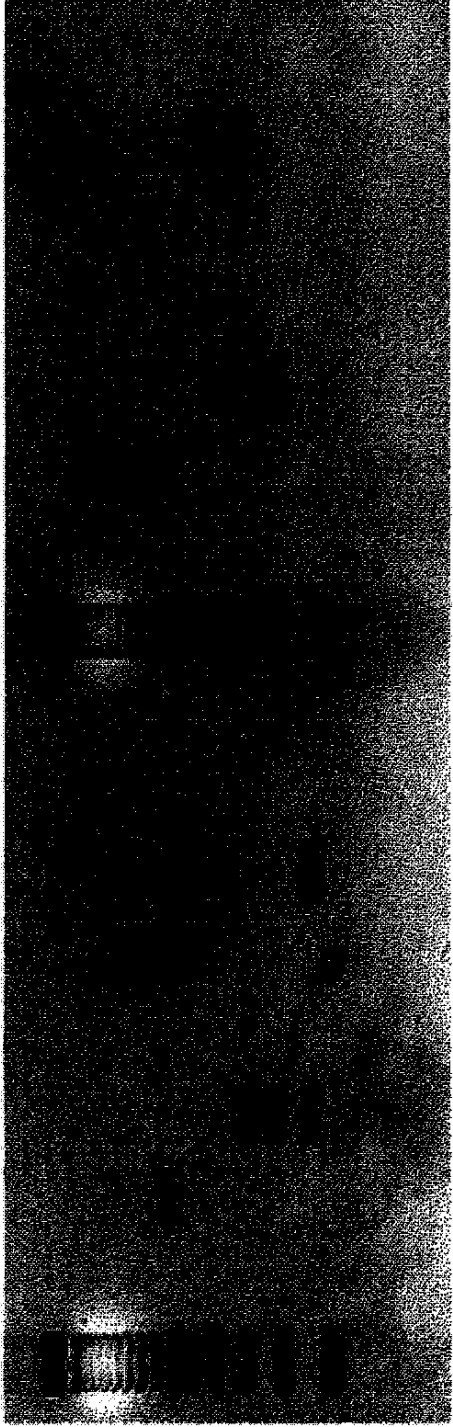
逆転写酵素

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | + | + | - | + | + | + | + | + |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

制限酵素

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | + | + | - | + | - | - | + | + |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

M Acil M Bsp1286I



| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 272 | 480 | 297 | 412 |
| 208 | 124 | 217 | 297 |
| 124 | | 195 | |

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2007/054986 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/10, C07K16/18, C12N15/09, G01N33/53, G01N33/543 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | Ko MIYAZAKI et al., "FCGR3B Idenshi Hatsugen Saibo ni yoru HNA-1a, 1b Panel no Sakusei", Japanese Journal of Transfusion Medicine, 2004, Vol.50, No.2, P.297, P57-0 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| Y | US 2005/003484 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC), 06 January, 2005 (06.01.05), & AU 2002/365938 A1 & CA 2467893 A1 & EP 1458241 A2 & EP 1458241 A4 & WO 2003/065977 A3 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| P, X | Kazuta YASUI et al., "HNA-1a, -1b, -2a Idenshi Hatsugen Panel Saibokabu ni yoru Kesseichu Ko HNA Kotai no Kenshutsu", Ketsueki Jigyo, 2006.08, Vol.29, No.2, p.293, 42 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 01 May, 2007 (01.05.07) | | Date of mailing of the international search report 15 May, 2007 (15.05.07) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054986

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | Fumiya HIRAYAMA, "Karyukyu Kotai no Aratana Kenshutsukei", Ketsueki Jigyo, 2006.08, Vol.29, No.2, P.251, 3-3 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| P,X | Kazuta YASUI et al., "Karyukyu Kotai Kenshutsuyo no HNA-1a, -1b Idenshi Hatsugen Panel Saibokabu no Sakusei", Japanese Journal of Transfusion Medicine, 2006.05, Vol.52, No.2, P.252, 0-51 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| A | VAN KESSEL KPM et al, Quantitation of conjugate formation between human polymorphonuclear leukocytes and antibody-coated target cells by flow cytometry: the role of Fc receptor and LFA-1 antigen., J Leukoc Biol, 1989, Vol. 46, No. 5, p.467-475 | 1-24, 28, 29, 34-37 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054986

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 25-27, 30-33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The "step of preparing a test sample" of claim 25 and the "step of preparing a serum sample from a subject" correspond to the treatment of a human body by surgery or therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054986

Regarding the description of "the cell before the introduction of the DNA does not show..." of claim 1, what is supported by the specification within the meaning of PCT Article 6 and disclosed within the meaning of PCT Article 5 as the cell having such a property is only K562 cell, and specifically what cell other than this is included in the above scope is not clear.

Thus, a search was made for only the part supported by the specification and disclosed, that is, for the case in which the cell before the introduction of the DNA is K562 cell. The same shall apply to claims 2, 3, 5-15, 17-24, 28, 29, 34-37.

A full search was made for claims 4 and 16.

| | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 4 9 8 6 | | | | | | | | | |
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10, C07K16/18, C12N15/09, G01N33/53, G01N33/543 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2007年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2007年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2007年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2007年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2007年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2007年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN) | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | | | | | | | | | |
| Y | 宮崎孔他, FCGR3B 遺伝子発現細胞による HNA-1a, 1b パネルの作製, 日本輸血学会雑誌, 2004, Vol. 50, No. 2, P. 297, P57-0 | 1-24, 28, 29, 34-37 | | | | | | | | | |
| Y | US 2005/003484 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC) 2005.01.06 & AU 2002/365938 A1 & CA 2467893 A1 & EP 1458241 A2 & EP 1458241 A4 & WO 2003/065977 A3 | 1-24, 28, 29, 34-37 | | | | | | | | | |
| P, X | 保井一太他, HNA-1a, -1b, -2a 遺伝子発現パネル細胞株による血清中 抗 HNA 抗体の検出, 血液事業, 2006. 08., Vol. 29, No. 2, P. 293, 42 | 1-24, 28, 29, 34-37 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | | | | | | | | | |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 01.05.2007 | | 国際調査報告の発送日 15.05.2007 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 | 4B 9735 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | | | | | | | | | |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 国際調査報告 | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 4 9 8 6 |
| <p>第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲25-27, 30-33 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲25の「被検サンプルを用意する工程」及び請求の範囲30の「被験体からの血清サンプルを用意する工程」は人の身体の手術又は治療による処置に該当する。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p> | |
| <p>第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。</p> | |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 4 9 8 6 |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P, X | 平山文也, 顆粒球抗体の新たな検出系, 血液事業, 2006. 08., Vol. 29, No. 2, P. 251, 3-3 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| P, X | 保井一太他, 顆粒球抗体検出用の HNA-1a, -1b 遺伝子発現パネル細胞株の作成, 日本輸血学会雑誌, 2006. 05., Vol. 52, No. 2, P. 252, 0-51 | 1-24, 28, 29, 34-37 |
| A | VAN KESSEL KPM et al, Quantitation of conjugate formation between human polymorphonuclear leukocytes and antibody-coated target cells by flow cytometry: the role of Fc receptor and LFA-1 antigen., J Leukoc Biol, 1989, Vol. 46, No. 5, p. 467-475 | 1-24, 28, 29, 34-37 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/054986

請求の範囲1の「前記DNAを導入する前の細胞が・・・示さないものである」との記載について、このような性質を有する細胞としてPCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、K562細胞のみであり、これ以外の細胞については具体的にどのような細胞が上記範囲に含まれるのか不明である。

よって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわちDNAを導入する前の細胞がK562細胞の場合についてのみ行った。請求の範囲2、3、5乃至15、17乃至24、28、29、34乃至37についても同様である。

また、請求の範囲4及び16については完全な調査を行った。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(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

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA31 CA04 CA20 DA03 EA02 FA10 GA13 GA18
GA27 HA11 HA20
4B064 AG31 CA10 CA19
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA05 BA24 BA25 CA43 CA44
CA46

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于检测粒细胞抗体的平板细胞 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2007108368A1 | 公开(公告)日 | 2009-08-06 |
| 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 | | |
| [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.B C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/543.597 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/FA10 4B024/GA13 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA11 4B024/HA20 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA24 4B065/BA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 | | |
| 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 | JP5172657B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

公开了用于检测抗HNA抗体的小组细胞。通过将编码对应于抗HNA抗体的HNA抗原的DNA以可在用于检测操作的条件下表达的形式引入细胞中来获得该组细胞，并引入DNA治疗前细胞为抗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抗体和来自健康受试者的血清通过检测操作未显示可检测的反应。该面板细胞可以准确，快速地检测粒细胞抗体。

