

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 536072

(P2003 - 536072A)

(43)公表日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	K 4 B 0 6 3 D Y
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/543	545	G 0 1 N 33/543	545 A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 30数)

(21)出願番号 特願2002 - 502438(P2002 - 502438)

(86) (22)出願日 平成13年5月31日(2001.5.31)

(85)翻訳文提出日 平成14年12月5日(2002.12.5)

(86)国際出願番号 PCT/NL01/00421

(87)国際公開番号 W001/094940

(87)国際公開日 平成13年12月13日(2001.12.13)

(31)優先権主張番号 00201975.0

(32)優先日 平成12年6月5日(2000.6.5)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 ステイヒティング・サンキン・ブロードボ
ールジーニング

オランダ・エヌエル - 1066シーエツクス

アムステルダム・プレスマンラーン125

(72)発明者 ハク, コルネリス

オランダ・エヌエル - 1111エヌデイ デイ

ーメン・バンデイークストラート21

(72)発明者 グールミ, エルサ・アフラ・ジユリア・マ
リア

オランダ・エヌエル - 2343ピーシー オグ
ストゲースト・ビイドルプランン2

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組織適合性の試験方法

(57)【要約】

増殖が不可能となるように処理されている潜在的な器官移植片のドナーもしくはレシピエントのリンパ球である刺激体細胞を、増殖が可能でありかつ細胞傷害性のエフェクター細胞を包含する潜在的な器官移植片のレシピエントもしくはドナーのリンパ球である応答体細胞と共培養し、そして前記細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒を決定する、機能的組織適合性試験。細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞のような細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒は、共培養物上清でのイムノアッセイによってグランザイムもしくはパーフォリンのような顆粒の構成成分を測定することにより決定してよい。機能的な組織適合性のこの新たな試験方法を、HLA型分類によつてのドナー - レシピエント対の予備選択後に使用してよい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 刺激体細胞を、細胞傷害性のエフェクター細胞を包含する応答体細胞と共培養すること、および前記細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒を決定することを含んで成る、機能的な組織適合性の試験方法。

【請求項2】 前記刺激体細胞が潜在的な器官移植片ドナーからのリンパ球でありかつ前記応答体細胞が潜在的な器官移植片レシピエントからのリンパ球であるか、もしくは、前記刺激体細胞が潜在的な器官移植片レシピエントからのリンパ球でありかつ前記応答体細胞が潜在的な器官移植片ドナーからのリンパ球である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記刺激体細胞が潜在的な器官移植片ドナーからの末梢血単核細胞（P B M C）でありかつ前記応答体細胞が潜在的な器官移植片レシピエントからのエフェクター免疫細胞であるか、もしくは、前記刺激体細胞が潜在的な器官移植片レシピエントからの末梢血単核細胞でありかつ前記応答体細胞が潜在的な器官移植片ドナーからのエフェクター免疫細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記器官移植片が固形臓器移植片、骨髄移植片および幹細胞移植片よりなる群から選択される、請求項2もしくは請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記刺激体細胞が増殖の能力を欠く、請求項1 - 4のいずれか1つ記載の方法。

【請求項6】 前記刺激体細胞が、それらの増殖能力を破壊するよう照射されている、請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記応答体細胞が細胞傷害性Tリンパ球（C T L）および/もしくはナチュラルキラー細胞（N K）である、請求項1 - 6のいずれか1つ記載の方法。

【請求項8】 細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒が、共培養物上清中の顆粒の構成成分を測定することにより決定される、請求項1 - 7のいずれか1つ記載の方法。

【請求項9】 前記顆粒の構成成分がグランザイムである、請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記グランザイムがグランザイムAおよび/もしくはグランザイムBである、請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記顆粒の構成成分がパーフォリンである、請求項8記載の方法。

【請求項12】 前記顆粒の構成成分がイムノアッセイにより測定される、請求項8-11のいずれか1つ記載の方法。

【請求項13】 前記イムノアッセイが酵素免疫測定法(ELISA)である、請求項12記載の方法。

【請求項14】 HLAの型分類、次いで選択されたドナー-レシピエント対についての機能的組織適合性試験を含んで成り、ここで、前記機能的組織適合性試験が請求項1-13のいずれか1つ記載の方法により実施される、潜在的な器官移植片のドナーとレシピエントとの間の組織(不)適合性の評価方法。

【請求項15】 前記ドナー-レシピエント対がHLAの血清型分類に基づき選択される、請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は移植免疫学の分野にあり、そして、移植片のドナーとレシピエントとの間の主要およびマイナー組織適合性の不適合の新規評価方法を記述する。前記不適合は器官移植後の重大な合併症、すなわちレシピエントの細胞傷害性Tリンパ球（CTL）によるインビボの移植片の拒絶、もしくはレシピエント中でのドナーのTリンパ球による対宿主性移植片病を引き起こすかもしれない。本発明の応用は、固形臓器、骨髄もしくは幹細胞の移植のための至適のドナー - レシピエントの組合せの選択を助長することができる。

【0002】**(発明の背景)**

本発明は、移植免疫学、および器官移植片を受領する患者における移植片拒絶もしくは対宿主性移植片病（GVHD）の危険のインビトロの評価方法に向けられる。こうした患者は、固形臓器、骨髄もしくは幹細胞移植片を受領するものを包含する。

【0003】

ヒト白血球抗原（HLA）系ともまた呼ばれる主要組織適合遺伝子複合体（MHC）は、多様なTリンパ球サブセットへの抗原ペプチドの提示に関与する多数の膜タンパク質よりなる。MHC分子の2種の主要な分類が識別されており、クラスIは身体中の全部の有核細胞および血小板上に存在し、そしてより制限された分布を有するクラスII分子は主としてマクロファージ、単球、Bリンパ球および樹状細胞のようないわゆる抗原提示細胞（APC）上に存在する。これらのAPCはTヘルパーリンパ球（TH）に抗原を提示することにより特異的免疫応答を開始する。双方のMHCのクラスは、適合する特異的抗原受容体を含有するリンパ球に抗原のペプチドを提示する特性を共有する。MHCクラスI分子は、CD8陽性T細胞（細胞傷害性Tリンパ球（CTL）である）上の抗原受容体にペプチドを提示する一方、MHCクラスII分子は、CD4陽性リンパ球（THである）にペプチドを提示する。細胞上のクラスI分子により提示されるペプ

チドへのCTLの結合は、後者の溶解につながる、そのMHCクラスIを担持する細胞に対するCTLの細胞傷害性の活性を誘導する。HLAクラスII陽性のAPCにより提示されるペプチドへのTHの結合は、とりわけAPCが同様に他の分子を介して後者の細胞と相互作用する場合に（例えばTH上のCD28分子とAPC上のB7分子）、これらのTHの増殖および分化を誘導するかもしれない。APCにより適切に誘導されたTHは、他の免疫細胞が特異的抗体およびCTLを生成させかつマクロファージを刺激するのを効果的に助けることが可能である。従って、MHC分子は、特異的免疫応答の誘導（MHCクラスII）ならびにCTLのエフェクター機能（MFCクラスI）において決定的に重要な役割を担っている。

【0004】

MHCクラスI分子は、別のタンパク質すなわち 2 - ミクログロブリンと一緒にあって4ドメイン構造（2ドメインがペプチドの結合部位としてはたらく溝様構造に寄与する）を形成する単一のペプチド鎖よりなる。対照的に、MHCクラスII分子は2本のペプチド鎖すなわち1本の および1本の 鎖よりなり、これらもまたMHCクラスI分子と同様に4ドメイン構造を形成する。クラスII分子の場合もまた、これらのドメインの2個（一方は 鎖からかつ他方は 鎖から発する）と一緒にペプチド結合溝を構成する。MHCクラスIおよびII分子は、それぞれ、ヒトにおいてそれぞれHLA - A、 - Bおよび - C、ならびにHLA - DP、 - DRおよび - DQ分子を生じさせる第6染色体上に配置される最低3種の異なる遺伝子によりコードされる。

【0005】

MHC分子は、とりわけペプチド結合溝に寄与するアミノ酸に関して、集団内で広範なアロタイプの変動を表す。これゆえに、大部分の個体は各MHC分子についてヘテロ接合性であり、そしてそれらの細胞上に6種の異なるMHCクラスI分子および最低6種の異なるMHCクラスII分子を有する。一個体のMHC分子の正確な組成はHLA表現型と呼ばれる。注目すべきことに、2個の関係しない個体が同一のHLA表現型を共有する可能性は事実上ゼロである。移植の設定において、MHC分子はしばしばMHCもしくはHLA抗原と呼ばれる。それ

らが頻繁にレシピエント中で免疫反応を生じさせるからである。これゆえに、これらの分子はHLAクラスIもしくはII抗原とさらに称される。

【0006】

多数の疾患、とりわけ腎不全、心不全、多様な血液学的疾患、充実性腫瘍のような多様な悪性病変、ならびに自己免疫疾患は、現在、疾患に罹っていない個体すなわちドナーから患者すなわちレシピエントへの器官の移植により治療する。移植される器官は、腎、心、肺、肝、膵、ランゲルハンス島もしくは骨髄を包含する。上に述べられたとおり、2個の関係しない個体が正確に同一のHLA抗原を有する可能性は事実上ゼロである。これゆえに、移植される器官、もしくは同種移植片は、レシピエントにより共有されない1種もしくはそれ以上のHLA抗原を頻繁にもつ。すなわち、ドナーとレシピエントとの間にHLAの不適合が存在する。これらの不適合はHLA分子のアロタイプの変異（主要HLA抗原の不適合）によるのみならず、しかしまたHLA分子により提示される内因性ペプチド間のアロタイプの差異（いわゆるマイナー組織適合性抗原[mHag]の不適合）にもよる。結果として、同種移植片の細胞上の異なるHLA分子がレシピエントのTリンパ球により認識され、そしてこれらの細胞に対するCTL応答を惹起する。レシピエントのCTLが同種移植片の細胞上の異なるHLA分子に結合しかつこれらの細胞を溶解して、移植片の拒絶および機能不全に至ることができる。1人の人から別の人への骨髄もしくは幹細胞の移植（同種骨髄移植[BMT]）は、レシピエントのTHおよびCTLを包含するリンパ球が除去されかつドナーのリンパ球により置き換えられているために特別の状況を生じさせる。骨髄移植片のドナーとレシピエントとの間の主要もしくはマイナー組織適合性抗原の不適合の場合、ドナーのリンパ球は宿主の細胞に対する免疫反応を誘導することができる、これはこれらの細胞の破壊につながるができる。宿主の細胞に対するドナーのリンパ球のこの反応は、臨床上対宿主性移植片病(CVHD)として明らかになり、そして同種BMTの重症かつときに致死的な合併症である。現在、GVHDはBMTの大きな障害を形成する。

【0007】

移植片拒絶およびGVHDの治療において有意の進歩がなされているとは言え

、現代の免疫抑制療法はこれらの合併症を常に予防することができるわけではなく、また、しばしば重症の免疫抑制につながり、それはときにレシピエントにおいて重症の病的状態およびときに同様に死亡につながるかもしれない。これゆえに、同種移植片拒絶およびGVHDの予防は移植医学における大きな一懸念である。

【0008】

最近数十年間の研究は、同種移植片拒絶もしくはGVHDの発生がドナーとレシピエントとの間のHLAの不適合の数、すなわちドナーとレシピエントとの間で似ていないHLA分子の数に関係することをはっきりと示した。これゆえに、日常の実務においては、レシピエントおよびドナーのHLAの表現型および遺伝子型を、多数の標準的な血清学的および分子組織適合性型分類技術を使用して最初に決定する。その後、可能な限り多くのHLA IおよびII分子を共有するドナー - レシピエント対を選択する。

【0009】

HLA型分類は、以下の理由から、適するドナー - レシピエント対を選択するのに十分でない。すなわち、1) 関係しない対はめったに同一のHLAの表現型 / 遺伝子型を有しない。これゆえに、ドナーとレシピエントとの間の1個もしくはそれ以上さえの不適合が日常の実務において頻繁に起こる。2) 遺伝子型変異体は必ずしも免疫応答を誘導することが可能である必要はない。3) MHCクラスIおよびIIの差異に加えて、マイナー組織適合性抗原と命名される多様な他の抗原が移植片拒絶もしくはもしくはGVHDを誘導するかもしれないことが十分に確立されている (Goulmyら 1996、N. Engl. J. Med. 334:281)。これゆえに、ドナーとレシピエントとの間のMHC IおよびIIの完全な適合でさえ、移植片拒絶もしくはGVHDがレシピエントで発生することができないことを保証しない。これらの理由から、HLA型分類を使用して多様なドナー - レシピエント対を選択し、これらの対をそうしてその後機能的組織適合性について試験し、そして最良に合致する対を最終的に移植に選択する (Lie JLTら、"Histocompatibility typing procedures for selecting allogene

ic hematopoietic stem cell donors”、Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation、K. Atkinsonにより編、ケンブリッジ大学出版局 (Cambridge University Press)、第2版、2000中、1057 - 1072)。機能的組織適合性についての試験は困難、高価であり、そしてそれらの有用性は未だ論争の余地がある。増大する数の関係しないドナー - レシピエントの組合せと組み合わせられたなお拡大するHLAの多形に鑑み、単純かつ迅速なドナー選択手順が必要とされる。本発明はこうした手順を提供する。

【0010】

本発明を詳細に説明する前に、機能的組織適合性試験の現在のアッセイの背景を最初に示す。ドナーとレシピエントとの間の組織適合性はいくつかの機能的試験を用いて試験する。最も古い方法はいわゆるリンパ球混合反応もしくはリンパ球混合培養 (MLC) である。固形臓器移植の場合、このアッセイは、ドナーの照射された末梢血単核細胞 (PBMC)、例えば20 Gyに暴露された 5×10^4 個の細胞を、レシピエントの等しい数の照射されないPBMCとともに37で数日間培養することにより実施することができる。照射された細胞は、照射に際してそれらが今後増殖できずかつレシピエントの細胞すなわち応答細胞 (responding cell) を活性化されたようにしか増殖するよう刺激するようにのみはたらくため、刺激体 (stimulator) 細胞と呼ばれる。このインキュベーション後に、レシピエントの細胞の増殖応答を、 $^3\text{[H]}$ -チミジンとの数 (例えば12 ~ 16) 時間のインキュベーションにより測定する。MLC中の刺激するリンパ球と応答するリンパ球との間のMHCクラスIもしくはII分子の差異の場合、後者が活性化されたようになることができ、そしてとりわけインターロイキン (IL) - 2のようなサイトカインの産生を介して増殖することができる、それは $^3\text{[H]}$ -チミジンの取り込みにつながる。この放射活性同位体の取り込みは液体シンチレーション計数器により評価することができる。ドナーとレシピエントとの間のMHC分子の差異が大きくなるほど、 $^3\text{[H]}$ -チミジンが多く取り込まれる。BMTの場合、レシピエントのP

BMCを照射しかつレシピエントの細胞に対するドナーのPBMCの応答を測定することを除いて、類似の種類をMLCを実施する。

【0011】

MLCアッセイは、何十年もの間、組織不適合性を評価するための最高基準であった。しかしながらこのアッセイはいくつかの欠点を有する。すなわち、1)それは細胞の性質に依存しない培養系での増殖を測定する。関連性のない細胞の増殖が測定される可能性を低下させるために、いくつかの困難な制御が包含される。2)主としてTH細胞の増殖がMLC中で応答していると一般に想定される。これらの細胞の活性化および増殖は細胞傷害性のエフェクター応答の発生に不可欠であるとは言え、後者の集団(すなわち細胞傷害性のエフェクター細胞)の活性化および増殖の測定は、移植後に臨床的合併症を発症する可能性に関してより有用な情報を提供するかもしれない。3)実務において、MLCは、細胞培養施設ならびに放射活性同位体を用いて作業するための施設を必要とする困難なアッセイである。

【0012】

MLCの欠点のいくつかを緩和するために、研究者たちはこのアッセイを改変することを試みた。改変は、細胞により産生されるmRNAを評価すること、または細胞もしくはMLCの上清中のタンパク質の測定のいずれかによる、MLC中のIL-2もしくはインターフェロン- γ のようなサイトカインの誘導の分析を包含する(Tanakiら、1994、Br. J. Haematol. 87: 415)。これらのアプローチは、それらが放射標識された同位体のための特別の施設を必要としないという利点を有するが、しかし、PBMCが例えば低濃度のエンドトキシン(培地中に頻繁に存在する)のような多様な刺激により誘導されることに際してサイトカインを産生するかもしれないという欠点を有する。

【0013】

別の改変は、MLCの間の細胞のセリンエステラーゼ活性の発生の組織化学的測定を包含する(Maiocchiら、1998、Haematologica 83: 686)。このアプローチはいくつかの欠点を有する。すなわち、1)このアッセイで使用される組織化学的基質は、いくつかの細胞内プロテアーゼを

包含する多くのセリンプロテアーゼにより変換される可能性がある。2) 該アッセイは細胞の(困難な)分析を必要とする。3) とりわけ、NK細胞およびより少ない程度までCTLはバックグラウンドレベルのグランザイムを含有し、それはインビボならびにインビトロで存在するかもしれないようなIL-2のような多様なサイトカインの存在下で増加することができる。これゆえに、バックグラウンドの発現および合成の非特異的誘導が、この改変されたMLCの結果を不鮮明にするかもしれない。おそらく上に概説された理由から、該改変されたMLCは³[H]-チミジンの取り込みを測定する古典的MLCに取って変わっていない。

【0014】

MLCの代替として、CTL前駆細胞(CTL-p)もしくはTH前駆細胞(TH-p)の頻度の測定が、ドナーとレシピエントとの間の組織適合性を評価するために提言されている。これらのアッセイにおいて、PBMCの希釈物を刺激細胞とともにインキュベートする。応答を、TH-pの頻度を測定する場合に³[H]-チミジンの取り込みとして測定する。よりしばしば、刺激細胞の溶解を⁵¹[Cr]放出アッセイ(CTL-pの頻度の尺度を提供する)を用いて測定する。³[H]-チミジンの有意の取り込みもしくは⁵¹[Cr]の放出が観察される応答細胞の希釈が大きくなるほど、患者(もしくはドナー)中のTH-pもしくはCTL-pの頻度が大きくなる。

【0015】

これらのアッセイの欠点は：1) それらは実施するのが非常に困難でありかつ多数の細胞を必要とする。2) それらはとりわけ放射活性同位体を使用するために特別の実験室施設を必要とする。3) これらのアッセイの結果は、レシピエントにおける移植片拒絶もしくはGVHDの発生と一致しない関係を示す、である。

【0016】

結論として、ドナーとレシピエントとの間の組織適合性を評価するための完全な試験は存在しない。

【0017】

本発明は、上で論考された懸念の大部分を未然に防ぐ機能的な組織適合性の試験方法を記述する。すなわち、1)それは移植片拒絶もしくはGVHDに關与するエフェクターの機構、すなわち細胞傷害性の細胞の活性化および脱顆粒を直接かつ特異的に測定する。2)それは特別の実験室施設を必要とせず、かつ、単純なE l i s a 読取り器で測定することができる。3)それが37 で96時間の細胞の培養を必要とすることを除き、それは実施するのが容易である。

【0018】

古典的なHLAの血清型分類と組合せの本アッセイの応用は、移植のための適するドナー-レシピエント対の新たな迅速かつ安価な選択方法を提供するかもしれない。すなわち、対を古典的HLA血清学により(高価なHLA遺伝子型分類なしで)選択し、そして新たなアッセイ、すなわちMLCの間のグランザイムの放出の測定により組織適合性について機能的に試験する。

【0019】

ドナーとレシピエントとの間の主要およびマイナー組織適合性抗原の不適合の場合、レシピエントのCTLは同種移植片の細胞上の多様なHLA分子を認識し、活性化されたようになり、そしてこれらの細胞を殺す。同種BMT後のGVHDの場合は、ドナーのCTLおよびおそらくナチュラルキラー(NK)細胞が、類似の様式でレシピエントの多様な器官の細胞と相互作用する。本発明の原理を説明する前に、CTLの殺傷機構の分子機構を論考することが必要である。

【0020】

活性化された細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、少なくとも2種の異なる機構によりそれらの標的細胞中でアポトーシスを誘導することができる(Lowinら、1994、Nature 370:650;Kagiら、1994、Nature 369:31)。標的細胞中でのアポトーシスに至る一経路はFasに媒介される経路を、他者は顆粒エキソサイトーシス経路を伴う。

【0021】

第一の経路は、Fasリガンド(Fas-L)と命名される活性化されたCTLの膜上の適切な対分子による、Fas(もしくはAPO-1)と呼ばれる標的細胞上の膜タンパク質の誘導を必要とする。標的細胞において、これは、Fas

分子の細胞内部分に配置されるいわゆる死のドメインのオリゴマー化につながる
ことができる。このオリゴマー化が、いくつかの他の分子を介して、標的細胞中
のエフェクター、カスパーゼ（特別の特異性をもつシステインプロテイナーゼ）
の活性化につながり、これがその後多様な不可欠の細胞内タンパク質を切断し、
それがDNAの分解およびアポトーシス性の細胞死につながる。

【0022】

脱顆粒経路は、パーフォリン、グランザイム（顆粒関連酵素（Granule
- associated enzyme）を表す）、およびCTLの細胞傷害性
顆粒中に貯蔵されるT細胞に制限される細胞内抗原（T cell restr
icted intracellular antigen）（TIA-1）を
包含する多数のタンパク質を含んで成る。標的細胞とのCTLの接触に際して、
これらの細胞質顆粒が接触領域に向けられ、その後それらの構成成分が細胞内空
隙に放出される。細胞外カルシウムの存在下で、パーフォリン分子は標的細胞の
膜中に挿入する膜貫通チャンネルに重合し（MassonとTschopp、1
985、J Biol Chem 260:9069；Podack、1985
、Immunol Today 6:21）、それにより他の顆粒タンパク質、
とりわけグランザイムを標的細胞に進入させる。標的細胞の細胞質中で、グラン
ザイムは直接（すなわち付加的なシグナル伝達過程に対する必要なしに）エフェ
クター、カスパーゼを活性化し、それが順にアポトーシスを実施する。これゆえ
に、CTLによるグランザイムの放出は大部分の細胞傷害性反応における重要な
事象である。

【0023】

われわれは、ここで、MLCの上清中のグランザイムAもしくはBの放出がド
ナーとレシピエントとの間のMHCの不適合の数と相関し、そしてBMT後の重
症のGVHDの発生を予測することを示す。さらに、ドナーおよびレシピエント
のリンパ球の共培養の間のグランザイムの放出を、定量的かつ感受性の酵素免疫
測定法（E l i s a）により測定することができる。これゆえに、本発明は、実
施するのがより容易であり、より少なく特殊化された施設を必要とし、かつML
C試験および広範囲の分子のHLA型分類より少なく高価である方法を提供する

。

【0024】

本発明は、幹細胞レシピエントとそれらの潜在的ドナーとの間の主要およびマイナー組織適合性抗原の差異を同定することを可能にし、そして同種BMTで治療された患者におけるGVHDの発生を予測することができる。

【0025】

(発明の要約)

本発明は、ドナーおよびレシピエントのリンパ球の共培養物中のCTLの脱顆粒の評価が、ドナーとレシピエントとの間のMHCの不適合の数と相関し、そして同種BMTを受領する患者における重症のGVHDの発生を予測するという知見を使用する。本発明は、これらの共培養物中でのCTLの前記脱顆粒の測定方法を企図する。

【0026】

本明細書で、ドナーおよびレシピエントのリンパ球を、ドナーの末梢血単核細胞(PBMC)をレシピエントのPBMCと混合することにより共培養していわゆるリンパ球混合培養物もしくはMLCを生じさせることが好ましい。例えば腎移植のためにドナー細胞に対するレシピエントのリンパ球の反応性を試験しなければならない場合には、ドナーのPBMCを照射する(刺激リンパ球)一方、レシピエントのものは照射しない(応答リンパ球)。BMTでそうであるように、レシピエントの細胞に対するドナーリンパ球の反応性を評価しなければならない場合、レシピエントのPBMCを照射する。その後、ドナーおよびレシピエントのPBMCを例えば37℃で96時間インキュベートする。その後、CTLの脱顆粒の間に放出される構成成分の測定のために上清を収穫する。

【0027】

本発明によれば、MLRの間のCTLの脱顆粒を決定するための好ましい態様は、上清中の可溶性グランザイム、とりわけ可溶性グランザイムAもしくはBの量を定量することである。しかしながら、活性化されたCTLにより放出される他の化合物、例えばパーフォリンもまた測定することができる。あるいは、例えばいわゆるElispotアッセイにより、グランザイム放出細胞(もしくは他

の細胞傷害性顆粒成分放出細胞)の数を評価することができる。

【0028】

M L Cの上清中のグランザイムAもしくはBの濃度の便宜的かつ好ましい一評価方法は、Spaeny - Dekkingら(J. Immunol. 1998; 160:3610-6)により記述されるE l i s aである。多くのグランザイムがM L Cの間に放出されるほど、照射されないC T Lの活性化および反応性が強くなる。

【0029】

本発明は、本発明の以下の記述の考慮後により完全に理解されるであろう。

【0030】

(発明の詳細な記述)

本発明は、細胞傷害性のエフェクター細胞を包含する応答体細胞と刺激体細胞を共培養すること、および前記細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒を決定することを含んで成る、機能的な組織適合性の新規試験方法を提供する。

【0031】

前記刺激体細胞は潜在的な器官移植片ドナーからのリンパ球である一方、前記応答体細胞は潜在的な器官移植片レシピエントからのリンパ球であるか、もしくは、前記刺激体細胞は潜在的な器官移植片レシピエントからのリンパ球である一方、前記応答体細胞は潜在的な器官移植片ドナーからのリンパ球であるかのいずれかである。

【0032】

問題の器官移植片はとりわけ制限されず、そして、固形臓器移植片、骨髄移植片および幹細胞移植片よりなる群から広範に選択してよい。固形臓器移植片は、腎、肝、心、肺、膵、ランゲルハンス島などの移植片を含んで成る。

【0033】

刺激体細胞として使用される細胞は増殖の能力を欠く。細胞の増殖の能力を破壊するいかなる処理も適用してよい。実務上、こうした処理は適切な量の放射線を用いる照射を含んで成る。

【0034】

本明細書で使用される「細胞傷害性のエフェクター細胞」という用語は、とりわけ細胞傷害性Tリンパ球（CTL）および/もしくはナチュラルキラー細胞（NK）を指す。該用語は、とりわけTヘルパーリンパ球のような他の型のリンパ球と区別する。

【0035】

本発明によれば、細胞傷害性のエフェクター細胞の脱顆粒は、好ましくは共培養物上清中で顆粒の構成成分を測定することにより決定する。顆粒の構成成分は、好ましくはグランザイムAもしくはグランザイムBのような1種のグランザイム、または双方である。しかしながら、例えばパーフォリンのようないずれの顆粒の構成成分を代わりに測定してもよい。実務上、顆粒の構成成分は酵素免疫測定法（ALISA）によるようなイムノアッセイにより測定する。

【0036】

本発明はまた、HLA型分類、次いで選択されたドナー-レシピエント対についての機能的組織適合性試験を含んで成る、潜在的な器官移植片のドナーとレシピエントとの間の組織（不）適合性の評価方法も提供し、ここで、前記機能的組織適合性試験は本明細書に記述される方法により実施する。ドナー-レシピエント対の選択は、HLA遺伝子型分類を包含するいかなるHLA型分類法に基づいて行ってもよいとは言え、HLA血清型分類に基づき選択を行うことが実務的根拠から好ましい。

【0037】

本発明は、CTLもしくはNK細胞の顆粒からの構成成分がMLCの間に上清中に放出されること、また、こうした放出は刺激体（レシピエントもしくはドナー）の細胞に対する応答体（ドナーもしくはレシピエント）の細胞傷害性の活性を緊密に反映することの理解に基づく。MLCの上清中のこれらの構成成分の測定は、HLA不適合の数、ならびに骨髄同種移植片のレシピエントにおけるGVHDの発生および重症度に関係する。これはグランザイムの放出を評価することにより具体的に説明されるが、しかし、本発明は決して、グランザイムのみが本発明の範囲内にあると意図しているほど狭く解釈されるべきでない。細胞傷害性の顆粒からMLCの間に放出される事実上すべての構成成分が本発明の範囲内に

あることを意図している。

【0038】

ドナーとレシピエントとの間の組織適合性の最も広範に許容できる試験方法は、前の段落で論考されるMLCである。MLCにおいては、ドナーおよびレシピエントからの細胞を37℃で96時間共培養し、その後、³[H]-チミジンの取込みを評価することにより応答細胞の増殖を測定する。応答細胞は、この系で増殖しているいかなる細胞であることもできる。本発明はまた、刺激および応答リンパ球の共培養も含んで成るが、しかし、(ELISAを用いて)評価するのがより容易であるのみならずしかしまた細胞傷害性T細胞(インビボで拒絶もしくはGVHDを引き起こす細胞である)の活性化もより直接的に反映するパラメータを測定する。従って、従来の方法と比較して、本発明は、実施するのがより容易でありかつ移植片拒絶もしくはGVHDの根底にある基礎的な発病の機構をより特異的に反映する方法を提供する。

【0039】

本発明は今や、いくつかの実施例を用いて具体的に説明することができる。これらの実施例は、同種BMTのドナーとアクセプターとの間の組織不適合性を評価するための本発明の応用に焦点を合わせている。

実施例

材料および方法

末梢血単核細胞(PBMC)の調製:血液サンプルを、インフォームド・コンセントの後に、ドナー、および彼らの疾患の治療後しかしBMTのためのいずれかの調整の前の患者から得た。PBMCは密度勾配遠心分離(ニコメド ファルマ AS (Nycomed Pharma AS)、ノルウェー・オスロ)によりヘパリン処理された静脈血から分離した。細胞を2回洗浄し、そして、2mM/l L-グルタミン(ギブコ(Gibco))、1%抗生物質(ギブコ(Gibco))および20%熱不活性化ヒト血清を補充されたRPMI 1640培地(ギブコ BRL (Gibco BRL)、ライフ テクノロジーズ リミテッド(Life Technologies Ltd)、スコットランド・ペーズリー)よりなる培地に再懸濁した。

【0040】

MLC：ドナーのPBMC (5×10^4 個)を、加湿された5%CO₂/95%空気雰囲気中37℃で200μlの培地中、 5×10^4 個の照射された(20Gy)患者のPBMCと共培養した。第4日に、GrAおよびGrB測定のための上清を各ウェルから収穫し、そして使用まで-20℃で保存した。その後、細胞を2μCiの³[H]-チミジン(40~60Ci/mMol、アマーシャム(Amersham)、イリノイ州アーリントンハイツ)に12~16時間暴露し、収穫し、そして³[H]-チンジンの取り込みを液体シンチレーション計数器(ベックマン(Beckman)、アイルランド・ガルウェイ)で測定した。結果は三重の値の1分あたりのカウントの中央値として表す。MLCのRR%は以下のとおり計算した。すなわち、古典的MLCでのRR%を、式：応答体のcpm[レシピエント]：刺激体のcpm[ドナー]-応答体のcpm[レシピエント] / 応答体のcpm[レシピエント]：刺激体のcpm[プール]-応答体のcpm[レシピエント]：刺激体のcpm[レシピエント] × 100%に従って計算した。プールは3種の異なるHLAが不適合のドナーに対するレシピエントの細胞の応答を表し、RR%の計算のためにこれら3回の分析の中央値を使用した。参照値は関係しない対照による刺激に対する応答の中央値である。

【0041】

HLA型分類：全部の患者およびドナーを、HLAクラスIおよびクラスIIについて血清学により型分類した。HLA-A、-B、-C型分類は標準的なNIHリンパ細胞傷害性アッセイを使用して行い、また、HLA-DRおよび-DQ型分類は、同種抗血清を使用する2色蛍光アッセイを用いて実施した。HLA遺伝子型は、HLA-DRB1、3、4、5および-DQB1に対する配列特異的プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により決定した。HLA-DPB1の型分類はPCR配列特異的オリゴヌクレオチドを用いて行った。

【0042】

GrAおよびGrBについてのELISA：モノクローナル抗体(mAb)の精製、ならびにGrAおよびGrBについてのELISAは記述されたとおり(

Spaeny - Dekkingら 1998、J. Immunol. 160: 3610) 実施した。簡潔には、マイクロタイタープレートを、グランザイムAもしくはBに対するモノクローナル抗体(mAb)、好ましくは0.5 µg/mlのmAb GA 29 (GrAに対して)もしくはGB11 (GrBに対して)の濃度のそれぞれmAb GA 29もしくはmAb GB11 (Dept. of Immune Reagents of the Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB)、オランダ・アムステルダム)で4で16時間被覆した。残余の結合部位をPBS/2% (v/v)牛乳との45分のインキュベーションによりブロッキングした。その後、MLCの上清の少量のアリコートを高性能Elisa緩衝液(CLB)と混合し、そしてmAb被覆されたプレート中で1時間インキュベートした。最後に、結合されたグランザイムAもしくはBを、1% (v/v)正常マウス血清中の適切なグランザイムに対するビオチニル化mAb、好ましくはmAb GA 28もしくはmAb GB10 (CLB)とのインキュベーション、次いでストレプトアビジンに結合された重合されたワサビペルオキシダーゼ(CLB)とのインキュベーションにより検出する。反応を、0.11 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中のペルオキシダーゼ基質、好ましくは3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(100 µg/ml;メルク(Merck)、ドイツ・ダルムシュタット)および0.003% (v/v) H₂O₂とのインキュベーションにより可視化する。等量の2 M H₂SO₄を添加することにより反応を停止した後に、450 nmの吸光度を、タイター-テック マルチスキャン(Titer-Tek Multiscan)プレートリーダー(ラブシステムズ(Labsystems)、フィンランド・ヘルシンキ)により測定した。

【0043】

統計学的分析：記述統計学は中央値および第一～第三四分位数範囲として示す。Spearman相関係数を使用して、GrA、GrB、RR、およびHLAクラスIIの不適合の総数の相互の相関を評価する。Mann-Whitneyの検定を使用して、不適合もしくはGVHDにより定義されるサブグループ間の

Gr A、Gr BおよびRRのレベルを比較する。

【0044】

測定の対内の相関により引き起こされる統計学的分析における問題を回避するため、各対におけるGr A、Gr BおよびRRの「平均」値をコンピュータ計算し、そしてさらなる分析に使用した。データの歪度を鑑み、幾何平均をGr AおよびGr Bの「平均」として使用した。

【0045】

RRのゼロ値を取り扱うために、われわれは最初に全部のRRの測定値に1%を付加し、次に幾何平均をとり、そして最後に再度1%を差し引いてそれを元の尺度に戻した。

結果

6例の兄弟姉妹および24例の関係しない患者/ドナー対の1コホートにおいて、Gr AおよびGr Bの産生レベルを移植前のMLCの上清中で測定し、そしてMLCのRR、およびHLAクラスIIの不適合の数と相関させた。患者/ドナー対のこのコホートから、ただ1つの組合せがBMTのため実際に選択された。16例のHLAが同一の兄弟姉妹の患者/ドナー対の別のコホートにおいて、Gr AおよびGr Bの産生レベルを移植前のMLCの上清中で測定し、そして急性GVHDの発症と相関させた。

【0046】

MLCのRRとのGr AおよびGr Bの産生レベルの相関。各患者/ドナー対からのMLCを、移植片対宿主および宿主対移植片の方向で確立した。双方の後者の方向で、MLCのRR、ならびにMLCの上清中のGr AおよびGr Bの産生レベルを測定した。図1は、MLCのRRとの30例の患者/ドナー対の平均のGr AおよびGr Bの産生レベルの相関を示す。Gr AおよびGr Bの産生レベルは、相互と($r = 0.78$ 、 $p = < 0.001$ 、図1C)ならびにMLCのRRと($r = 0.53$ 、 $p = 0.003$ 、図1A、および $r = 0.79$ 、 $p = < 0.001$ 、図1B)有意に相関する。

【0047】

HLAクラスIIの不適合の数とのGr AおよびGr Bの産生レベルの相関。

研究された30例の患者/ドナー対からの6例の兄弟姉妹および3例の関係しない患者/ドナー対が、HLAクラスII抗原中にいかなる不適合も表さなかった。HLAクラスIIの不適合を表す21例の患者/ドナー対のうち、8例の患者/ドナー対が1個のHLAクラスIIの不適合(HLA-DRB1、-DQB1もしくは-DPB1のいずれか)を、8例の患者/ドナー対が2個のHLAクラスIIの不適合を、そして5例の患者/ドナー対が3個のHLAクラスIIの不適合を示した。図2は、HLAクラスIIの不適合の数とのGrAおよびGrBの産生レベルの相関(それぞれ $r = 0.60$ 、 $p = 0.00$ 、 $R = 0.81$ 、 $p < 0.001$)、ならびにHLAクラスIIの不適合の数とのMLCのRRの相関 $r = 0.87$ 、 $p < 0.001$ を示す。詳細には、GrA産生レベルの中央値は、HLAクラスIIの不適合を伴わない患者/ドナー対のMLCの上清中で 49 pg/ml (第一~第四四分位数: $40 \sim 169 \text{ pg/ml}$)であり、1個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対で 397 pg/ml (第一~第四四分位数: $320 \sim 460 \text{ pg/ml}$; HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.27$)に増大し、そして2個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対で 469 pg/ml (第一~第四四分位数: $318 \sim 1306 \text{ pg/ml}$; HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.005$)にさらに増大する。3個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対のGrAレベル(中央値 466 pg/ml GrA、第一~第四四分位数: $435 \sim 826$; HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.014$)は、2個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対のGrAレベルより高くなかった(図2A)。

【0048】

類似の結果がGrB産生レベルについて得られた。HLAクラスIIの不適合を伴わない患者/ドナー対のGrB産生レベルは低く(中央値 46 pg/ml GrB、第一~第四四分位数: $27 \sim 51 \text{ pg/ml}$); 1個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対(中央値 103 pg/ml GrB、第一~第四四分位数: $59 \sim 125 \text{ pg/ml}$; HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.007$)、および2個の不適合を伴う患者/ドナー対(中央値 374 pg/ml)に増大する。

g/ml Gr B、第一～第四四分位数：195～587 pg/ml；HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.001$)でより高かった。3個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対においては、623 pg/mlへのGr Bレベルの中央値のさらなる上昇(第一～第四四分位数：483～977 pg/ml；HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.003$)が観察された(図2B)。

【0049】

HLAクラスIIの不適合を伴わない患者/ドナー対におけるMLCのRRの中央値は低く(1%、第一～第四四分位数：0.4～1.8%)、1個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対で6.1%(第一～第四四分位数：3.0～17%；HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.002$)、2個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対で16%(第一～第四四分位数：10～29%；HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.001$)に有意に増大し、そして、3個のHLAクラスIIの不適合を伴う患者/ドナー対において78%(第一～第四四分位数：75～85%；HLAクラスIIの不適合なしに対して $p = 0.003$)にさらに増大した(図2C)。

【0050】

急性GVHDの発症とのGr AおよびGr Bの産生レベルの相関。16例のHLAが同一の患者/ドナー対の別のコホートにおいて、Gr AおよびGr Bの産生レベルを、移植片対宿主の方向で確立されたMLCの上清中で測定し、そして急性GVHDの発症と相関させた。図3Aは、急性GVHDを伴わない(等級0-I)3例の患者、等級IIの急性GVHDを伴う5例の患者、等級IIIの急性GVHDを伴う5例の患者および等級IVの急性GVHDを伴う3例の患者のGr Aの産生レベルを示す。

【0051】

急性GVHDを伴わない(等級0-I)患者のMLCの上清中のGr Aレベルの中央値は低く(中央値137 pg/ml Gr A、第一～第四四分位数：100～475 pg/ml)、そして等級II-IVの急性GVHDを伴う患者で有意に上昇した(中央値1103 pg/ml Gr A、第一～第四四分位数：88

0 ~ 1893 pg/ml ; p = 0 . 004 ; 図3A)。

【0052】

同様に、急性GVHDを伴わない(等級0 - I) 3例の患者のMLCの上清中のGrB産生レベルの中央値は低く(11 pg/ml GrB、第一~第四四分位数: 7 ~ 104 pg/ml)、そして等級II - IVの急性GVHDを発症した13例の患者で有意に増大した(207 pg/ml GrB; 第一~第四四分位数: 105 ~ 348 pg/ml ; p = 0 . 025 ; 結果は示されない)。

【図面の簡単な説明】

【図1】

発明にかかる、6例の兄弟姉妹および24例の関係しないドナー/レシピエント対におけるMLCの相対的応答(RR)との、MLCの間のグランザイム産生の相関。³[H]-チミジンの取り込みで決定されかつRRのパーセンテージ(%)として表されるところのMLCの結果は、グランザイムAの放出(図B)もしくはグランザイムBのもの(図C)に関係していた。これらのMLC中でのグランザイムAとBの放出の間の相関を図Aに示す。

MLCにおいて、刺激細胞集団(末梢血単核細胞; PBMC)を照射した(20 Gy)。古典的MLCにおいて、37°Cで4日間のインキュベーション後に、細胞を2 μCiの³[H]-チミジン(40 ~ 60 Ci/mmol、アマーシャム(Amersham)、イリノイ州アーリントンハイツ)に37°Cで12ないし16時間暴露し、その後、チミジンの取り込みを液体シンチレーション計数器(ベックマン(Beckman)、アイルランド・ガルウェイ)で測定した(1分あたりのカウント数、cpmとして)。陰性対照は培地もしくは自己のPBMC(応答体[レシピエント]: 刺激体[レシピエント])単独よりなった。改変されたMLCにおいて、細胞は³[H]-チミジンに暴露しなかったが、しかし、上清を収集し、そしてグランザイムAおよびBの存在についてElisaで試験した。

【図2】

発明にかかる、HLAクラスIIの不適合の数(x軸上)との、MLCの間のグランザイムA(図A)およびB(図B)の産生レベルの相関。グランザイムレ

ベルは、対数で変換された幾何平均値としてy軸上にプロットする。不適合の数は、アロタイプ特異的抗血清を使用する2色蛍光アッセイを用いるドナーおよびレシピエントのHLA型分類、もしくは配列特異的プライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応を使用するHLA遺伝子型分類から生じさせた。図Cに、MLC中でのRRとのHLAの不適合の数の間の相関を、比較のために示す。

【図3】

発明にかかる、HLAが同一のドナーからの同種BMT後の16例の患者におけるGVHDの発症との、MLCの間のグランザイムA(図A)の産生レベルの相関。GVHD発症とMLC中でのRRとの間の相関を、比較のために図Bに示す。患者におけるGVHDの重症度はGlucksbergら(Transplantation 1974; 18: 295-304)に従って等級付けした。

【図1A、1B】

Figure 1A

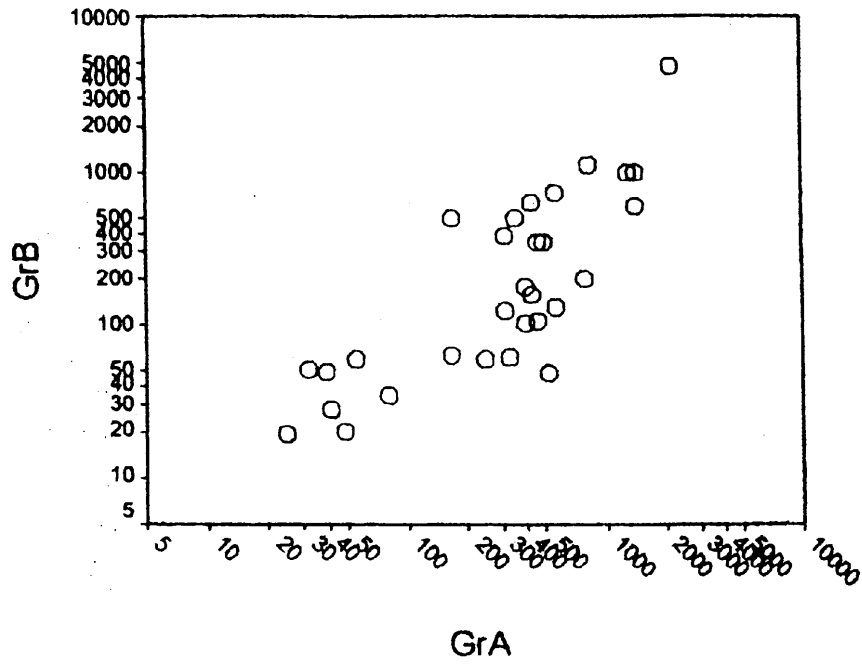
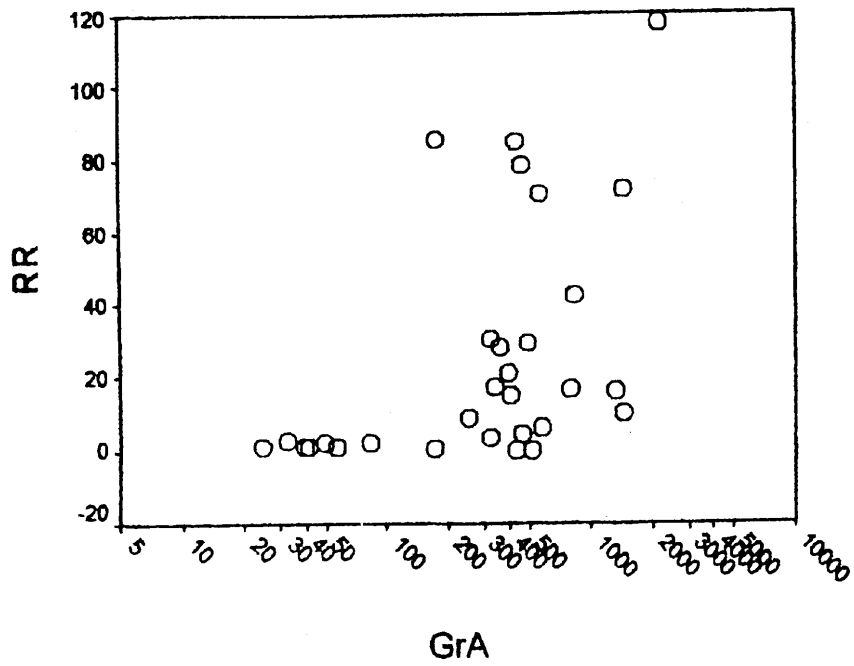
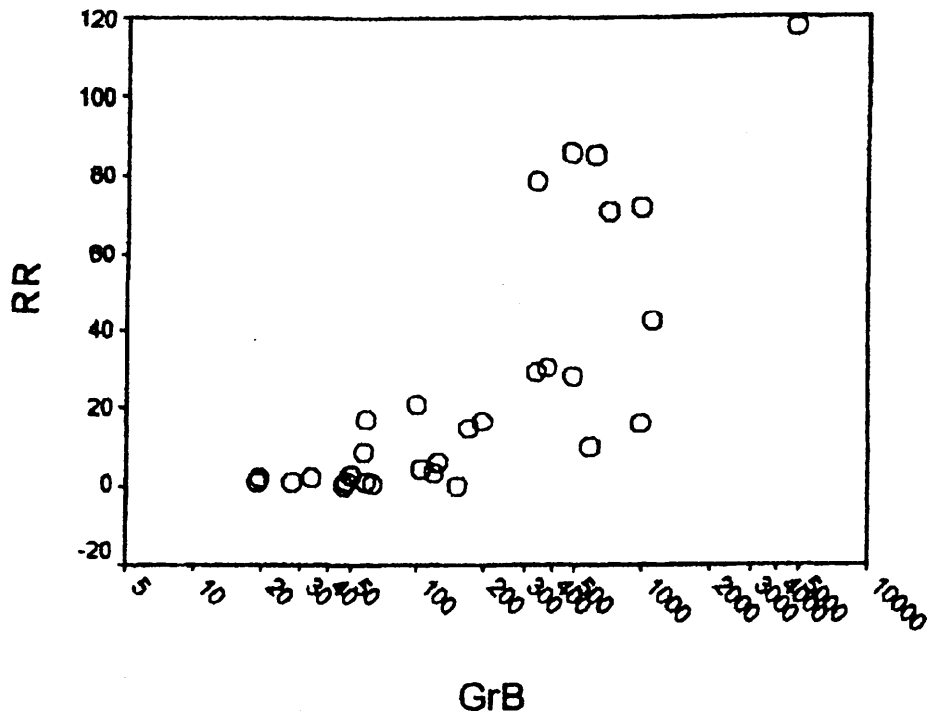


Figure 1B



【図1C】

Figure 1C



【図2A、2B】

Figure 2A

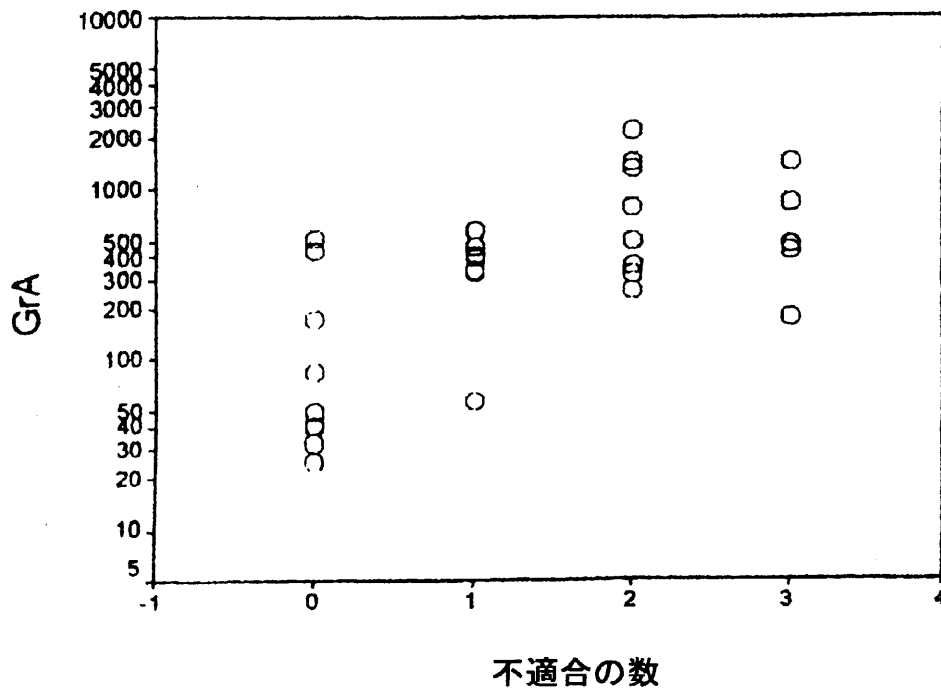
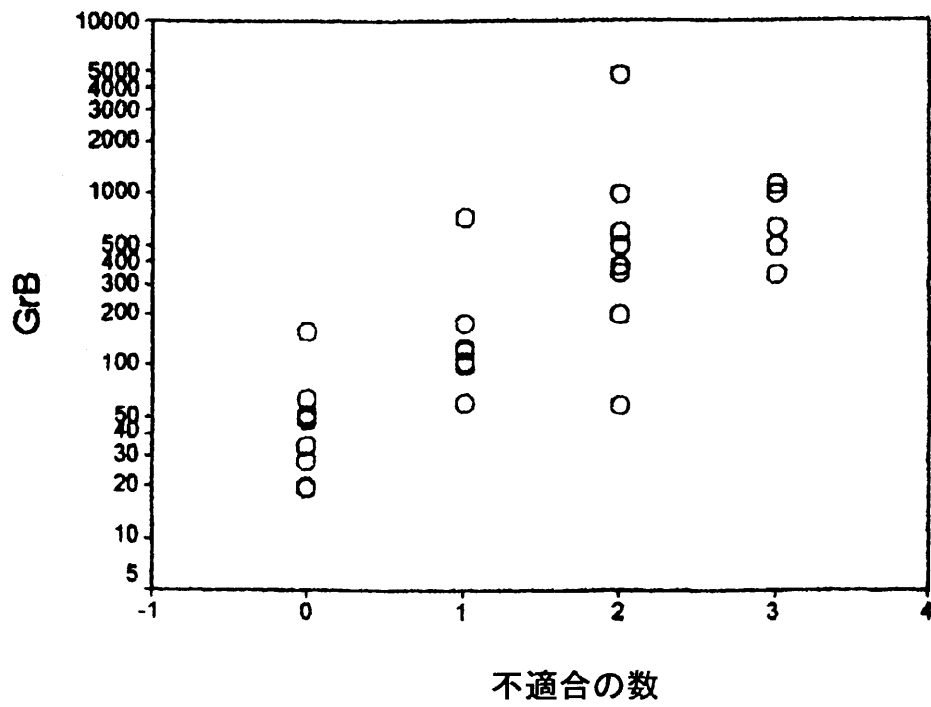
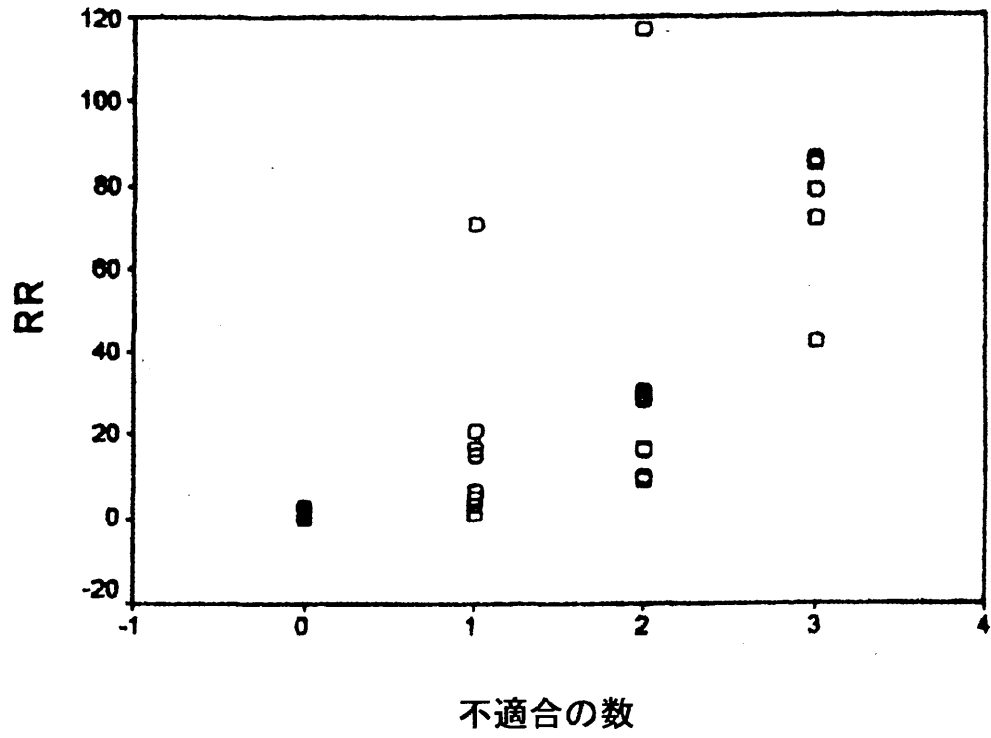


Figure 2b



【図2C】

Figure 2C



【図3A、3B】

Figure 3A

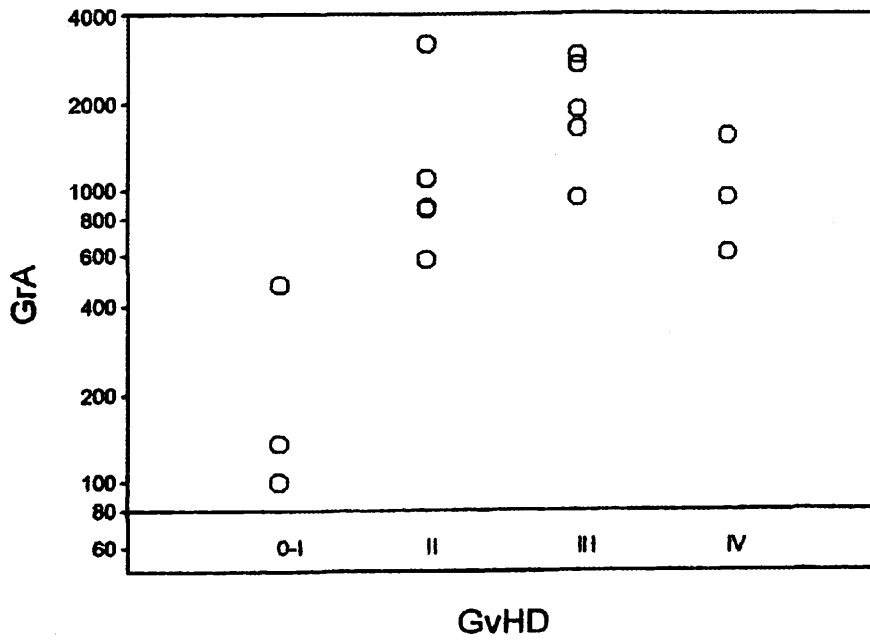
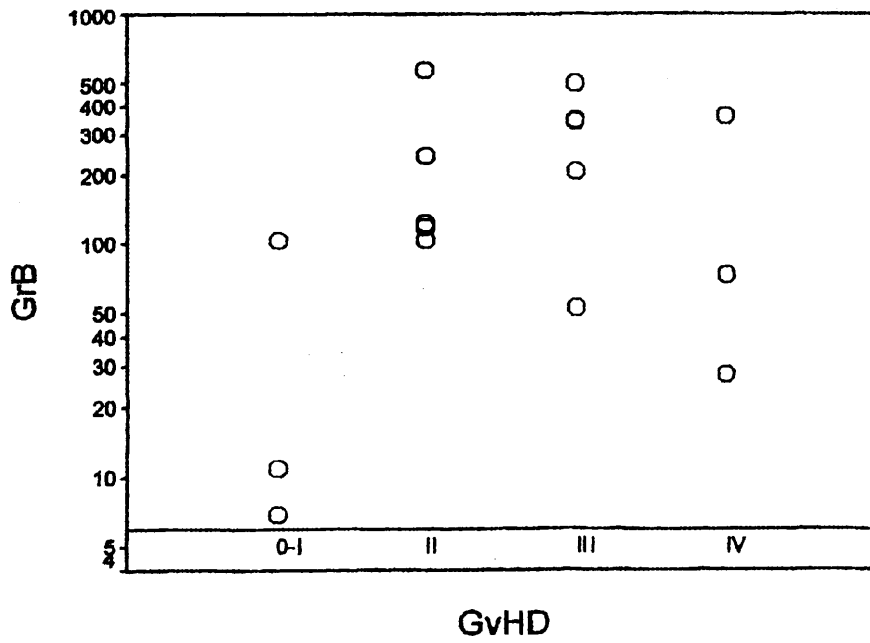


Figure 3B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/NL 01/00421
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 C12Q1/00 G01N33/569		
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) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 9722638, abstract XPO02182256 & F. LEVI-SCHAFFER ET AL.: "Regulation of the functional activity of mast cells and fibroblasts by mononuclear cells in murine and human chronic graft-vs-host disease" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 25, no. 3, 1997, pages 238-245, New York NY USA	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt 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		Date of mailing of the international search report
7 November 2001		22/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van Bohemen, C

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ79 QR48

QS15 QS33 QS36 QX02 QX07

专利名称(译)	组织相容性的试验方法		
公开(公告)号	JP2003536072A	公开(公告)日	2003-12-02
申请号	JP2002502438	申请日	2001-05-31
申请(专利权)人(译)	留泰排队Sankin广泛球啧啧培训		
[标]发明人	ハクコルネリス グールミエルサアフラジュリアマリア		
发明人	ハク,コルネリス グールミ,エルサ・アフラ・ジュリア・マリア		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/00 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56977 G01N33/5005		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/53.Y C12Q1/02 G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07		
优先权	2000201975 2000-06-05 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

刺激的体细胞是潜在器官移植的供体或受体淋巴细胞，经治疗使其不增殖，是功能组织相容性测试与各种器官移植的受体或供体的受体体细胞共同培养，并确定所述细胞毒性效应细胞的脱粒作用。通过在共培养上清液中通过免疫测定测量颗粒成分（例如颗粒酶或穿孔素）来确定细胞毒性效应细胞（例如细胞毒性T淋巴细胞和自然杀伤细胞）的去颗粒化。你可能通过HLA分型预选供体-受体对后，可以使用这种新的功能组织相容性测试方法。

B]

Figure 1A

