

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5677835号
(P5677835)

(45) 発行日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| GO 1 N 33/53 (2006. 01) | GO 1 N 33/53 K |
| GO 1 N 33/543 (2006. 01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 C |
| GO 1 N 33/552 (2006. 01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 U |
| GO 1 N 37/00 (2006. 01) | GO 1 N 33/543 5 0 1 J |
| | GO 1 N 33/552 |

請求項の数 35 (全 23 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2010-502561 (P2010-502561) | (73) 特許権者 | 508070600 |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年4月8日 (2008. 4. 8) | | アルバ・バイオサイエンス・リミテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2010-523995 (P2010-523995A) | | イギリス国 E H 1 7 ・ 7 Q T, エディンバラ, エレンズ・グレン・ロード |
| (43) 公表日 | 平成22年7月15日 (2010. 7. 15) | (74) 代理人 | 100108877 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/GB2008/001220 | | 弁理士 鴨田 哲彰 |
| (87) 国際公開番号 | W02008/122793 | (72) 発明者 | ペトリック, ジュラージ |
| (87) 国際公開日 | 平成20年10月16日 (2008. 10. 16) | | イギリス国, イーエイチ45 9ディーエイ, ピーブルズ, ホワイトハウ パーク, 1 1 6 |
| 審査請求日 | 平成23年3月22日 (2011. 3. 22) | (72) 発明者 | ロブ, ジュニン, スコット |
| (31) 優先権主張番号 | 0706820. 8 | | イギリス国, イーエイチ19 3アールエス, ミッドロージアン, ボニーリグ, ピーコック アベニュー, 1 |
| (32) 優先日 | 平成19年4月10日 (2007. 4. 10) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液型抗体スクリーニング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液型抗体と結合可能な血液型抗原を有する細胞膜フラグメントを固定した固体基板を含む、血液型抗原に対する抗体を検出するためのアッセイであって、前記細胞膜フラグメントは、細胞溶解により細胞ゴーストを生成し、かつ、該細胞ゴーストをフラグメント化することにより得られたものであることを特徴とする、アッセイ。

【請求項 2】

前記細胞ゴーストのフラグメント化が超音波処理によりなされたものである、請求項 1 に記載のアッセイ。

【請求項 3】

前記細胞フラグメントは、洗浄されたものである、請求項 1 または 2 に記載のアッセイ

【請求項 4】

前記細胞フラグメントは、前記細胞溶解の後、かつ、前記細胞ゴーストのフラグメント化の前に洗浄されたものである、請求項 3 に記載のアッセイ。

【請求項 5】

前記細胞膜フラグメントのサイズが 1 μm 以下である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 6】

前記細胞膜フラグメントのサイズが 0 . 5 μm 以下である、請求項 5 に記載のアッセイ

。

【請求項 7】

前記細胞膜フラグメントのサイズが $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の範囲である、請求項 6 に記載のアッセイ。

【請求項 8】

前記細胞膜フラグメントが、A、B、c、D、E、e および K 抗原を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 9】

前記細胞膜フラグメントが、A (A_1 および A_2)、B、H、C、D、E、c、e、 C^W 、K、k、 Kp^a 、 Kp^b 、 Js^a 、 Js^b 、 Fy^a 、 Fy^b 、 Jk^a 、 Jk^b 、 Le^a 、 Le^b 、M、N、 Mi^a 、S、s、U、Pl、 Lu^a 、 Lu^b 、 Wr^a 、 Co^b 、 Xg^a 、 Tj^a 、 Di^a 、 Di^b など、臨床的に意義のあるすべての抗原を有する、請求項 8 に記載のアッセイ。

10

【請求項 10】

前記細胞膜フラグメントが赤血球から作られる、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 11】

前記細胞膜フラグメントがプロテアーゼで前処理される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 12】

試験材料の添加を示す陽性対照をさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のアッセイ。

20

【請求項 13】

プローブの作成に使用したバッファおよびブロッキング剤から選択される陰性対照を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 14】

前記基板が、膜フラグメントを担持し、効果的に抗原を発現させるためのコーティングを備える、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 15】

前記コーティングの厚みが、 $1 \mu\text{m}$ 以上である、請求項 14 に記載のアッセイ。

【請求項 16】

前記コーティングの厚みが、 $1 \sim 100 \mu\text{m}$ である、請求項 15 に記載のアッセイ。

30

【請求項 17】

前記コーティングの厚みが、 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ である、請求項 16 に記載のアッセイ。

【請求項 18】

前記コーティングの材料が親水性および水溶性である、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 19】

前記コーティングが、ポリエチレングリコールを含むポリマーである、請求項 14 ~ 18 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 20】

前記ポリエチレングリコールを含むポリマーが、オレイル - o - ポリ (エチレングリコール) - スクシニル - N - ヒドロキシ - スクシンミジルエステルである、請求項 19 に記載のアッセイ。

40

【請求項 21】

前記コーティングが第 4 級の窒素含有塩基性ポリマーを含む、請求項 14 ~ 18 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 22】

前記第 4 級の窒素含有塩基性ポリマーが、塩化ポリジアリルジメチルアンモニウムである、請求項 21 に記載のアッセイ。

【請求項 23】

50

前記コーティングが、ポリペプチドを含む、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 2 4】

前記ポリペプチドが、ポリ-L-リジンである、請求項 2 3 に記載のアッセイ。

【請求項 2 5】

前記コーティングが、シランである、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 2 6】

前記シランが、3-グリシドキシプロピル-トリメトキシシランである、請求項 2 5 に記載のアッセイ。

【請求項 2 7】

前記基板が、ガラスまたはプラスチック材料で形成されたプレートまたはビーズである、請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 2 8】

前記細胞膜フラグメントが、抗原スポットアレイ内の基板上に存在する、請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 2 9】

前記基板が、マルチウェルプレートであり、各ウェル内に抗原スポットアレイが存在する、請求項 2 8 に記載のアッセイ。

【請求項 3 0】

前記スポットが、直径 1 mm 以下である、請求項 2 8 または 2 9 に記載のアッセイ。

【請求項 3 1】

前記スポットが、直径 5 0 ~ 1 0 0 0 μm である、請求項 3 0 に記載のアッセイ。

【請求項 3 2】

前記基板の膜フラグメントが固定されていない領域は、ブロッキング剤で処理される、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 3 3】

血液型検査、直接抗グロブリン試験(DAT)、梅毒スクリーニング、HIVスクリーニング、HCVスクリーニング、B型肝炎スクリーニング、HTLVスクリーニング、および血小板スクリーニングから選択された検査をさらに含む、請求項 1 ~ 3 2 のいずれかに記載のアッセイ。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 3 3 のいずれかに記載したアッセイに、被験者から採取した血液サンプルを接触させ、非結合の赤血球を除去し、前記基板に結合した抗体の存在を検出するというステップからなる、血液型抗原に対する抗体の存在を検査するための血液サンプル検査方法。

【請求項 3 5】

血液サンプル中の臨床的に意義のある血液型抗体を検出するのに適した血液検査方法であって、

様々な前記抗体と特異的に結合することが可能な複数の血液型抗原を発現する細胞膜フラグメントを、基板上のあらかじめ定めた位置に個別に固定したマイクロアレイであって、前記細胞膜フラグメントは、細胞溶解により細胞ゴーストを生成し、かつ、該細胞ゴーストをフラグメント化することにより得られたものであるマイクロアレイを提供し、

前記マイクロアレイに、被験者から採取した血液サンプルを接触させ、

前記結合剤を固定した 1 つ以上の領域から、非結合の赤血球を実質的にすべて除去し、および、

前記マイクロアレイに結合した抗体の存在を検出し、

これにより、被験者の血液中に前記抗体が存在するかどうかを判断する、というステップからなる、血液検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、輸血検査に係り、より具体的には、血液型抗原に対する抗体の検出に関する。また、本発明は、好ましい表面コーティングを有したアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

血液または血液成分の輸血は、一般的に行われている医療行為である。輸血検査に使用される血液製剤および器具は、厳格な要件に従って製造され標準化されねばならない。患者に輸血される血液成分の安全性を保証するため、可能な限りの処置が現に実行されている。従って、輸血および輸血検査に関する分野は、高度に統制された分野であるといえる。英国において輸血検査は、英国法および欧州法の両者によって規定されており、また地域品質システムや世界法によってもカバーされている。輸血前試験の大部分は、血液型抗体およびその他の抗体のスクリーニングで構成される。これは、ドナーおよび患者双方の適合性を判断し、その後の免疫反応を最小限に抑えるためである。血液型抗体スクリーニング検査は、主として、赤血球表面の血液型抗原に対する抗体を、血液サンプルが含んでいるかどうかを検出するために行われる。このような抗体が個人的に作り出される原因は、多くの場合、同種免疫によるものであり、抗原陽性血液が抗原陰性の人に導入されると、非自己抗原に対する抗体が作られる可能性がある。輸血および妊娠時における胎児母体出血が、同種免疫を引き起こす可能性のある2つの事由である。このメカニズムによって産生された抗体は、通常、不規則血液型同種抗体と呼ばれる。また、同種抗体には、免疫原が不明なものがあり、こちらは自然発生的同種抗体と呼ばれる。

10

20

【0003】

臨床的に意義のある血液型同種抗体を検出することは、ドナーおよび輸血者の輸血前試験において、非常に重要な意味を持つ検査である。臨床的に意義のある抗体を検出することにより、患者が抗体を産生した抗原を含まない安全な血液を患者に提供することが可能となる。

【0004】

従来的に抗体スクリーニング検査は、試験管内における凝集試験として行われてきた。この試験には、血漿・血清試薬に対して試験された、既知の特異性を有するヒト赤血球が使用される。一定の培養期間を経た後、多くの場合、二次抗体溶液を加えて、この混合物の赤血球凝集を観察する。最近では、マイクロプレートやカラムを使用した凝集テクノロジーシステム（たとえば、Dia Med社のID System、Ortho Clinical Diagnostics社のBioVue）を用いて、ある程度自動化して試験を行うことも可能となってきている。検査方法および検出限界要件は、検査の対象となるのが、ドナーのサンプルであるか患者のサンプルであるかによって異なる。ドナーの場合は、パライン処理したOR₁R₂K陽性細胞群が、抗Dの検出限界0.5IU/mlで使用されるが、患者の場合には、より精度の高い技術が用いられ、検出限界は抗D 0.05IU/mlである。ドナー試験において最も一般的に使用されている方法は、かなり大ざっぱで、感度の低いものである。現行の規制要件に従ってはいるものの、現在行われている試験はかなり限定されており、検出可能な臨床的に意義のある抗体の範囲は限られている（この検査では、パライン処理したOR₁R₂K陽性細胞群を用いて、オリンパス株式会社の血液型アッセイで行う）。より広い範囲の臨床的に意義のある血液型抗体をドナーから検出できれば、輸血医療の安全性は、さらに向上するといえる。また、本明細書において提案するように、多重化技術を用いれば、より一層の利益がもたらされるといえる。

30

40

【0005】

血液型抗原は、構造も複雑度も様々であるが、本来的に主として糖質またはタンパク質である。糖鎖抗原は、単純構造の場合もあれば、高度に分岐した構造をとる場合もある。タンパク質抗原は、外膜に付着していたり、膜を何度も貫通して膜と一体化（膜貫通型）していたり、本来的に糖タンパク質であったりする。

【0006】

50

通常、ほとんどの抗体スクリーニングアッセイは、赤血球全体の溶液を使用する。最近では、赤血球ゴースト(すなわち、空の細胞膜)を用いた固相血液型判定が実証され(Immucor社による米国特許第5030560号)、いくつかの実験室においては、日常的に抗体スクリーニングに用いている。この方法は費用が高くつく上に、ある種の特異性をもつ偶発的IgM抗体や、多様な特異性をもつIgG抗体を見逃してしまうことが知られている。小型化すれば、試薬の使用量が少なくなるため、費用効率を改善することができ、このことは特に、稀な特異性の赤血球の場合に意味がある。また、マイクロアレイなどをベースとした小型アッセイは、反応速度を高め、より良好な感度を示すことが多い(Ekins, 1998年)。しかしながら、スポットサイズは50~700 μm 、より頻繁には100~250 μm であるから、赤血球全体または溶解赤血球(「ゴースト」)の構造はスポット用としてはかなり大きい。さらに、全体的な細胞は、長期間にわたって安定的であるとはいえない。マイクロアレイ上のプローブとして細胞膜フラグメントを使用し(Corning社による米国特許出願公開第2002/0019015号、同第2004/0213909号、国際公開第WO2005/010532号、同第WO2006/058237号)、Gタンパク共役受容体の相互作用を調べることについては、すでに開示されている。しかしながら、赤血球膜のフラグメントについては、記述されていない。より厳密には、これまで赤血球またはその他の細胞(たとえば、トランスフェクト細胞)からの膜フラグメントが、血液型抗原同種抗体の検出に用いられたことはなかったのである。先に引用した特許文献において、Corning社グループは、様々なスライド表面上に、ポリエチレンイミンのリンカー/モディファイアーで膜フラグメントを固定して使用しているが、中でも最も良好な結果が得られたのは、金でコーティングしたスライドであった。金コーティングは、かなり高価であり、また、その不透明性が原因で、ある種のスキャナの場合、問題が生ずる可能性がある。赤血球の大きさは、7.5~8.5 μm であり、その平均寿命はおよそ120日である。ある種の重要な低頻度抗原を発現する赤血球は、しばしばきわめて稀少である。小型化の特質として、試験のために用意する必要のある各プローブ細胞の量はナノリットル/マイクロリットルで足り、献血から大量のストック抗原を準備できるため、ある種の血液型抗原を調べる際の稀少性の問題が緩和される。赤血球を酵素処理すると、表面電荷が変化し、細胞からある種の化学構造が除去されることが知られている。こうした処理を施すことにより、多くの血液型抗原の検出を最適化することが可能である。タンパク質血液型抗原(エピトープ)は、抗原決定基配列からなるペプチドで表すことも可能であり、これらのペプチドを抗体スクリーニングに使用することも実証されている。しかしながらペプチドは、通常、線状エピトープに対してのみ作用し、複数回貫通型膜タンパクの場合、組み換え抗原は適切な配座を支持できない。

【0007】

遺伝子組み換え細胞は、その表面に組み換え血液型抗原が表れるよう作成可能である。このことは、Kell式、Knops式およびDuffy式の抗原に対してすでに実証されている(Ridgwellその他、2000年; Yazdanbakhshその他、2000年; Sheffieldその他、2006年; 国際公開第WO2005/024026号公報)。これらの抗原形態は、ヒト血漿/血清の抗体スクリーニングに用いられ、成功をおさめてはいるものの、特異性の範囲は制限されている。さらに、検出方法として、主にフローサイトメトリーを用いなければならないが、フローサイトメトリーの処理容量は低く、利用可能なラボは少なく、固相への適応が必要となる。酵素免疫測定法や、免疫プロット法を用いる試みも行われている。こうした細胞を用いれば、有効保存期間が短いという問題を解決でき、また潜在的なバイオハザードの危険性を回避できる。しかしながら、血液型抗原を発現するこうした細胞のフラグメントについては、これまで記述されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5030560号公報

10

20

30

40

50

【特許文献2】米国特許出願公開第2002/0019015号公報

【特許文献2】米国特許出願公開第2004/0213909号公報

【特許文献3】国際公開第WO2005/010532号公報

【特許文献4】国際公開第WO2006/058237号公報

【特許文献5】国際公開第WO2005/024026号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Robb, J.S., Roy, D.J., Ghazal, P., Allan, J. and Petrik, J. (2006). "Development of non-agglutination microarray blood grouping" *Transfusion Medicine*. 16, 119-129

10

【非特許文献2】Campbell, C.J., O'Looney, N., Chong Kwan, M., Robb, J.S., Ross, A.J., Beattie, J.S., Petrik, J. and Ghazal, P. (2006). "Cell Interaction Microarray for Blood Phenotyping" *Analytical Chemistry*. 78, 1930-1938.

【非特許文献3】Ekins, R.P. (1998). Ligand assays: from electrophoresis to miniaturised microarrays. *Clinical Chemistry*, 44, 2015-2030.

【非特許文献4】K. Ridgwell, J. Dixey and M. L. Scott (2000). The production of soluble recombinant Kell antigens and their use in screening human sera for anti-Kell blood group antibodies. *Transfusion Medicine*. 13, Supplement 1, 9.

【非特許文献5】Yazdanbakhsh, K., Oyen, R., Yu, Q., Lee, S. Antoniou, M., Chaudhuri, a. and Reid, M. E. (2000). High-level, stable expression of blood group antigens in a homologous system. *American Journal of Hematology*. 63:114-124.

20

【非特許文献6】Sheffield, W.P., Bhakta, V., Branch, D. R. and Denomme, G. A. (2006). Detection of antibodies reacting with the antithetical duffy blood group antigens Fy(a) and Fy(b) using recombinant fusion proteins containing the duffy extracellular domain. *Transfus Apher Sci*. Dec; 35(3): 207-16.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

そして今、われわれは、次のような発見をした。すなわち、フラグメント化した赤血球膜を用いて発現させた血液型抗原や、細胞株を発現する他の抗原は、固体表面に固定化すること可能であり、これらは処理後もなお固体表面に保持され、抗原性を維持できるため、マイクロアレイ技術を用いて、血液サンプル内に存在する抗体を検出することが可能だ、ということである。これにより、従来の抗体スクリーニング検査を効果的に代替する試験を提供することができ、さらには、血液処理において重要なその他の検査、たとえば、赤血球表面上にある多重抗原の血液表現型検査、直接抗グロブリン試験、微生物学的試験、病原菌検査などとともに、単一のマイクロアレイで行うことが可能となる。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の第一の態様は、血液型抗原に対する抗体を検出するためのアッセイを提供するものであり、このアッセイは、血液型抗体と結合可能な血液型抗原を発現する細胞膜フラグメントを固定した固体基板を含む。

40

【0012】

本発明の第二の態様は、前記アッセイを用いた血液検査方法を提供する。

【0013】

このように、本発明は、マイクロアレイプリントにより適した、小さな均等サイズの細胞膜フラグメントを使用することにより、赤血球ゴーストに吸着または結合した細胞由来の不要物質を最小限に抑えるものであり、特に、この発明で行われているように、膜フラグメントを超音波処理で作成すれば、アッセイのバックグラウンド(ノイズ)値を軽減できる。

【0014】

50

しかしながら、細胞をフラグメント加工するプロセスにおいて、膜フラグメント上に小気胞ができてしまう可能性があり、場合によっては、適用不能なものとなることが知られている。フラグメント化のプロセスは、慎重に制御されねばならない。であるからこそ、固相マイクロアレイの表面に固定化（スポットティング）するというプロセスをさらに経た赤血球膜のフラグメントが、同じ特異性をもつ完全な赤血球または赤血球ゴーストに匹敵する、あるいはこれらを上回る性能を示す（試験結果参照）ことは、驚嘆に値する。

【0015】

本発明の第三の態様は、血液サンプルから臨床的に意義のある血液型抗体を検出するために使用する適切な血液検査方法を提供するものであり、この方法は、次のステップ、すなわち、

様々な前記特徴的抗体と特異的に結合することが可能な多数の血液型抗原を、基板の上のあらかじめ決められた位置に個別に固定したマイクロアレイを提供し、

前記マイクロアレイに、被験者から採取した血液サンプルを接触させ、

前記結合剤を固定した基板の上の1つ以上の領域から、非結合の赤血球を実質的にすべて除去し、

前記マイクロアレイに結合した抗体の存在を検出し、これにより前記特徴的抗体が被験者の血液中に存在するかどうかを判断する、ステップからなる。

【0016】

抗体の結合にタンパク質/抗原マイクロアレイを使用することは、すでに公知ではあるものの、固体基板と結合した赤血球フラグメントが、必要とされるさらなる処理にも耐えうるものであり、依然としてマイクロアレイに付着し、ここに係留し、かつ抗原性を維持し続けており、従って、効果的に血液型抗体スクリーニングに用いることができるということは、驚嘆に値する。細胞膜フラグメントは、公知のどのような方法を用いて作成してもよい。好ましくは、完全細胞を低張溶解で溶解したり、その他の周知の方法を用いたりして、細胞内容物を放出させ、空の細胞膜（細胞ゴースト）が残るようにする。細胞ゴーストは、超音波処理、冷凍/解凍、スパニングなどの寸断方法でフラグメントにする。細胞をプロテアーゼで前処理して、ある種の抗体-抗原相互作用を最適化することもできる。典型的に、細胞フラグメントのサイズは、1 μm以下（たとえば、< 0.5 μmあるいは< 0.3 μm）であり、多くの場合、0.1 ~ 0.5 μmの範囲である。フラグメントをふるいにかけて、固体基板上にスポットするのに最も適したサイズとすることも可能である。さらなるプロセスとして、最初に行うブロッキングや、非結合物質を除去し、非特異的結合を減じるためのマイクロアレイの洗浄、スキャンを行うための乾燥などが含まれる。

【0017】

マイクロアレイは比較的新しい技術であるが、その便益と用途は、当業者には周知である。マイクロアレイ技術に関するほとんどの出版物は、プローブおよび標的として遺伝物質を用いることに言及している。マイクロアレイは、通常、マイクロサイズまたはナノサイズのプローブサンプルのスポットを、固体基板上に配置する専門ロボットを使用して作成される。この技術がもたらす多重化機能は、きわめて大きな利益を提供する。たとえば、1標的-1プローブであった従来の検査と異なり、1つのサンプルを、ほとんど無限に近い数のプローブに対して、同時に検査することが可能である。同様に、多重化により、処理スピードおよび処理容量がアップする。このことは、ひいてはコストの削減、人員の削減、サンプル数の削減、試薬の削減、繰り返し試験の削減につながる。マイクロアレイには、データ生成レベルの向上をともなった高レベルの反復が含まれており、より効率的なデータ一致が可能となるからである。

【0018】

本発明のアッセイによれば、単一の検査システムに、抗体スクリーニング検査、血液型検査、表現型検査、DAT試験および梅毒検査をまとめて含めることができる。これにより、スクリーニング検査と同時に、様々な特徴的抗体を同定することが可能なため、血液検査手続きにおける効率と有効性が向上する。また、識別可能因子の臨床的意義を決定す

10

20

30

40

50

る際の遅延を短縮できる。

【0019】

その他含めることが可能な検査には、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)スクリーニング、B型肝炎スクリーニング、C型肝炎スクリーニング、ヒトT細胞白血球ウイルス(HTLV)スクリーニング、微生物学的スクリーニング、血小板スクリーニングなどがある。

【0020】

アッセイ上に供給される膜結合抗原は、標的となる特徴的な抗体のアイデンティティーに即して選択することが好ましい。これらの抗原は、一般的に、従来的な抗体スクリーニング検査で使用されているもの、たとえば、少なくともA、B、C、c、D、E、eおよびKなどである。また、ある種の抗体との結合を最適化するため、修飾抗原を含めること

10

【0021】

具体的には、ABOおよびH式、Rh式、Kell式、Duffy式、Kidd式、Lewis式、MNS式、P式、Lutheran式、Wright式、Diego式、Colton式およびXg式といった血液型分類法による、臨床的に意義のある血液型抗原のすべてを、細胞膜フラグメントに含めることが可能である。これらを、その抗原(もっと多数あるが、臨床的に意義のあるもののみを示す)とともに、以下に表示する。

【0022】

| | | |
|-----------|----------------------|----|
| ABOおよびH式 | A(A1およびA2)B、H; | 20 |
| Rh式 | C、D、E、c、e、CW; | |
| Kell式 | K、k、Kpa、Kpb、Jsa、Jsb; | |
| Duffy式 | Fya、Fyb; | |
| Kidd式 | Jka、Jkb; | |
| Lewis式 | Lea、Leb; | |
| MNS式 | M、N、S、s、Mia、U; | |
| P式 | Pl、Tja; | |
| Lutheran式 | Lua、Lub; | |
| Wright式 | Wra; | |
| Diego式 | Dia、Dib; | 30 |
| Colton式 | Cob; | |
| Xg式 | Xga。 | |

【0023】

基板上に固定される血液型抗原は、赤血球膜フラグメントであってもよいし、代替的な細胞株に発現した抗原であってもよい。また、検査を十分に対照化するため、関連する対照プローブも含めることが好ましい。こうした陽性対照には、たとえば抗ヒトIgなど、試験材料の添加を示す抗体が含まれる。陰性対照には、プローブの作成に使用されるバッファや、ブロッキング剤が含まれ、また、他の種/源に由来する同種の細胞/プローブを、本発明の検査プローブと同様に修飾・処理したものを含めることもできる。

【0024】

固体基板には、血液型抗原をキャリアする膜フラグメントを支持するためのコーティングを施すことが好ましい。コーティングは、抗原の効果的な発現が可能になるよう、膜フラグメントを固定するために十分な厚さであることが好ましい。これにより、検査対象となる血液抗体は有効な免疫複合体を形成できる。通常、コーティングは、少なくとも1分子以上の厚さであり、とりわけ0.1μm以上、さらには1μm以上、またさらには10μm以上でありうる。コーティングの厚さは、100μm以下、たとえば10μm以下でありうる。好ましい範囲は、1~100μm(とりわけ、5~20μm)である。コーティング材料は、この分野において、生物学的物質を固定する目的で、固体基板をコーティングするのに適するとされる材料であれば、何を用いてもよい。通常コーティング材料は、親水性、水溶性であり、溶液状態で塗布し、これを乾燥させ、固体状または半固体状で基

40

50

板上に残るようにする。

【0025】

表面改質およびコーティングに適した材料は、数多く存在する。たとえば、天然および合成ゴム、ゲル、ポリマーなどである。適切なポリマーには、オレイル - o - ポリ（エチレングリコール） - スクシニル - N - ヒドロキシ - スクシンミジルエステルのようなポリエチレングリコールや、高分子塩基、中でも高分子窒素塩基、とりわけ塩化ポリジアリルジメチルアンモニウムのような第4級窒素塩基、およびポリ - L - リジンのようなポリペプチドが含まれる。適切なシランには、3 - グリシドキシプロピル - トリメトキシシランが含まれる。

【0026】

マイクロアレイのスライド用に最も頻繁に使われるのはガラスであるが、こうした固体表面は、GAPS（ガンマアミノプロピルシラン）、APTS（3 - アミノプロピルトリエトキシシラン）、エポキシシラン、GOPS（3 - グリシドキシプロピル - トリメトキシシラン）などで改質できる。ポリアクリルアミドのパッチは、三次元構造を形成できる。また、ニトロセルロースやPVDFなどの膜で、ガラスをコーティングすることも可能である。膜フラグメントの固定化において重要なことは、ポリマーのコーティング材料が側方への運動に対しては柔軟性を保持するということである。換言すれば、膜フラグメントは、固体表面上に直接固定しない方がよいということである。これは、適切なポリマーのクッションを、固体表面と固定する膜フラグメントとの間に用いることによって達成できる。金の表面とポリエチレンジミンのクッションは非常によく作用するが、高価である。本発明は、高い処理容量の血液スクリーニングを目指しており、このようなコーティングは高すぎて使用できない。そこで、日油株式会社の「サンブライト（登録商標）」製品（オレイル - o - ポリ（エチレングリコール塩化ポリジアリルジメチルアンモニウム） - スクシニル - N - ヒドロキシ - スクシンミジルエステル）など、表面に使用できそうな様々なポリマーを分析した。本発明は、有効期限が長い膜フラグメントを、生細胞とは非常に異なる処理・加工を施し、理想的に使用することを目的とする。赤血球は、他の組織培養真核細胞とはかなり異なる。したがって、超音波処理を施し、ある種の抗体 - 抗原相互作用を最適化するため、しばしば特殊プロテアーゼで処理した小さなサイズ（典型的に0.5 μm以下）の赤血球膜フラグメントが、「サンブライト（登録商標）」でコーティングされた表面に依然として保持され、抗体スクリーニングアッセイに使用できるという発見は、驚くべきものである。

【0027】

もう1つのポリマー、塩化ポリジアリルジメチルアンモニウム（pDADMAC）は、通常、大規模工業用水処理用途に使用されているものの、マイクロアレイに用いる固相コーティングとしては、今まで使用されたことがない。これは、金でコーティングした固相と比して、はるかに安価であり、実際、他のほとんどのコーティング剤よりも安い。このポリマーが、膜フラグメントの固定化に非常に適しているということは、驚くべき発見である。さらには、抗体のような対照タンパク質分子の固定化にも適しており（実験結果参照）、このことは、pDADMACをコーティングしたスライド、マイクロプレート、その他のバイオアッセイ用の固体表面、とりわけ本発明のバイオアッセイに基づくマイクロアレイが、幅広い用途に使用可能だということを示唆するものである。

【0028】

典型的に、抗原はアレイ内の基板に結合される。ここで「アレイ」という用語を使用する場合、これは、赤血球抗体と特異的に結合する抗原が、ガラスやプラスチックなどの基板上に、通常の秩序で配列され固定化されものを意味する。典型的にアレイは、別々に仕切られた領域が規則正しく連続して並んだ形状をしており、ここに、抗原が結合される。このような抗原を結合したアレイを、一般に「抗原チップ」と呼ぶ。

【0029】

抗原は、たとえば平面状あるいは球状の基板上に配列される。平面アレイは、自動装置により容易にスキャンされる。さらに、各々の特異的抗原につき、数々の希釈物を用意し

10

20

30

40

50

、および/または数回繰り返して(たとえば、3~10回)配置する。これにより、何らかのアッセイを実行する際に発生する可能性がある、偽陽性/偽陰性反応を最小限に抑えることが可能となる。

【0030】

アレイは、従来の基板のいずれで形成してもよい。たとえば、ガラス、プラスチック、ケイ素、酸化ケイ素、金属、金属酸化物などで作られたプレートまたはビーズを使用することができる。抗原を結合させる基板は、ウェル、トレンチ、ピン、チャンネルおよび孔など、様々な表面形状とすることができるが、マルチウェル式のマイクロプレートが好ましい。蛍光検出を改良するための好ましい基板表面構造は、国際公開第W002/059583号公報および同第W003/023377号公報に記載されている。ある種の実施態様においては、基板は、光学的に透明であることが好ましい。

10

【0031】

一般に、本発明のアッセイは、小さな平面基板(たとえば辺長50~100mmの長方形)で構成され、スライドまたはマイクロプレート当たり10000個までの抗原スポットを有する。通常、各抗原は、既知の方法を使用して、基板にスポット付け、プリントまたは他の方法で結合させる。たとえば、Michael J. Heller, Annual Review of Biomedical Engineering, 2002 Vol. 4: 129-153、DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications、Angenendt, P.; Glokler, J.; Murpy, D.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. Anal. Biochem., 2002, 309, 252-260; Angendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. Chromatogr. A, 2003 100, 997-104を参照されたい。典型的な

20

【0032】

また、本発明のアッセイを使用して、1以上のサンプルを試験することが可能である。各チップは、基板表面上に個別のアレイを複数有し、別々のサンプルと各アレイとが、各サンプルが混合しないようなやり方でアレイと接触するよう配列される。たとえば各アレイは、異なる各サンプル同士の接触を阻止するように工夫された壁、リッジ、堤、疎水性領域等により、互いに連結される。

30

【0033】

上記のような構造の特定例の1つとして、従来型フォーマットのマイクロプレートがあげられるが、本発明の目的に則するのは、平らなガラスのウェル底を有するものである。このフォーマットのマイクロプレートにおいて、数あるアレイのうちの1つは、典型的に、96のプローブアレイを含んだ96ウェルプレート(384ウェル、またはそれ以上のサイズも可能ではあるが)を使用する。各ウェルは、予め定めたパターンに配した抗原スポットのアレイを備える。各ウェルは、試験対象となる血液サンプルを容れられるようになっており、単一の抗原(異なる濃度とすることもできる)で構成してもよいし、多数の抗原で構成してもよい。パターンを予め定めておくことにより、自動的にアレイをスキャンし、その結果をコンピューターを用いて読み取り、保存することが可能となる。

40

【0034】

基板表面の結合剤でカバーされていない領域(非特異的結合部位を提供する可能性がある領域)は、ブロッキング剤で処理し、前記抗原と抗体との非特異的結合を回避することが好ましい。様々なブロッキング剤が、この分野では周知である。一般的に、これらのブロッキング剤は、無脂肪乳タンパク質、カゼイン、ウシ血清アルブミン(BSA)など、アルブミンまたは血清(血液型抗体や抗IgG抗体、あるいは同一マイクロアレイ上における試験プローブの相互作用を阻害する可能性のある抗体といった、好ましくない抗体を有さないもの)を、バッファに入れたものが都合よく用いられる。一例を挙げれば、1~4%W/Vのウシ血清アルブミン(BSA)(ID Bio社、フランス)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS){0.15M塩化ナトリウム、2.632mMリン酸緩衝原液(A

50

l b a B i o s c i e n c e社、スコットランド)、pH7.0}に入れたものなどが便利である。

【0035】

抗体スクリーニングにおいて、二次検出に用いる抗体は、あらゆる結合抗体（たとえば、ヒトIgGまたはIgM）と反応するものでなければならない。これは、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDといったあらゆる免疫グロブリンクラスの抗体についても同様であり、またこれらのサブクラスにも適用される。

【0036】

生物学的要素の結合を検出する方法は、数多い。たとえば、発光タグ、化学ルミネッセンス、ラジオアイソトープ、無標識検出（たとえば、ピアコア）などである。マイクロアレイに最も頻繁に用いられるのは、共焦点走査を用いた蛍光検出であるが、代替的な選択肢としては画像システムがあり、こちらは、よりコスト効率がよく、用途が広く、より迅速である。以下に記述するように、結合抗体の検出にきわめて便利な方法として、検出が望まれる結合抗体への特異性を有する、蛍光標識した二次抗体複合体の使用があげられる。蛍光の存在は、共焦点走査型レーザを用いて蛍光を励起し、これに続く発光を検出することにより検出されるが、代替的に、発光ダイオード（LED）やメタルハライドランプなどによる照明法を用い、カメラ画像キャプチャで検出することも可能である。

10

【0037】

本発明のアッセイ法では、血液サンプル中に存在するあらゆる抗体を、一定期間（10秒～数時間、たとえば1分～60分）にわたって、固定化された膜結合抗原と特異的に反応させる。典型的に、この反応は、室温で実施されるが、たとえば、37℃で実施することも可能である。

20

【0038】

非結合物質の除去は、たとえば、基板表面を水または塩水のような溶液で洗浄することにより、または空気を基板表面全体に吹き付けたり、吸引したりすることにより、あるいは遠心分離または振動を利用して非結合物質を基板表面から払拭することにより行う。さらに、抗原を結合させる限定領域以外の基板領域を、試験サンプルの細胞に対して浸透性（多孔性）とすることにより、抗体と接触しない細胞が基板を通過できるようにし、除去を容易にすることも可能である。前述したように、結合抗体の存在は、二次標識検出（蛍光・化学ルミネッセンス複合抗体）、ローリング・サークル増幅など、様々な周知技術により検出できる。

30

【0039】

このように、マイクロアレイに結合した抗体は、蛍光シグナルによって検出できる。基板上の各特異的抗原の位置を知ることにより、試験対象の血液中に存在する抗体を同定することが可能であり、これにより、試験対象となる血液サンプルの血液型特異性を同定することができる。

【0040】

蛍光は、分光光度計など、この技術分野で既知の適切な光検知器を用いて検出できる。励起レーザを伴った共焦点スキャナを用いれば、スキャナで蛍光出力を検出し、その強度を数値化して、解釈およびデータ処理に活用できるため、便利である。

40

【0041】

適切なエレクトロニクスおよびソフトウェアを使用して、適切な装置をプログラムすることにより、基板表面上の特異的抗体を同定し、その位置を知り、これを発生した蛍光シグナルと関連させることが可能となり、これにより、特殊な血液型であるかどうかを判定され、テスターで同定できる。さらに、統計用ソフトウェアを組み込むことにより、基板上に種々に繰り返された抗体および/または様々に希釈された抗体から得た結果を、組み合わせで定式化することが可能となる。この方法においては、多数の特異的抗原スポットから得た蛍光シグナルが合わせて解析され、統計的に有意な結果がテスターに表示される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 4 2 】

【図 1】図 1 は、「サンブライト（登録商標）」でコーティングされ、赤血球（ R_1R_1 、 R_2R_2 および rr 細胞）膜フラグメントをキャリアするスライドの、モノクロナール抗体パネルに対する反応性を示したものである。

【図 2】図 2 は、ポリ - L - リジンでコーティングされ、赤血球膜フラグメントをキャリアするスライドの反応性を示したものである。

【図 3】図 3 は、p D A D M A C でコーティングされ、赤血球膜フラグメントをキャリアするスライドの反応性を示したものである。

【図 4】図 4 は、p D A D M A C 上に固定した赤血球フラグメント（超音波処理あり）と赤血球ゴースト（超音波処理なし）の反応性を、平均分子量の異なる 5 つの p D A D M A C において対比したものである。

10

【図 5 (a)】図 5 (a) は、コーティング剤の濃度の増加に伴う効果を、抗 D を抗体に用いて示したものである。

【図 5 (b)】図 5 (b) は、コーティング剤の濃度の増加に伴う効果を、抗 D を抗体に用いて示したものである。

【図 5 (c)】図 5 (c) は、コーティング剤の濃度の増加に伴う効果を、抗 D を抗体に用いて示したものである。

【図 6】図 6 は、「サンブライト（登録商標）」でコーティングされ、様々な赤血球型（ R_1R_1 、 R_2R_2 および rr ）の膜フラグメントをキャリアするマイクロアレイの、抗 D モノクロナール抗体に対する反応性を、それぞれ示したものである。

20

【図 7】図 7 は、「サンブライト（登録商標）」でコーティングされ、様々な赤血球型（ R_1R_1 、 R_2R_2 および rr ）の膜フラグメントをキャリアするマイクロアレイの、抗 E モノクロナール抗体に対する反応性を、それぞれ示したものである。

【図 8】図 8 は、図 6 と同様の反応性を、p o l y D A D M A C でコーティングしたマイクロアレイにつき示したものである。

【図 9】図 9 は、図 7 と同様の反応性を、p o l y D A D M A C でコーティングしたマイクロアレイにつき示したものである。

【図 1 0】図 1 0 は、図 6 と同様の反応性を、ポリ - L - リジンでコーティングしたマイクロアレイにつき示したものである。

【図 1 1】図 1 1 は、図 7 と同様の反応性を、ポリ - L - リジンでコーティングしたマイクロアレイにつき示したものである。

30

【図 1 2 (a)】図 1 2 (a) は、p D A D A M C でコーティングされ、グリコフォリン A および B 遺伝子（A は血液型抗原 M / N を、B は血液型抗原 S / s を有する）をトランスフェクトした T 2 9 3 細胞のコロニー（1, 1 ; 1, 2 ; 2, 3 ; 4, 7, 1 など）の膜フラグメントをキャリアするスライドの、抗 M 抗体に対する反応性を、それぞれ示したものである。

【図 1 2 (b)】図 1 2 (b) は、p D A D A M C でコーティングされ、グリコフォリン A および B 遺伝子（A は血液型抗原 M / N を、B は血液型抗原 S / s を有する）をトランスフェクトした T 2 9 3 細胞のコロニー（1, 1 ; 1, 2 ; 2, 3 ; 4, 7, 1 など）の膜フラグメントをキャリアするスライドの、抗 N 抗体に対する反応性を、それぞれ示したものである。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 3 】

本発明のさらなる特徴および利点は、例証として以下に示す実施例により、明らかにされる。

【実施例 1】

【 0 0 4 4 】

修飾赤血球および未処理赤血球からの膜フラグメントの作成：

対象抗原を発現しているヒト赤血球を、献血および/またはドナー検査サンプルから選択した。適切なドナー血液を各 3 m l ずつ、別々の 2 2 5 m l ファルコンチューブにピペ

50

ットで滴下し、氷で冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を 2 0 0 m l まで加えた。この赤血球懸濁液を、そっと混ぜ合わせ、その後 3 0 0 0 r p m で 1 0 分間、遠心分離した。上澄みを捨て、同じプロセスを、2 回は P B S を用いて、1 回はバッファ 3 1 0 (0 . 1 M Na_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 を使用して p H 7 . 3 にしたもの) を用いて、計 3 回繰り返した。いずれの場合も、遠心分離された赤血球ペレットを、そっと再懸濁した。ヘマトクリット値 (すなわち、赤血球が占める容積のパーセンテージ) が測定された。ヘマトクリット値は、> 赤血球 1 0 % であった。必要に応じて、バッファ 3 1 0 を用いてヘマトクリット値を 1 0 % に調整した。1 0 % の細胞懸濁液 1 0 m l をソルヴァル (S o r v a l 遠心分離機) のチューブに移し、ここに氷で冷した溶解バッファ (4 6 . 5 m l のバッファ 3 1 0 を希釈して 1 L の逆浸透水 (R O) にしたもの) を加えて 3 6 m l にし、そっと混ぜ合わせた。これを、速度 1 9 0 0 0 r p m、温度 4 ° で、1 5 分間遠心分離した。溶血した上澄みを捨て、ペレットを再懸濁し、氷で冷やした溶解バッファ 3 6 m l でもう 1 度洗浄した。これを再び、速度 1 9 0 0 0 r p m、温度 4 ° で、1 5 分間、遠心分離した。普通の容器内の 5 m l の P B S にペレットをそっと再懸濁し、これを氷の上に保った。こうして得た赤血球ゴースト (すなわち、空の細胞膜) を、最大出力の 5 0 % で 1 分間超音波処理 (S t a t u s 2 0 0 超音波処理機) してフラグメント化した。

【 0 0 4 5 】

酵素修飾細胞が必要な場合には、前記したゴースト化、フラグメント化のプロセスの前に、次の処理を行った。上澄みが透明になるまで (通常 4 回) P B S で赤血球懸濁液を洗浄し、P B S 内でヘマトクリット値を 5 0 % に調整した。5 0 % の赤血球懸濁液 1 m l 毎に、1 m l のパパイン酵素を加え、別々の 2 2 5 m l ファルコンチューブ内でそっと混ぜ合わせた。この混合物を、室温で 8 分 ± 0 . 5 分、終始混ぜ合わせながらインキュベートした。インキュベート後、各フラスコを 0 . 9 % の生理食塩水または P B S で満たし、そっと混ぜ合わせた。その後、各フラスコを 3 6 0 0 r p m で 6 分間、ノーブレーキで遠心分離した。上澄みを蠕動ポンプで吸引廃棄した。この作業を、上澄みが透明になるまで 3 回以上繰り返した。最終洗浄の際、懸濁液に Modified A l s e v e r s 溶液 (A l b a B i o s c i e n c e 社) を追加して 5 0 % の懸濁液とした。

【 実施例 2 】

【 0 0 4 6 】

クローン化血液型抗原 (M / N および S / s 抗原) を発現しているトランスフェクト細胞株からの膜フラグメントの作成 :

R N A 源 : 赤血球細胞株 K 5 6 2 は、グリコフォリン A および B を発現することが知られている。グリコフォリン A は血液型抗原 M / N を、グリコフォリン B は血液型抗原 S / s を、それぞれキャリアする。K 5 6 2 を、1 0 % の子牛血清で強化した R P M I 培地で培養した。R N e a s y ミニキット (Q i a g e n 社) をメーカーの指示に従って使用し、1 0 7 個の細胞を用いてトータル R N A を分離した。A c c u S c r i p t H i g h F i d e l i t y 1st S t r a n d c D N A S y n t h e s i s K i t (S t r a t a g e n e 社) を使用し、R N A の一部を用いて 2 0 μ l の反応液内で、c D N A の第 1 ストランドを合成した。その後 0 . 5 ~ 2 μ l を使用して、グリコフォリン A (G Y P A) および B (G Y P B) のコード配列を P C R 増幅した。この 2 つのタンパク質の N 末端は同一であるため、同じフォワードプライマーを使用した (S a c I I G Y P A B f w l) 。

【 0 0 4 7 】

プライマー :

S a c I I G Y P A B f w l :

C A T C G A C C G C G G G C C A C C A T G T A T G G A A A A T A A T C T T T G T A T、

E c o R I G Y P A r :

G T T C G T G A A T T C T C A T T G A T C A C T T G T C T C T G G、

E c o R I G Y P B r :

10

20

30

40

50

G T T C G T G A A T T C T C A T G C C T T T A T C A G T C G G C .

【0048】

PCR条件： 0.7 μ l の cDNA を使用した；
 プライマー各 1 μ l (20 pmoles / μ l)、
 水 25 μ l 以下、
 Pfu Ultra Hot Start 2x Master ミックス (Stratagene 社) 25 μ l 。

【0049】

プログラム： 95 / 3分 1サイクル、
 95 / 30秒、
 54.5 / 30秒 35サイクル、
 72 / 1分、
 72 / 10分 1サイクル、
 4 ホールド。

10

【0050】

フォワードプライマーは、制限エンドヌクレアーゼ SacII の認識配列と、制限エンドヌクレアーゼ EcoRI のリバースプライマーとをキャリアする付加配列を含む。このため、NFBバッファ4内において、37 で2時間、PCR産物を両酵素で同時に分解し、その後PCR精製キット (Qiagen 社) で精製した。pCMV - Script プラスミド (Stratagene 社) 5 μ g を、20 μ l の反応液内で、同じ制限エンドヌクレアーゼで分解し、2.5 μ l の 10x Antractic Phosphatase バッファと 2.5 μ l の Antarctic Phosphatase (5U / μ l) を加えた後に、37 で15分間、脱リン酸化し、続いて酵素を 36 で15分間インキュベートした。その後、線状化プラスミドをPCR精製キットで精製した。精製されたPCR産物とプラスミドを、30 μ l の溶出バッファに溶出した。

20

【0051】

ライゲーション： 前記のように処理した 0.6 μ l の pCMV - Script プラスミドを、2.4 μ l の対応するPCR産物および 3 μ l の 2x Mighty Mix ライゲーションミックス (タカラバイオ株式会社) で連結した。ライゲーションは、16 で20分間行った。

30

【0052】

形質転換： 4 μ l のライゲーションミックスを使用して、E. coil Top 10 化学的コンピテントセル (Invitrogen 社) のアリコート 50 μ l をメーカーの指示に従いトランスフォームした。250 μ l の SOC 培地を加え、250 rpm でシェイクしながら、37 で1時間、細胞培養を行い、プレティング前に取り出した。形質転換細胞を各々 20 μ l および 200 μ l ずつ、50 μ g / ml のカナマイシンを含有する寒天培地にプレティングした。

【0053】

組み換えプラスミドの作成： 各形質変換体から4コロニーを、50 μ g / ml のカナマイシンを含有する 5ml の液体 LB 培地内で、250 rpm でシェイクしながら 37 で1晩、培養した。Qiagen 社のミニプレップ・キットを使用し、メーカーの指示に従ってプラスミドをミニプレップし、50 μ l の溶出バッファに溶出した。各プラスミド DNA を 3 μ l ずつ、NEB バッファ4内で、制限エンドヌクレアーゼ (NEB) SacII および EcoRI で同時に分解し、1% アガロース / TBE ゲル内の電気泳動とエチジウムブロマイド染色を用いて、クローン挿入部の存在をチェックした。

40

【0054】

トランスフェクション： プラスミド DNA を、紫外分光光度法により 260 nm で定量し、各プラスミド DNA を 15 μ g ずつ、45 μ l の Gene Juice と混ぜ合わせ、エレクトロポレーションを用いて 293T 細胞をトランスフェクトした。エレクトロポレーションの後、10 cm シャーレの上で、10% の子牛血清で強化した RPMI 培地内

50

に、細胞をプレーティングした。プレートの1/2の細胞を、トランスフェクション後24時間で、残りの半分を48時間で、スクラッピングにより回収し、スピニングし、PBSで洗浄し、再度スピニングして、細胞ペレットをスナップ冷凍した。

【0055】

トランスフェクト細胞からの膜フラグメントの作成：赤血球の場合（実施例1）と同じ超音波処理法を用いて膜フラグメントを作成した。ただし、細胞の数は大幅に少なく、その結果、トランスフェクト293T細胞からのフラグメントの希釈係数はより大きいものとなった。

【実施例3】

【0056】

コーティングしたスライドおよびプレートの作成：

一般材料：ウシ血清アルブミン（最低限96%電気泳動）は、Sigma-Aldrich社（ドーセット、英国）から購入した。PBSタブレット（100mlにつき1タブレット）は、Scientific Laboratory Supplies社（ノッティンガム、英国）から購入するか、Alba Bioscience自社製のPBSを使用した。

【0057】

マイクロプレート：96ウェルのガラス底のMatrixマイクロプレートは、Matrix Technologies社（英国）から購入し、96ウェルのガラス底のPorvairマイクロプレートは、Porvair Science社（シェパートン、英国）から購入した。

【0058】

コーティング試薬：オレイル-O-ポリ（エチレングリコール）-スクシニル-N-ヒドロキシ-スクシンミジルエステル、「サンブライト（登録商標）」OE-040C（ポリエチレングリコール部分に、平均して90のエチレンオキサイド繰り返し単位を有し、分子量は4000である）は、NOF EUROPE（BELGIUM）NV社から購入した。中間分子量の塩化ポリジアリルジメチルアンモニウム（polyDADMAC）FL4440（活性率39~42%）は、SNK社（キャッスルフォード、英国）が提供してくれた。ポリ-L-リジン溶液PLL（1%W/Vの水溶液）と3-グリシドキシプロピル-トリメトキシシラン（GOPS）は、Sigma-Aldrich社（ドーセット、英国）から購入した。

【0059】

方法：

スライドの浄化：スライドを、50g NaOH / 250ml 96% EtOH / 200ml MilliQ精製水の中で、室温で2時間、そっとシェイクしながら浄化した。

【0060】

マイクロプレートの浄化：0.2モル濃度のNaOHを200μlずつ、マイクロプレートの96ウェルの各々にピペットで滴下し、室温で30分放置した。Dynex Ultrawash Plus ELISAマイクロプレート・ウォッシャーを使用し、逆浸透精製水でプレートを2×3回洗浄した。90%のEtOHをさらに200μl各ウェルに追加した後、30分間室温に放置してインキュベートした。マイクロプレートを前記のように洗浄した。遠心分離機IEC Centra-4Bを使用し、4000rpm以下で5分間、各マイクロプレートを逆さまに遠心分離にかけ、乾燥させた。

【0061】

マイクロプレートのコーティング：

ポリ-L-リジン：100μlのポリ-L-リジン（0.1mg/mlを10%のPBS/RO水で希釈したもの）を各ウェルにピペット滴下し、室温に一晩放置した。自動ピペット洗浄器を使用し、100μlのRO水で2回、非結合のPLL溶液を洗い流し、前記と同様に遠心分離機にかけて乾燥させた。プレートを40のオープンに5分間入れた。

10

20

30

40

50

【0062】

GOPS : 100 μ l の GOPS (10 mg / ml 以下を 94 % の EtOH / RO 水に入れたもの) をマイクロプレートの各ウェルにピペット滴下し、室温に一晩放置した。自動ピペット洗浄器を使用し、100 μ l の 90 % EtOH / RO 水で 2 回、非結合の GOPS 溶液を洗い流し、前記と同様に遠心分離機にかけて乾燥させた。プレートを 60 のオープンに 60 分間入れた。

【0063】

「サンブライト (登録商標)」OE - 040C : 100 μ l の 1 % BSA / PBS / RO 水溶液をマイクロプレートの各ウェルにピペット滴下し、室温に一晩放置した。自動ピペット洗浄器を使用し、100 μ l の PBS 水で 2 回、過剰な 1 % BSA / PBS / RO 水溶液を洗い流し、前記と同様に遠心分離機にかけて乾燥させた。100 μ l の SUNBRIGHT OE - 040C (0.08 mg / ml を PBS / RO 水に入れたもの) をマイクロプレートの各ウェルにピペット滴下し、室温に 1 時間放置してインキュベートした。自動ピペット洗浄器を使用し、100 μ l の PBS / RO 水で 2 回、非結合の SUNBRIGHT OE - 040C を洗い流し、前記と同様に遠心分離機にかけて乾燥させた。

10

【0064】

FL 4440 (polyDADMAC) : 100 μ l の 0.08 mg / ml polyDADMAC PBS をマイクロプレートの各ウェルにピペット滴下し、室温に 1 時間放置した。自動ピペット洗浄器を使用し、100 μ l の RO 水で 2 回、非結合の polyDADMAC を洗い流し、前記と同様に遠心分離機にかけて乾燥させた。

20

【0065】

スライドのコーティング : マイクロプレートの場合と同様の濃度、温度およびインキュベート時間を用いて、スライドを PLL、「サンブライト (登録商標)」OE - 040C および FL 4440 でコーティングした。

【実施例 4】

【0066】

タンパク質マイクロアレイの作成 :

前記のように表面をコーティングしたスライドを基板として使用した。スポットする膜フラグメントのサンプルを、PBS またはその他の安定液剤内に準備した。

【0067】

Spot Bot (Telechem / Array it) または BioRobotic MicroGrid II Arrayer を用い、200 ~ 700 μ m の硬質ピンで、スライドをプリントした。各サンプルの複製を、各スライド上にプリントし、スライドを少なくとも 1 時間、空気乾燥させてからバック内に密閉し、4 の温度で、必要となるまで保った。スライドを、PBS 内で軽くすすいでから、PBS - BSA ブロッキング剤の容器内で、絶えず混ぜ合わせながら 1 時間、室温で処理した。取り出す際、スライドを PBS で軽くすすぎ、遠心分離機内で 1 分間、1000 rpm で遠心分離して乾燥させた。

30

【実施例 5】

【0068】

タンパク質マイクロアレイを使用した抗体スクリーニング検査 :

実施例 4 に従って準備した各マイクロアレイを、チャンバで覆った。被験者の血液サンプルを、PBS 内で 1 / 10 に希釈した。その後、450 μ l の抗体溶液を、チャンバの小窓の 1 つからピペットでマイクロアレイのスライド上に滴下し、付属のシールで小窓を密閉した。スライドをスライドボックスに入れ、室温で 1 時間、混ぜ合わせた。

40

【0069】

チャンバを取り外し、スライドを軽く PBS に浸して、過剰な標的溶液を除去し、その後、PBS 内で 10 分間、2 回洗浄した。最後の洗浄を済ませた後、スライドを遠心分離機にかけて乾燥させ、無塵の暗所にスキャニングまで保管した。なお、抗体は、Alba Bioscience 社 (エディンガム、英国) から入手した。

【実施例 6】

50

【0070】

データの抽出および分析：

GenePix Personal 4100A Scannerまたは同様のスキャナを用いて、スライドをスキャンした。波長設定は、Cy3/FITC用のものを使用した。すべてのスライドを、 $10\ \mu\text{m}$ の画素サイズでスキャンし、BMPおよびTIFの両ファイルに保存した。

【0071】

GenePix Pro 4.1 (Axon Instruments社)または同様の機具を用いて、マイクロアレイから数値データを抽出した。スキャンング、データ入力、およびマイクロアレイからのデータ抽出を、ソフトウェアで制御した。テキスト入力ファイルは、マイクロアレイのカラムおよび列の位置を用いて自動作成され、各プローブを同定し、その位置を決定した。これを用いて、アレイリストを作成し、マイクロアレイグリッドの設定完了後にロードした。グリッドとアレイリストの作成が完了すると、データはテキストファイルに抽出された。このプロセスにより、各スポット中心からの蛍光強度の中央値、およびスライドのバックグラウンド全体からの蛍光強度の中央値を得た。この情報を、エクセルのワークシートに収集した。

【0072】

各スポットにつき、蛍光強度値からバックグラウンド蛍光値を差し引いた。スライド毎に、それぞれ異なるスキャン設定からのシグナル強度値を、1つのワークシートに並べた。設定ごとの各設定に対する全数値を用いて、散布図にした。こうして得られたデータの形状は、スキャンの質の目安となるものであり、設定が低すぎたり、高すぎたりした場合は、飽和スポットとして表わされた。各グラフにR²値を適用し、1に最も近い数値を出したものを、最良のデータとした。将来的データ処理用に、各スライドから1スキャンを選択した。

【0073】

最良のスキャンデータを選択した後、以下のように処理した。不要なデータをワークシートから除去し、マイクロアレイ上の1スポットにつき1つの数値(各スポットにつき、蛍光強度値からバックグラウンド蛍光値を差し引いたもの)だけを残した。陰性対照の数値を用いて、「ノイズ」値を計算した。すなわち、陰性対照の平均値に、標準偏差の2倍をプラスした(平均+2標準偏差)。この数値は、非特異的結合(NSB)を表す。各スポットの数値を陰性対照の「平均+2標準偏差」で割って、シグナル対ノイズ比(S/N)を求めた。1以上の数値であれば、有意と判断し得た。各サンプルの反復スポットにつき、S/Nの中央値を計算した。

【0074】

マイクロソフト社のエクセルを用いて、処理データを、必要に応じて分析した。データの分析には、一般に棒グラフを活用した。棒グラフのY軸は、サンプルのS/N中央値を示す。

【0075】

結果：

こうして得た結果を、図1～図12に示す。

【0076】

図1～3は、「サンブライト(登録商標)」、ポリ-L-リジンおよびpolyDADMACでコーティングしたスライドのモノクロナール抗体パネル(抗D、抗C、抗E、抗cおよび抗e)に対する反応性を示す。R₁R₁、R₂R₂およびrrの赤血球型からの膜フラグメントが固定化された。PBSバッファを対照とした。蛍光標識した抗ヒト二次抗体を用いて、結合抗体を検出した。

【0077】

シグナル対ノイズ比(S/N)が1よりも大きければ、陽性で見なした。抗体に対する様々な細胞型の反応性として期待されるのは、既知の反応性にに基づき、次のような結果であった：

R_1R_1 : D+ C+ E- c- e+、
 R_2R_2 : D+ C- E+ c+ e-、
 rr : D- C- E- c+ e+。

【0078】

図1～図3には、前記赤血球膜フラグメントを固定した表面のすべてから、期待通りの反応性が得られたことが示されている（ただし、 R_2R_2c 抗原の反応性については、一貫した結果が得られなかった）。このことは、固定化された細胞膜フラグメントが、様々な抗原に対する抗原性を十分に保持しているということを示している。

【0079】

図4は、抗S抗体でインキュベートした、様々な分子量のpDADMAC上に固定した、赤血球膜フラグメント（超音波処理あり）と赤血球ゴースト（超音波処理なし）の反応性を比較したものである。

【0080】

*NS：超音波処理なし（ゴースト）； S：超音波処理あり（膜フラグメント）、
赤血球 S / s 表現型：

R_1R_1 : S - s+
 R_2R_2 : S - s+
 rr : S + s-。

【0081】

期待される反応性： rr のみ陽性、
IgG：直接スポットした二次抗体の陽性対照。

【0082】

Floquat (pDADMAC) は、前記実験で処方されたものを使用した。

【0083】

結論：すべての処方のpDADMACが適切と判断できた。少なくとも抗S抗体に関する限り、平均分子量が少ないものの方が、S/N値が良好であった。また、膜フラグメント（超音波処理あり）の方が、幾分か良好な結果（5つ処方のうち3つにおいて）を示した。フラグメントのさらなる利益（安定性、サイズの均一性など）は、よりサイズ小さいスポット（200 μm位）の方が顕著である。ここで使用したスポットは、およそ1 μmであり、マニュアルでスポットティングされた。

【0084】

図5a～図5cは、先の実施例と同様の R_1R_1 、 R_2R_2 および rr の細胞型と、抗D（ヒトIgM）抗体を使用し、コーティング剤の濃度の増加に伴う効果を示したものである。1/1000希釈のpDADMACと2 μMの「サンブライト（登録商標）」が先例でコーティングに使用された濃度であった。この実験は、コーティング濃度の増加が、膜フラグメントの固定化を向上させるかどうか、従って、より良い結果を生むかどうかを調べるためのものであった。これらの実験結果は、これまでに用いてきた濃度が効果的であり、濃度を増加させても結果の改善が見られないことを示した。

【0085】

結論：コーティング剤の濃度を増加させても、反応性の改善は見られず、最も低いコーティング濃度でさえ、飽和濃度であることが分かった。

【0086】

図6～図11は、「サンブライト（登録商標）」、polyDADMACおよびポリ-L-リジンでコーティングされ、赤血球膜フラグメント（ R_1R_1 、 R_2R_2 および rr ）をキャリアするマイクロアレイの、抗Dおよび抗Eモノクローナル抗体に対する反応性をそれぞれ示している。結合抗体は、蛍光標識二次抗体（Cy3）を用いて検出された。

【0087】

条件は以下の通りである：

二次抗体の陽性対照：直接スポットした抗D（ヒトIgM）および抗c（ヒトIgM）

、

10

20

30

40

50

二次抗体の陰性対照：直接スポットした抗S（ヒトIgG）、
 R_1R_1 、 R_2R_2 およびrr細胞からの赤血球膜フラグメントに期待される反応性：
 抗E（ヒトIgM）： R_2R_2 陽性、rrおよび R_1R_1 陰性。

【0088】

抗D（ヒトIgM）： R_1R_1 および R_2R_2 陽性、rr陰性、
 なお、陽性反応のカットオフ値は2とした。

【0089】

結論：

PLL / 抗D： 反応パターンに一貫性が見られなかった。原液では幾分かの反応性を示し、1 / 10希釈では全く反応せず、1 / 100希釈において最良の反応性を示した；

PLL / 抗E： R_2R_2 において、非常に低いS / N値を示した；

「サンブライト（登録商標）」 / 抗D： 反応パターンに幾分か矛盾が見られた；

「サンブライト（登録商標）」 / 抗E： R_2R_2 の1 / 10、1 / 100希釈において良好な反応性を示した；

pADMAC / 抗D： 一貫した反応パターンを見せた。プリントしたフラグメントの希釈度が増すにつれ、S / N値は増加した。これは、非特異的なバックグラウンドシグナルが、希釈されて消失したためと考えられる；

pDADMAC / 抗E*： 上記と同様の反応を示した；

*ただし、 R_1R_1 の1 / 100希釈、1 / 2000二次抗体だけは、偽陽性反応を示した。

【0090】

図12aおよび図12bは、トランスフェクト細胞（コロニー1, 1；1, 2；2, 3；4, 3および7, 1）および赤血球（ R_1R_1 、 R_2R_2 およびrr）からの膜フラグメントをキャリアするpDADMACコーティングの反応性を示している。対照は、K562、PBSおよび標的細胞（陰性）である。膜フラグメントは、グリコフォリンAおよびBのコード配列を含むpCMV発現プラスミドをトランスフェクトした293T細胞から作成した。細胞から作成された膜フラグメントは、トランスフェクトの24時間後に収集された。

【0091】

赤血球表現型：

R_1R_1 ： K-、Fy(a-)、Jk(b-)、S-s+、M-、N+、

R_2R_2 ： K+k+、Fy(a+b+)、Jk(a-)、S+s+、M+、N-、

rr： K+、Fy(a+b-)、Jk(a+b+)、S+s-、M+、N-。

【0092】

期待される反応性：

1, 1；1, 2および7, 1は、MまたはN（グリコフォリンAのクローン遺伝子を含む）と反応することが期待される；

1, 2は、あまり反応しないものと考えられる；

1, 1は、抗Nモノクローナル抗体とよく反応する；

7, 1は、抗Mモノクローナル抗体とよく反応する；

2, 3および4, 3は、抗MまたはN（グリコフォリンBのクローン遺伝子を含む）と、反応しないことが期待される。ただし、両遺伝子（M / N特異性を有する）のN末端は同一であるため、何らかの交差反応は起こりうる；

特に4, 3は、何らかの交差反応を示す可能性がある。

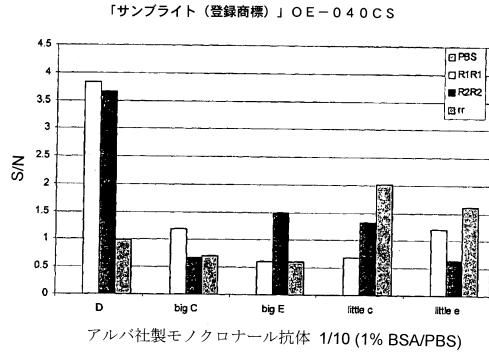
【0093】

標的細胞 - 陰性対照： 非トランスフェクトT細胞；

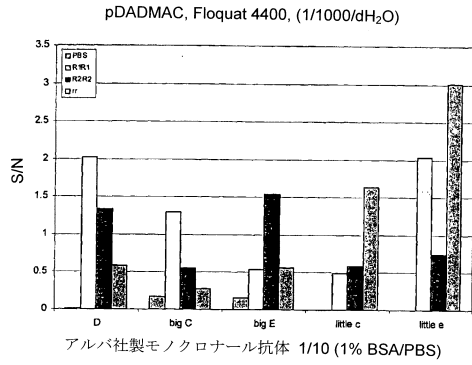
K562 - 陽性対照： MNSを発現する赤血球系細胞株。ただし、使用される細胞数が少ないため、スポットされる膜フラグメントの密度はかなり低い；

PBS - 陰性対照： バッファ。

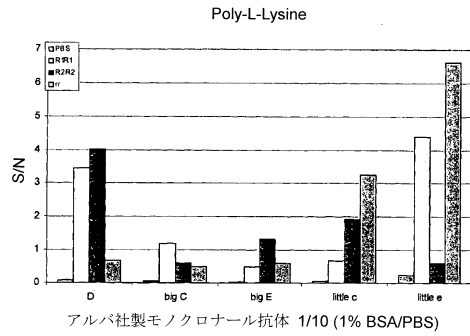
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】

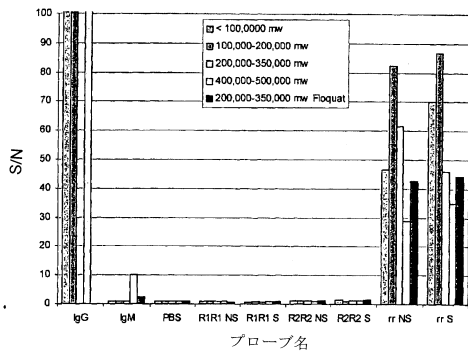


【 図 4 】

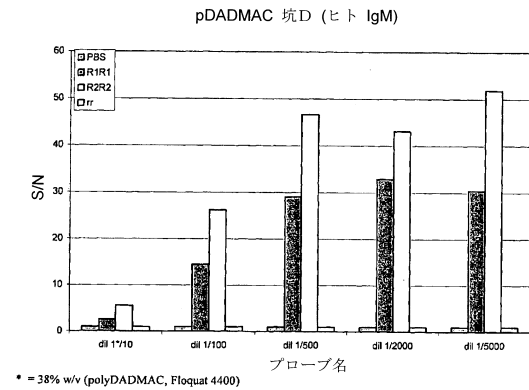
抗S抗体でインキュベートした分子量の異なるpDADAC上における赤血球膜フラグメント (超音波処理あり) と赤血球ゴースト (超音波処理なし) との対比

pDADAC (1/500/dH₂O)、超音波処理あり (S) および超音波処理なし (NS) の膜フラグメント、

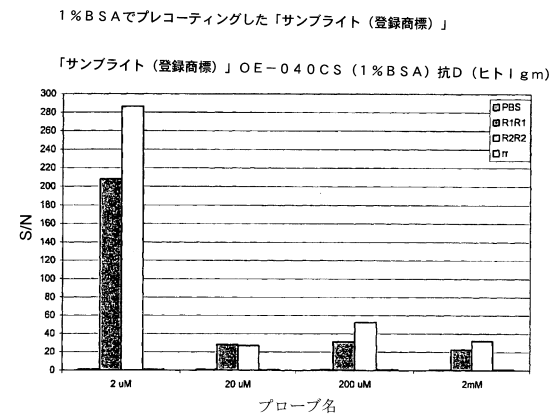
抗ヒトS (1/10 1% BSA/PBS)、Cy3抗ヒトIgG (1/750 1% BSA/PBA)



【 図 5 (a) 】



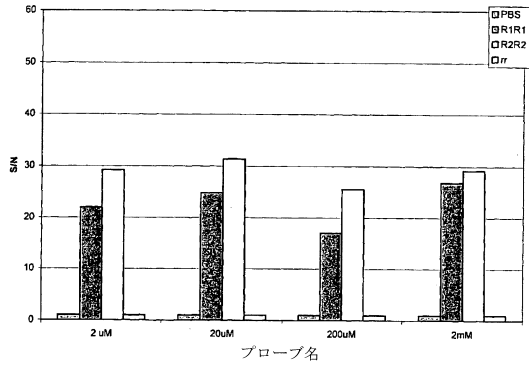
【 図 5 (b) 】



【 図 5 (c) 】

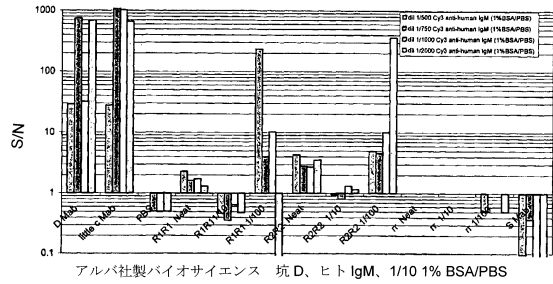
1%BSAでプレコーティングした「サンブライト（登録商標）」

「サンブライト（登録商標）」OE-040CS（1%BSA）抗D（ヒトIgM）

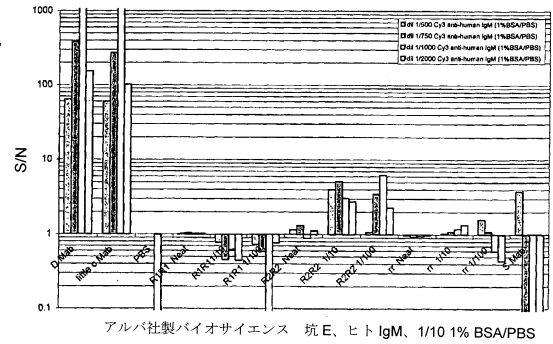


【 図 6 】

4%BSAでプレコーティングした「サンブライト（登録商標）」
「サンブライト（登録商標）」OE-040CS（4%BSA）抗D（ヒトIgM）

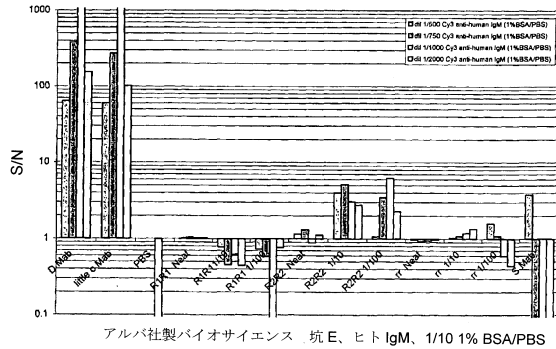


4%BSAでプレコーティングした「サンブライト（登録商標）」
「サンブライト（登録商標）」OE-040CS（4%BSA）抗E（ヒトIgM）



【 図 7 】

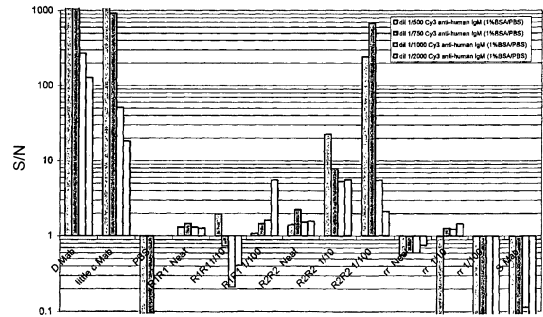
4%BSA/PBS でブロックした SUNBRIGHT OE-040CS
パバイン処理/超音波処理した膜フラグメント



アルバ社製バイオサイエンス 坑 E、ヒト IgM、1/10 1% BSA/PBS

【 図 9 】

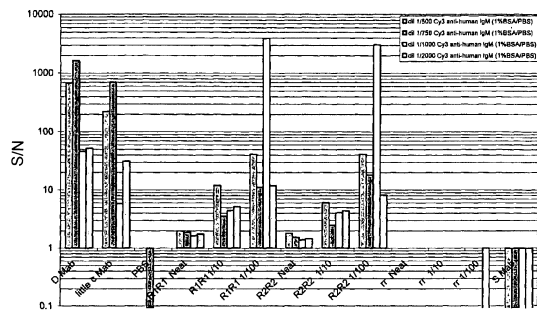
4%BSA/PBS でブロックした pDADMAC(1/500 dH₂O)
パバイン処理/超音波処理した膜フラグメント



アルバ社製バイオサイエンス 坑 E、ヒト IgM、1/10 1% BSA/PBS

【 図 8 】

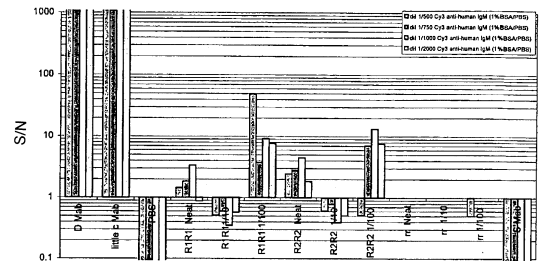
4%BSA/PBS でブロックした pDADMAC(1/500 dH₂O)
パバイン処理/超音波処理した膜フラグメント



アルバ社製バイオサイエンス 坑 D、ヒト IgM、1/10 1% BSA/PBS

【 図 10 】

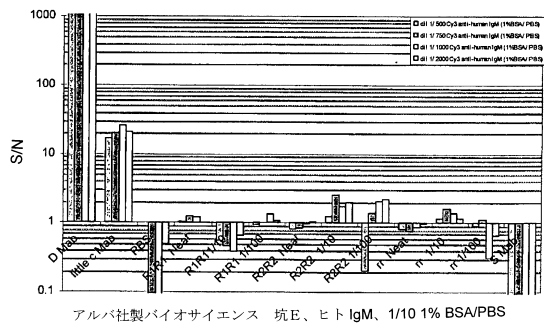
4%BSA/PBS でブロックした poly-L-Lysine (1/10 PBS/m illiQ H₂O)
パバイン処理/超音波処理した膜フラグメント



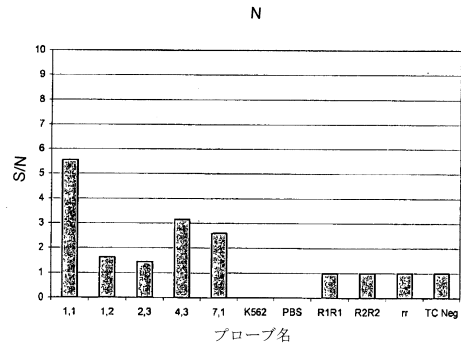
アルバ社製バイオサイエンス 坑 D、ヒト IgM、1/10 1% BSA/PBS

【 1 1】

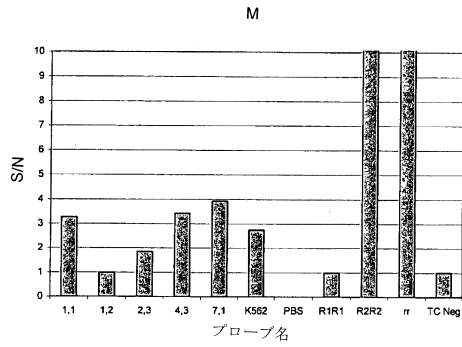
4%BSA/1%スクロース PBS でブロックした poly-L-Lysine (1/10 PBS/m illiQ H2O)
 パパイン処理/超音波処理した膜フラグメント



【 1 2 (b)】



【 1 2 (a)】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(72)発明者 オルニー, ニコラ, メアリー
イギリス国, イーエイチ7 5イーエックス, エジンバラ, モンゴメリー ストリート, 1 0 7 /
8

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開平09-054091(JP, A)
国際公開第2005/005986(WO, A1)
特開2005-181154(JP, A)
国際公開第2006/034385(WO, A1)
国際公開第2005/115622(WO, A1)
国際公開第2006/023383(WO, A1)
特開昭62-088963(JP, A)
特許第3330604(JP, B2)
特表2003-516747(JP, A)
特表2005-524058(JP, A)
米国特許第05919576(US, A)
特表平08-501145(JP, A)
米国特許出願公開第2004/0213909(US, A1)
特表2005-515402(JP, A)
特表2004-531390(JP, A)
特表2007-517802(JP, A)
Int J For Parasitol, 1982年, Vol.12, No.2/3, Page.103-109
Methods Enzymol, 1974年, Vol.31, No.Pt.A, Page.172-180
J Biotechnol, 2000年, Vol.81, No.2/3, Page.107-112

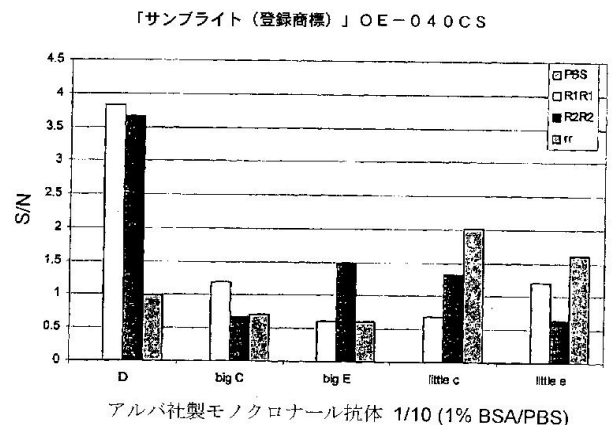
(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3
G 0 1 N 3 3 / 5 5 2
G 0 1 N 3 7 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 血型抗体筛选 | | |
| 公开(公告)号 | JP5677835B2 | 公开(公告)日 | 2015-02-25 |
| 申请号 | JP2010502561 | 申请日 | 2008-04-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿尔巴生物科技有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 阿尔巴生物科技有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 阿尔巴生物科技有限公司 | | |
| [标]发明人 | ペトリックジュラージ ロブジェニンスコット オルニーニコラメアリー | | |
| 发明人 | ペトリック,ジュラージ ロブ,ジェニン,スコット オルニー,ニコラ,メアリー | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/552 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | G01N33/80 G01N33/54393 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.K G01N33/543.525.C G01N33/543.525.U G01N33/543.501.J G01N33/552 G01N37/00.102 | | |
| 审查员(译) | 三木隆 | | |
| 优先权 | 2007006820 2007-04-10 GB | | |
| 其他公开文献 | JP2010523995A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

提供了用于检测血型抗原抗体的测定法，其包括固定有细胞膜片段的固体基质，所述细胞膜片段呈现能够结合血型抗体的血型抗原。细胞碎片优选来自红细胞。抗原可以以斑点阵列的形式固定。



【図 2】