

(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 - 525452**

(P2003 - 525452A)

(43)公表日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	K 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	2 G 0 5 4
1/32		1/32	4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 6 3
33/48		33/48	M 4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全 29数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 563900(P2001 - 563900)

(86)(22)出願日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月2日(2002.9.2)

(86)国際出願番号 PCT/CN01/00064

(87)国際公開番号 W001/065256

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 00 1 13747.6

(32)優先日 平成12年3月1日(2000.3.1)

(33)優先権主張国 中国(CN)

(71)出願人 胡軍  
H U , J U N

中華人民共和国陕西省西安市新城区長樂西路17号308棟70号

(72)発明者 胡軍 ( H U , J U N )  
中華人民共和国陕西省西安市新城区長樂西路17号308棟70号

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血中リンパ球の特異抗原に対する反応性を決定するための方法

(57)【要約】

本発明は、血中リンパ球の特異抗原に対する反応性を検出するための方法を開示する。第一に、既知のHLAを含有している標準細胞株を対象のリンパ球と共に2～28時間、in vitroで濃縮培養し、次いでリンパ球の反応性を、免疫学的方法により評価する。本発明は、移植後の受容者の免疫学的状況を動的にモニタリングするための方法を提供し、対象へ与えられる免疫抑制薬の投与量を調整するための臨床データを提供する。従って、それは、移植の許容性の評価を改良することができる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 血中リンパ球の特異抗原に対する反応性を決定するための方法であって、

レシピエントの末梢血中のTリンパ球を、細胞培養培地を用いて細胞懸濁液へと調製すること；

公知のHLA抗原を含有している標準細胞株を用いて調製された細胞アッセイプレートを使用して、1：0.5～10の標的-エフェクター比で、細胞懸濁液を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加すること；

細胞を2～28時間培養すること；及び

次いで、ドナー抗原を含有している細胞株のウェル内のレシピエントのリンパ球の反応性と、ドナー抗原を含有していない他の対照ウェル内のリンパ球の反応性との差を識別し、それによりレシピエントのリンパ球が感作されているか否かを決定しうることを含む方法。

【請求項2】 検出が、顕微鏡を使用して各ウェル内のリンパ球形質転換の存在を観察すること、及び細胞数計数により形質転換率を得ることにより実施される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 培養培地が標識されたTTPを含有している培養培地であり、細胞培養の6～28時間の間に、標識されたTTPが細胞内DNAの合成に取り込まれ、それにより細胞核が普通の顕微鏡又は蛍光顕微鏡の下で所定の有意な特徴を直接的に示すようになる、請求項1記載の方法。

【請求項4】 2～6時間の細胞培養の後、各ウェルから、等量の上清を、もう一つの空のアッセイプレートのそれぞれ対応する培養ウェルへと取り出して、デヒドロゲナーゼアッセイの酵素反応を実施し、反応を停止させた後、480～630nmの波長域内で、最大吸収値が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の溶液の吸光度を読み取る、請求項1記載の方法。

【請求項5】 6～16時間の細胞培養の後、それぞれ等量の3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラ-ゾリウムブロミド(MTT)溶液を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加し、細胞培養を2

～6時間続行し、培養を停止させた後、各ウェル内の上清を採集し、480～630nmの波長域内で、MTT溶液の最大吸収が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の溶液の吸光度を読み取る、請求項1記載の方法。

【請求項6】 培養を停止させた後、上清が取り出された細胞アッセイプレートの各ウェルに、等量のDMSOを添加し、細胞内ホルマザン結晶を溶解し、480～630nmの波長域内で、最大吸収値を有する波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取る、請求項5記載の方法。

【請求項7】 細胞アッセイプレートを調製するために使用される各標準細胞株が、MTTの還元由来する等量のホルマザン結晶を含有しており、前記のような細胞培養の後、MTTアッセイを使用して、各ウェル内のMTT又はホルマザン結晶を検出することができる、請求項1記載の方法。

【請求項8】 上記MTTアッセイが、細胞を3～8時間培養した後に、等量の酸化剤を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加し、培養を1～4時間続行し、酸化剤が損傷を受けた標的細胞の中のホルマザン結晶をMTTへと酸化することができ、そして細胞培養を停止させた後、480～630nmの波長域内で、MTT溶液の最大吸収値が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取るものである、請求項7記載の方法。

【請求項9】 上記MTTアッセイが、細胞を4～10時間培養した後に、上清を除去し、等量のDMSO溶液を各ウェルに添加して、無傷の標的細胞の中のホルマザン結晶を溶出させ、次いで、各ウェル内の上清を採集し、480～630nmの波長域内で、吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取ることである、請求項7記載の方法。

【請求項10】 上記MTTアッセイが、細胞を4～10時間培養した後に、等量の有機溶媒を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加して、損傷を受けた標的細胞の中のホルマザン結晶を溶解させ、各ウェル内の上清を採集し、480～630nmの波長域内で、吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取ることである、請求項7記載の方法。

【請求項11】 上記有機溶媒が、メタノール、エタノール、ベンジルアルコール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びジメ

チルベンゼンからなる群より選択される、請求項10記載の方法。

【請求項12】 細胞アッセイプレートの構造が、下記：培養ウェルの直径が3～6mmであり、培養ウェルの深さが5～15mmであり、各ウェルの外側周辺側面には突出した側面が備わっており、ウェルの底は平坦であり、ウェルの側面壁と斜めに連結されており、カバーの内部側壁の下方部分と細胞プレート本体の対応する側壁との間には、横方向ノッチ-フランジ構造である二重挟みメカニズムが備わっており、カバーを細胞プレート本体の上に下向きに押し付け、2つの側面上のフランジを第一ノッチにはまるように移動させた時、カバー上のシーリングパッドは培養ウェルを完全には密封することができないが、カバーをさらに下向きに押し付け、フランジを第二ノッチには丸用に移動させた場合には、シーリングパッドが培養ウェルを完全に密封するものである、請求項1～11のいずれかに記載の方法。。

【請求項13】 標準細胞株が下記：修飾の対象としてBリンパ球株を選択し、その染色体DNA上のHLA遺伝子断片を遺伝子ノックアウトの方法により除去すること；

次いで、特異HLA抗原の遺伝子を、その染色体DNAへと挿入し、発現可能にし、ただ1個のHLA抗原を発現する標準細胞株系を作成することにより調製される、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の領域

本発明は、臓器移植後のドナー臓器に対するレシピエントの拒絶の程度を決定するため、血中リンパ球の特異抗原に対する反応性を決定するための方法に関する。移植された臓器に対するレシピエントの拒絶状況を決定し、それにより臨床実務のための参照の基礎を提供するため、標準細胞株を使用することにより、レシピエントの末梢血中Tリンパ球の殺傷機能及び増殖応答能がインビトロで評価される。

**【0002】**

## 発明の背景

臓器移植片拒絶の主因は、レシピエントの抗原とドナーの抗原との違いにある。拒絶を引き起こす主因がヒト白血球抗原(HLA)の違いにある同種異系移植においては、拒絶反応を引き起こす抗原は、特異的であり、数が限られている。1991年までに、ヒト集団全体で161種のHLA抗原が同定されており、そのうち122種がI型抗原、39種がII型抗原である。混合リンパ球反応は、主にII型抗原により誘導され、細胞障害性Tリンパ球(CTL)の殺傷活性は、主にI型抗原により誘導される(Transplantation Immunology、Chen Shi編、Hu Bei Science and Technology Press、China、1998年10月)。これらのHLA抗原は、ヒト集団からのスクリーニングすることにより、又は遺伝子工学を利用することによって入手することができ、既知の遺伝背景を保有しており、かつ特異的な1個又は数個のHLA抗原を安定的に発現している標準細胞株を開発、即ち樹立することができる。これらの標準細胞株は、各標準細胞株が、HLA抗原の中の1種又は数種の特異抗原のみを発現するであろうことを特徴とする。例えば、ある種類の標準細胞株の細胞膜表面上には、HLA-A23のみが発現しているが、別の種類の標準細胞株の細胞膜表面上には、DR9のみが発現している(正常なヒトのB細胞上には12種を越えるのHLA抗原が発現している)。このように、それぞれ1種又は数種の特異抗原のみを発現する多くの異なる標準細胞株を樹立することが可能である。現在、アメリカの2つの会社、Lamda及びPei-f

reezeが、1個の細胞の表面上に数種のHLA抗原を発現している標準細胞株を樹立し、これらの樹立された標準細胞株を、PRAアッセイプレートと呼ばれる商品として市場に出している。この製品は、臓器移植前のレシピエントのHLAに対する抗体のレベル及び特異性を決定し、それにより超急性拒絶の可能性を予測し、ドナー選択の基礎を提供するための抗原担体として、主に使用されている。しかしながら、ただ1種のI型HLA又はII型HLAを発現している細胞株は、これまで樹立されていない。

#### 【0003】

混合リンパ球反応は、数十年前より確立されており、免疫学においては、1種又は数種の特異抗原に対する身体の細胞免疫状況を決定するための方法において使用されている。臓器移植の領域においては、移植された臓器の生着性及び拒絶の可能性を予測するため、移植前にレシピエントのHLA抗原とドナーのHLA抗原とのマッチング状況を決定するため、以前は使用されていた。しかし、過程が複雑であること、安定性及び再現性が低いこと、そして多くの時間を要することから（通常、結果を得るには5～7日が必要であった）、臓器ドナーが死体である場合には、その反応を適用することは困難である。従って、より優れた他のHLAタイピング技術が開発された後、この方法は徐々に使用されなくなっていった（Cellular&Molecular Immunology、Boquan Jin編、World Books Publishing Co.、1995年8月、230頁）。

#### 【0004】

プレプロセッシングリンパ球タイピングテスト（Pre-processing Lymphocyte Typing Test）（Cellular&Molecular Immunology、230頁）：タイピングにおける混合リンパ球反応の短所を克服するため、この方法が開発された。この方法は、以下の工程を含んでいる：1種又は数種の特異HLA抗原を含有していることが既知の細胞を誘発細胞とし、特異HLA抗原を含有していないTリンパ球を反応細胞として単離する。次いで、混合リンパ球反応のため、誘発細胞と反応細胞とを混合する。9～14日間培養した後、反応細胞の増殖が徐々に停止する。最終的に、反応細胞は、1種又は数種の特異HLA抗原により感作された記憶細胞となる。それらは、プレプロセッシング（pre-processed）（プレ感作（pre-sensiti

zed) )された細胞と呼ばれ、液体窒素中に保存される。マッチタイピングにおいては、これらの細胞が解凍させられ、反応細胞として使用され、レシピエント又はドナーのリンパ球が誘発細胞として使用される。これらの誘発細胞が、プレプロセッシングにおいて使用された誘発細胞に含まれるHLA抗原と同一のHLA抗原を含有している場合、プレプロセッシングされた反応細胞は、直ちに記憶反応を発現し、20～30時間以内に、迅速に増殖反応が起こる。このようにして、レシピエント又はドナーのリンパ球が、この特異抗原を含有しているか否かを決定することができる。

#### 【0005】

細胞障害性Tリンパ球キラーテストも、数十年前に確立されている。免疫学において、それは、細胞表面上に存在する1種又は数種の抗原に対する身体の感作状況を決定するために使用されることが多い(Immunology and Immunoassay、Yixun Tao編、the People's Health Publishing House、China、1989年10月、250頁)。近年、キラー細胞活性の検出は、臓器移植における拒絶反応のモニタリングにおいても使用されている。しかしながら、個体差のため、このテストの適用は、現在のところ、ドナー由来細胞を標的細胞とした1対1の分析に限定されている。しかし、検出のための標的細胞を常に提供することができる臓器移植ドナーは、生存ドナーのみである。この理由から、現在のところ、この方法は、生存ドナーより提供された臓器移植片の検出においてのみ使用されており、そうでない場合には標的細胞の起源が存在しない。従って、この方法を広範囲に使用することは、困難である。

#### 【0006】

現在、臓器移植を受ける患者数の毎年の増加は、40,000例を超えている。臓器移植後、レシピエントは、長期にわたり免疫抑制薬を摂取しなければならない。用量が高すぎる場合、それはコストを増加させるだけでなく、レシピエントが感染性疾患及び悪性腫瘍に罹患する可能性をも促進する。用量が低すぎる場合には、移植された臓器は拒絶され、その機能は失われる。特定の各個体にとって適切な用量をいかにして選択するかは、長い間、臨床従事者の難題であった。何年もの間、生検及び穿刺術が、投与管理のための「最高の」指針として使用さ

れてきたが、高いコスト及び苦痛のため、それは患者に容易には受け入れられない。さらに、穿刺術はそれ自体極めて危険性が高く、頻繁にそれを実施することは推奨されない(Transplantation Immunology、200頁)。従って、移植された臓器の機能を失わせる拒絶反応のため、多くの患者が、臓器移植後、医師が気づくことなく突然に死亡する。

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明の目的は、血中リンパ球の(1種以上の)特異抗原に対する反応性を決定するための方法を提供することである。この方法において、「(1種以上の)特異抗原」とは、レシピエント体内で拒絶反応を引き起こすことができるドナー抗原を意味し、「特異抗原に対する反応性」とは、レシピエントのリンパ球の(1種以上の)特異抗原に対する反応状況をさす。

#### 【0008】

本発明は、以下の工程を特徴とする、血中リンパ球の(1種以上の)特異抗原に対する反応性を決定するための方法を提供する。レシピエントの末梢血中Tリンパ球を、細胞培養培地を用いて細胞懸濁液へと調製し、次いで、既知のHLA抗原を含有している標準細胞株を用いて調製された(コーティングされた)細胞アッセイプレートを使用することにより、1:0.5~10の標的-エフェクター比で、細胞懸濁液を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加し、次いで、細胞を2~28時間培養する。ドナー抗原を含有している試験ウェル内のレシピエントのリンパ球の反応性と、ドナー抗原を含まない対照ウェル内のレシピエントのリンパ球の反応性との差を判定し、それによりレシピエントのリンパ球が感作されているか否かを決定することができる。

#### 【0009】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、レシピエントの末梢血中Tリンパ球を検出することにより、ドナー臓器に対するレシピエントの免疫状況を動的にモニタリングするための手段を提供し、それによりレシピエントへ投与される臨床的な免疫抑制薬の投与量を調製するための基礎を提供し、そして臨床的症状が出現する前に拒絶反応の発生を予

測するために使用されうる、臓器移植後の血中Tリンパ球の(1種以上の)特異抗原に対する反応性を決定するための方法を提供する。さらに、それは、検出が無痛である、時間が比較的短い、コストが比較的低い、特異的が比較的高い、信頼性が比較的高い、という利点も保有している。

#### 【0010】

本発明は、レシピエントの末梢血中Tリンパ球と、既知のHLA抗原を含有している標準細胞株とのインビトロ混合リンパ球反応によって、レシピエント体内に拒絶反応が存在するか否かを決定するための方法を提供する。その方法は、以下の工程を特徴とする。レシピエントの末梢血中Tリンパ球を、細胞培養培地を用いて細胞懸濁液へと調製し、次いで、既知のHLA抗原を含有している標準細胞株を用いて調製された細胞アッセイプレートを使用することにより、1:0.5~10の標的-エフェクター比で、細胞懸濁液を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加し、次いで、細胞を2~28時間培養し、その後、免疫学的アッセイによりリンパ球の反応性を検出する。

#### 【0011】

該検出においては、顕微鏡を使用して、各ウェルにおいて細胞形質転換が起きているか否かを観察してもよく、そしてレシピエント体内に拒絶反応が存在するか否かを決定するため、細胞数計数によりその形質転換率を得てもよい。該培養培地は、標識されたチミジン三リン酸(TTP)を含む無血清培養培地であってもよい。細胞培養の6~28時間の間、標識TTPが細胞内DNAへと取り込まれ、それにより細胞核が普通の顕微鏡又は蛍光顕微鏡の下で、所定の有意な特徴を示すようになる。

#### 【0012】

様々なI型及びII型のHLA抗原を含有している標準細胞株が誘発細胞として使用され、レシピエントのリンパ球がプレ感作された反応細胞として使用されるこの型の混合リンパ球反応においては、反応細胞が、実際に体内で感作されている場合にのみ、in vitroでドナー抗原と遭遇した時に、迅速に細胞形質転換及び増殖を示すことができる、即ち、リンパ芽球へと形質転換される。形質転換された細胞は、比較的大きいサイズ、増加した細胞質、空胞の存在、明瞭な核小体、

脱凝集した染色質という特徴を保有しており、これらは全て、形態学におけるそれらの容易な識別を可能にする。標識 T T P が培養培地へ添加された場合には、細胞核の形態学的同定がさらに容易になる。細胞アッセイプレートの各ウェル内の標準細胞株は1種又は数種の特異 H L A 抗原を含有しているため、拒絶反応を引き起こすドナー抗原の型は、細胞の形質転換（又は増殖）が起こるウェルの位置に基づき決定されうる。形質転換率は、各ウェル内の形質転換された細胞を計数した後に入手されうる。次いで、ドナー抗原を含有しているウェルの平均形質転換率から、ドナー抗原を含まない全てのウェルの平均形質転換率を差し引くことにより得られた値により、体内の拒絶反応の程度が決定されうる。この形態学的観察法は、便利かつ経済的であり、迅速に結果を与えるが、人工要因は、ほとんど避けられず、さらに、細胞を計数するための作業負荷が極めて大きい。従って、人工要因を排除し、作業負荷を減少させるため、いくつかの装置を本発明において使用することもできる。

#### 【0013】

本発明の方法は、以下のように進行してもよい。前記のような2～6時間の細胞培養の後、各ウェル内の等量の上清を、空の細胞アッセイプレートのそれぞれ対応する培養ウェルへと取り出して、デヒドロゲナーゼ活性を決定するための酵素反応を実施する。反応を停止させた後、480～630nmの波長域で、吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の溶液の吸光度を読み取る。これらの吸収値から、レシピエント体内の拒絶反応レベルが決定されうる。デヒドロゲナーゼは細胞内に存在する酵素の1つである。通常は、それは細胞膜を通過することができない。しかしながら、ドナー抗原を含有している標的細胞（標準株）が、感作されたエフェクター細胞（Tリンパ球）からの攻撃により損傷を受けた場合、細胞膜の透過性が変化し、デヒドロゲナーゼが培地中に放出されうる。従って、各ウェル内のデヒドロゲナーゼの含量を酵素反応によって決定し、それから殺傷された又は損傷を受けた細胞の数を、推測することが可能である。この方法においては、自然放出対照群及び最大放出対照群という2つの対照群が確立されるべきであり、ドナー抗原を含まない4～10個の培養ウェルが対照ウェルとして使用される。レシピエントは臓器移植の前後に多くの検査

を受けなければならないため、拒絶反応を引き起こすHLA抗原の型のおよその範囲は、以前の検査から得られたデータに基づき実質的に決定されうる。それにより、ドナー抗原が含まれるべき、又は含まれるべきでない培養ウェルの位置が入手可能である。ドナー抗原を含有しているウェルの平均吸収値から、自然放出対照群の平均吸収値を差し引くことにより得られた値を、最大放出対照群の平均吸収値から、自然放出対照群の平均吸収値を差し引くことにより得られた値で割る。得られた商を、レシピエント体内の拒絶反応レベルの指標とすることができ、その商が大きいほど、キラー細胞が多く、拒絶反応が強い。

#### 【0014】

本発明の方法は、以下のように進行してもよい。前記のような6～16時間の細胞培養の後、等量の3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラ-ゾリウムブロミド(MTT)溶液を細胞アッセイプレート各ウェルに添加し、細胞培養を2～6時間続行し、その時点で、上清中のMTT残存量を検出することにより、又は形質転換細胞内のMTT変換量を決定することにより、細胞形質転換状況を決定することができる。1)各ウェル内の上清を採集し、480～630nmの波長域で、溶液の吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の溶液の吸光度を読み取る。この方法は、培養培地中の残存MTT量を決定するために使用されるため、高い吸収値を有するウェルは、細胞増殖を有しておらず、対照ウェルとして扱われるべきであり、より低い吸収値を有するウェルに含まれる抗原は、レシピエント体内で拒絶反応を引き起こすドナー抗原として見なされるべきである。対照ウェルの平均吸収値から、ドナー抗原を含有しているウェルの平均吸収値を差し引く。得られた差が高いほど、レシピエントのリンパ球の増殖は活発である。それは、レシピエント体内に拒絶反応が存在することを示唆する。2)上清が除去された細胞プレート各ウェルに、形質転換細胞からホルマザン結晶が溶解するよう、等量のDMSOを添加する。480～630nmの波長域で、吸収値が最大となる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度をそれぞれ読み取る。この方法は、形質転換細胞内のMTTに由来するホルマザン結晶を決定するために使用されるため、低い吸光度を有するウェルは増殖反応を有しておらず、天然対照

ウェルとして見なされ、より高い吸光度を有するウェルに含まれる抗原が、レシピエント体内で拒絶反応を引き起こすドナー抗原である。ドナー抗原を含むウェルの平均吸光度から、対照ウェルの平均吸光度を差し引く。得られた差が高いほど、レシピエントのリンパ球の増殖は活発である。これは、レシピエント体内に拒絶反応が存在することを示唆する。

#### 【0015】

本発明の方法は、以下のように進行してもよい。細胞アッセイプレート上の標準細胞株を調製する時、各細胞がMTTの還元由来するホルマザン結晶を等量含有するよう、それをMTTで処理することができる。細胞アッセイプレートが、前記の混合リンパ球反応による細胞培養に含まれる場合、それは、標的細胞として標準細胞株を使用したキラーテスト過程でもある。従って、キラー細胞の活性を決定することにより、検出結果を得ることができる。従って、本発明は、MTTアッセイを使用してキラー細胞活性を決定することにより、レシピエント体内に拒絶反応が存在するであろうか否かを決定することもできる。キラー細胞テストにおいては、キラー細胞の活性を決定するため、ドナー抗原を含有しているウェルをテスト反応ウェルとして使用し、ドナー抗原を含まないものを対照ウェルとして使用する。この目的には、3つの方法が存在する。

#### 【0016】

細胞を3～8時間培養した後、等量の酸化剤を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加する。培養を1～4時間続行する。酸化剤は、損傷を受けた標的細胞の中のホルマザン結晶をMTTへと酸化することができる。細胞培養を停止させた後、480～630nmの波長域で、最大吸収値が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取る。この方法は、損傷を受けた細胞の中のホルマザン含量を決定するために使用されるため、ウェルの吸光度が高いほど、その中のホルマザン含量が多く、このウェルにおいてはより多くの細胞が損傷を受けており、それは、その中に含まれる抗原がレシピエント体内で拒絶反応を引き起こすドナー抗原であることを示している。ドナー抗原を含まないウェルの平均吸光度を、ドナー抗原を含むウェルの平均吸収値から差し引く。得られた差が高いほど、拒絶反応が強い。

## 【0017】

細胞を4～10時間培養した後、酸化剤を含む上清を除去する。等量のDMSO溶液を各ウェルに添加して、無傷の標的細胞の中のホルマザン結晶をDMSOに溶解させる。各ウェル内の上清をそれぞれ採集し、480～630nmの波長域で、吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取る。プレ感作されたレシピエントのリンパ球は、増殖培養の過程において、ドナー抗原を含有している標準細胞株（標的細胞）に対する殺傷効果及び傷害効果を有しているため。生存している標的細胞が多いほど、損傷を受けた標的細胞は少ない。この方法は、生存標的細胞の数を決定するために使用されるため、ウェルの吸光度が低いほど、このウェルに存在する生存標的細胞が少なく、換言すると、殺傷され損傷を受けた標的細胞が多い。それは、このウェルに含まれる抗原が、レシピエント体内で拒絶反応を引き起こすであろうドナー抗原であることも示している。ドナー抗原を含むウェルの平均吸光度を、ドナー抗原を含まないウェルの平均吸収値から差し引く。得られた差が大きいほど、レシピエントにおける拒絶反応が強い。

## 【0018】

細胞を4～10時間培養した後、等量の有機溶媒を細胞アッセイプレートの各ウェルに添加して、損傷を受けた標的細胞の中のホルマザン結晶を溶解させる。各ウェル内の上清をそれぞれ採集し、480～630nmの波長域で、吸収極大が生じる波長を選択し、選択された波長において各ウェル内の上清の吸光度を読み取る。この吸光度は、拒絶反応がレシピエント体内で起こっているか否かを決定するために使用されうる。そのメカニズムは、前記と実質的に同様である。前記有機溶媒は、ホルマザンを溶解させることができるが、細胞へ侵入することはできないものであるべきである。例えば、この溶媒は、メタノール、エタノール、ベンジルアルコール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びジメチルベンゼンからなる群より選択されうる。

## 【0019】

以下の細胞アッセイプレートが、本発明において使用されうる。

## 【0020】

本発明において使用される細胞アッセイプレートは、細胞プレート本体とカバーとから構成される。細胞プレート本体には、規則的に並んだ培養ウェル、及び全てのウェルの位置を示す記号が存在する。カバーのウェルに向かう側面には、各ウェルに対応するシーリングパッド (sealing pads) が存在する。それは、以下のような構造を特徴とする。培養ウェルの直径は3 ~ 6 mmであり、培養ウェルの深さは5 ~ 15 mmである。各ウェルの周縁には突出した縁が備わっている。ウェルの底は平坦で、斜めにウェルの周壁と接続されている。カバーの内部側壁の下方部分と細胞プレート本体の対応する側壁との間には、二重はさみメカニズムが備わっている。このクラミングメカニズムは、横方向のノッチ及びフランジを含む構造である。カバーを細胞プレート本体の上に押し付け、カバーの2側面上のフランジをそれぞれ第一ノッチにはめた時、カバー上のシーリングパッドは、培養ウェルを完全には密封しない。カバーを下向きにさらに押し付け、フランジを第二ノッチにはめた場合、シーリングパッドは、培養ウェルを完全に密封する。

#### 【0021】

前記説明より明らかなように、本発明における検出手段の大部分は、免疫学における従来の実験法であるが、本発明は、プレ感作理論を利用して、臓器移植後のレシピエント体内の拒絶反応を検出するための道具として、標準細胞株アッセイプレートを使用することを初めて開示する。既知の混合リンパ球反応とは異なり、本発明は、レシピエントのプレ感作されたリンパ球を活用する。従って、刺激反応が回収反応となり、それが反応時間を大きく減少させる。既知のプレ感作リンパ球タイピングテストは、ドナー又はレシピエントの細胞がある抗原を含有しているか否かをテストするため、in vitroで調製されたプレ感作されたリンパ球を使用する。しかし、本発明は、レシピエント体内の免疫状況を決定するため、レシピエントのリンパ球をプレ感作された反応細胞として使用し、標準細胞株を誘発細胞として使用する。一見、それらは類似しているが、両方法における使用される道具、物質、及び目的は極めて異なっている。既知のリンパ球キラーテストとは異なり、本発明は、標準細胞株を標的細胞として使用し、ドナーが標的細胞源を提供することを必要とせず、それにより、調製における問題を減少させ

る。本発明は、従来の混合リンパ球反応及びプレ感作細胞タイピングテストを活用し、検出を達成するために要する時間はより短い。本発明は、従来の方法の3日から、30時間未満へと、検出に必要な時間を減少させうる。本発明により結果を得るための最短時間は、わずか4～5時間以内である。さらに、本発明においては、ドナーが標的細胞又は誘発細胞を提供する必要がない。従って、ドナーの生死も、標的細胞又は誘発細胞の起源も、考慮する必要がない。さらに、ドナーの抗原の型に関するデータが入手可能でなくても、検出には問題ない。また、本発明は、標準細胞アッセイプレートの新規な適用領域を開拓し、臓器移植後のレシピエント体内の免疫状況を動的にモニタリングするための手段を提供する。従って、本発明に基づき、臨床医は、症状及び徴候が出現する前に、拒絶反応の発生を予測することができる。また、本発明は、レシピエントに投与される臨床免疫抑制薬の投与量を調整するための基礎を提供し、臓器移植の成功率を大きく増加させる。既知のテスト法と比較して、本発明は、検出が無痛である、時間が比較的短い、コストが比較的低い、特異的が比較的高い、信頼性が比較的高い、という利点も保有している。

#### 【0022】

以下、図面と合わせて、細胞培養決定プレートの実施態様及び技術的效果を説明する。

#### 【0023】

図3を参照すると、それは、本発明の細胞（培養）アッセイプレートの実施態様である。細胞アッセイプレート本体は、一工程形成により、透明ガラス、有機ガラス、又はプラスチックから作成されていてもよく、カバーは有機ガラス又はプラスチックから作成されていてもよい。カバーと、シーリングパッドと、フランジ（又はノッチ）とは、一工程形成により作成されてもよいし、又はゴム製のシーリングパッド及びフランジを上に着せさせてもよい。培養ウェルは、規則的に整列していた。培養ウェルの容積は、実際のアッセイ例によって変化するが、0.05～0.5mlの範囲であるべきである。異なる容積を有するプレートを作製してもよい。培養ウェルの底は平坦であり、細胞が拡散することができ、洗浄が便利ないように、底の縁の角を排除するため、斜めに周壁と接続されている。プ

レート表面の液体が、ウェルへと流入するのを防止し、カバーを強く適用した後、より密封されるよう、各ウェルの周縁には突出した縁が備わっている（図中には示されていない）。それは、一工程形成において細胞プレート本体と共に作成されうる。カバーの内部側壁の下方部分に対応するプレート本体の両側壁には、横方向に2個のノッチを備えた。ノッチは、カバーの内部側壁の下方部分にある横方向フランジとマッチする。カバーを下方に押し付けたとき、フランジはプレート本体の第一ノッチにはまることのできる。この時点では、細胞培養を実施する時、換気が可能であるよう、シーリングパッドと培養ウェルとの間には間隙が存在する。カバーをさらに下方に押し付けると、フランジが第二ノッチにはまり、この時点で、シーリングパッドは培養ウェルを完全に密封することができる。フランジがプレート本体に備わっており、両ノッチがカバーの下側の内部側壁に位置している場合、その使用はより便利になるであろうことが、想像されうる。本発明において設計された細胞アッセイプレートは、その適用をより便利にする。

#### 【0024】

前記の様々な検出法から教示されるように、本発明は、同一の免疫学の原理により、異なる段階の異なる反応物質のための異なる検出手段を用いて、臓器移植後のレシピエント体内の免疫状況をモニタリングするための異なるアッセイ法を含む。特に、本発明の方法においては、標準細胞株を標的細胞（誘発細胞）として使用し、レシピエントのリンパ球をプレ感作されたエフェクター細胞（反応細胞）として使用する。細胞アッセイプレート上の標準細胞株は、拒絶反応を引き起こしうる、ほぼ全ての既知のHLA抗原を含有しており、そしてレシピエント体内に拒絶反応の発生が存在する場合には、レシピエントのリンパ球は、プレ感作された記憶細胞へと変化するであろう。従って、リンパ球は、*in vitro*アッセイにおいてドナー抗原を含有している標準細胞株と遭遇した時、刺激された直後に、想起反応を示すであろう。一方で、多数のリンパ球がリンパ芽球へと変化し、増殖するであろう（これは、形態学的観察、DNA標識、又はMTTアッセイのような方法により細胞増殖を決定することにより確認されうる）。他方、標的細胞としての標準細胞株は、リンパ芽球により攻撃され損傷を受けるであろう（

これは、デヒドロゲナーゼ放出テスト、又は過程中にMTTで処理された標準細胞株に対するMTTアッセイのような方法により確認されうる)。これが、本発明の原理的なプロトコールである。本発明の様々な検出法の過程を、以下、実施例により詳細に例示する。

#### 【0025】

以下の実施例において、材料を節約するため、いくつかの実施例において廃棄された材料を他の実施例において再利用した。この再使用が実際の臨床テストにおいて必要であることが判明しない限り、再使用及びそのために必要な処理は、これらの決定法の必要工程と見なされるべきではない。

#### 【0026】

##### 実施例

##### 実施例1：標準細胞株アッセイプレートの調製：

Lamda Co. により作製された標準細胞株アッセイプレートは、様々なHLA抗原を含有しているが、培養ウェルが小さすぎ、細胞数が比較的少ないため、それらを本発明において直接使用することはできない。本発明に従い設計された細胞アッセイプレート(64穴、直径：5mm、深さ：15mm)、及び商業的に入手可能なLamda Co. により作製された60種類の標準細胞株を、この調製法に従い標準細胞株アッセイプレート内に調製した。各ウェルには40,000個の細胞が存在する(本発明は、各ウェルが20,000~200,000個の細胞を含有することを可能にする)。残りの4ウェルには、実施例4の最大放出対照群として標準細胞のみを添加した。

#### 【0027】

##### 実施例2：反応細胞の形態学的観察：

臓器移植後、Tリンパ球をレシピエントの末梢血から分離し、次いで20%ヒトAB血清を含有しているRPMI 1640培養培地(又はDMEM培養培地)を使用して、1ミリリットル当たり100万個の細胞懸濁液へと調製した。次いで、実施例1において調製された細胞アッセイプレートの各ウェルに、細胞懸濁液0.1mlを添加した(標的細胞-エフェクター細胞比は1:2.5である)。細胞アッセイプレートを5%CO<sub>2</sub>を含むCO<sub>2</sub>インキュベーターに置き、36~

38 で2～28時間培養した。この期間、ランダムな時点において、顕微鏡を使用して、細胞形質転換が存在するか否かを観察した。細胞形質転換の形態学的特徴を、図1に示した。必要であれば、Guanxin Shen等により編集されたExperimental Technologies in Modern Immunology (Hubei Science and Technology Press, China, 1998年10月)により開示されたようにして、細胞計数を実施することもできる。

#### 【0028】

##### 実施例3：標識された細胞の形態学的観察

臓器移植後、Tリンパ球をレシピエントの末梢血から分離し、次いで0.2mmolの蛍光標識TTPを含有している無血清培養培地を使用して、1ミリリットル当たり400,000個の細胞懸濁液へと調製した。次いで、実施例1において調製された細胞アッセイプレートの各ウェルに、細胞懸濁液0.1mlを添加した(標的細胞-エフェクター細胞比は1:1である)。細胞アッセイプレートを5%CO<sub>2</sub>を含むCO<sub>2</sub>インキュベーターに置き、37で10～28時間培養した。この期間、蛍光顕微鏡を使用して、細胞核内に蛍光が存在するか否かを観察した。今日、様々な標識及び標識法が存在するが、本発明は、フェリチン標識及びコロイド金標識(核を黒色にすることができる)、フルオレセイン標識、及び発光材料標識(核を発光性にすることができる)のような、直接的な形態学的観察により得られる標識シグナルのみを必要とする。

#### 【0029】

##### 実施例4：標的細胞からのデヒドロゲナーゼ放出の検出

実施例2において2時間インキュベートされた細胞アッセイプレートを使用して、1%NP-40(非イオン性界面活性剤)溶液0.1mlを、標準細胞のみを含む4個の対照ウェルに添加した。次いで、細胞プレートをさらに2時間インキュベートし、取り出した。各ウェル内の上清0.1mlを採取し、もう一つの空のアッセイプレート(細胞株なし)のそれぞれ対応する培養ウェルへ置いた。新たに調製された基質溶液0.1mlを、各ウェルに添加し、暗所で室温で15分間反応させた。次いで、クエン酸停止溶液(1mol/L)30μlを添加して、反応を停止させた。各ウェルの吸光度を、570nmの波長で、ELISAリーダー(East

ern China Electron Tube Factoryの製品)を用いて読み取った。ドナー抗原を含まないウェルの平均吸光度を、自然放出対照群の吸光度として選択し、前記の方法に従い計算を実施した。本発明は、1個のデヒドロゲナーゼ(乳酸デヒドロゲナーゼ、又はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ)の放出のみならず、その反応基質が基質溶液中に含まれているのであれば、様々な種類のデヒドロゲナーゼの放出を決定するために使用されうる。これらの反応基質は、乳酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、又はグルタミン酸ナトリウム、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、1種又は複数種の基質でありうる。本実施例は、LDH基質溶液(乳酸ナトリウムを含有)を利用し、基質溶液の調製及び酵素反応の手順は、Experimental Technologies in Modern Immunologyなる書籍の311頁に見出されるようにして実施した。

#### 【0030】

##### 実施例5：細胞形質転換のMTTによる決定

実施例4において上清を除去した後の先の細胞プレートを使用して(最大放出対照群の4ウェルは除く)、培養培地0.1mlを各ウェルに添加し、次いでプレートをインキュベーターに置き、6時間培養を続行した。次いで、プレートを取り出し、MTTのPBS溶液10 $\mu$ lを各ウェルに添加し(濃度は5mg/ml)、プレートを再びインキュベーターに置き、4時間培養した。各ウェルから上清を吸引し、その吸光度を、480nmの波長で、ELISAリーダーを使用して読み取った。

#### 【0031】

##### 実施例6：細胞形質転換のMTTによる決定

実施例5において上清を除去した後の先の細胞プレートを使用して、各ウェルの残存している上清を完全に除去した。DMSO 0.2mlを各ウェルに添加した。プレートを5分間振とうした。次いで、各ウェル内の上清の吸光度を、490nmの波長で、ELISAリーダーを使用して読み取った。本方法においては、630nmにも吸収ピークが存在する。従って、この波長においても、又は両方の波長において吸光度を読み取ってもよい。具体的な計算法及び判断は、「MTT比色分析の改良及び予備適用(the Improvement of MTT Colorimetric Analysis

and the Preliminary Applications)」、Shanghai Journal of Immunology、No. 5、1996の論文に従い実施した。

【0032】

実施例7：MTTから還元されたホルマザンを含有している標準細胞を用いた細胞アッセイプレートの調製

標準細胞株の培養の達成直前に、各細胞培養培地に0.25mg/mlの最終濃度でMTTを添加した。培養を4時間続行した。最初の方法に従い、アッセイプレートを調製した。得られた細胞アッセイプレートにおいて、各細胞は等量のホルマザンを含有している。この細胞プレートは、標準細胞プレートをMTTで処理することによっても得られる。本実施例におけるMTTによる標準細胞株の処理の手順及びMTTアッセイの手順は、Experimental Technologies in Modern Immunologyなる書籍に従い実施した。

【0033】

実施例8：標的細胞のMTTアッセイ：

実施例7において調製された細胞アッセイプレートを使用して、実施例2において調製されたレシピエントのリンパ球懸濁液0.1mlを各ウェルに添加した（標的細胞-エフェクター細胞比は1:2.5である）。アッセイプレートをインキュベーターに置き、4時間培養した。次いで、アッセイプレートを取り出し、過酸化水素溶液（濃度：1%）20μlを全てのウェルに添加した。次いで、アッセイプレートをインキュベーターに戻し入れ、さらに2時間培養し、次いで再び取り出した。各ウェル内の上清の吸光度を、480nmの波長で、ELISAリーダーを使用して読み取った。ホルマザン結晶をMTTへと酸化することができ、正常細胞には何ら影響を与えない無色の薬剤を、本実施例における酸化剤として選択した。効果を達成するために十分であり、全てのウェルの中の量が等しいのであれば、酸化剤の添加量及びその濃度に関して、厳密な要件は存在しない。

【0034】

実施例9：標的細胞のMTTアッセイ：

実施例8において上清を除去した後の先の細胞プレートを使用して、各ウェルの残存している上清を完全に除去した。DMSO 150μlを各ウェルに添加

した。プレートを10分間振とうした。次いで、各ウェル内の上清の吸光度を、630nmの波長で、ELISAリーダーを使用して読み取った。アッセイプレートの読み取りの方法、及び計算は、実施例6と同様であった。

#### 【0035】

実施例10：標的細胞のMTTアッセイ：

実施例7において調製された細胞アッセイプレートを使用して、実施例2において調製されたリンパ球懸濁液0.1mlを各ウェルに添加した（標的細胞 - エフェクター細胞比は1：3である）。アッセイプレートをインキュベーターに置き、8時間培養した。次いで、アッセイプレートを取り出し、エタノール0.1mlを全てのウェルに添加した。次いで、アッセイプレートを5分間振とうした。各ウェル内の上清の吸光度を、570nmの波長で、ELISAリーダーを使用して読み取った。アッセイプレートの読み取りの方法、及び計算は、実施例6と同様であった。エタノールの代わりに使用されうる有機溶媒は、既に記載した。

#### 【0036】

実施例11：寛容のアッセイ：

実施例2、3、4、5、6、8、9、及び10における細胞アッセイプレートの中の試薬を洗浄除去した（細胞は保持）。培養培地0.2mlを補足した。次いで、細胞アッセイプレートをインキュベーターに置き、3～5日間培養し、その時点で、細胞アッセイプレートを取り出し、各ウェルにMTT溶液（5mg/ml）20μlを添加し、培養を2～6日間続行した。上清を除去した。DMSO 0.2mlを全てのウェルに添加した。各ウェル内の上清の吸光度を、490nm又は630nmの波長で、それぞれ読み取った。ドナー抗原を含有しているウェルの吸光度が、ドナー抗原を含まないウェルの吸光度よりも有意に低い場合、それは、レシピエントがドナーの臓器に対する寛容を既に発達させたことを示している。従って、レシピエントに投与される免疫抑制薬は、本発明の方法による定期的なモニタリングの下で、投与量を減少させるか、又は停止することができる。ドナー抗原を含有しているウェルの吸光度が、ドナー抗原を含まないウェルの吸光度よりも有意に高い場合、それは、急性拒絶反応（前記の30時間以内のアッセイ結果と一致している場合）又は慢性拒絶反応（前記の30時間以内のア

ッセイ結果と一致していない場合)が存在することを示している。

【0037】

多数の実験より、本発明の発明者らは、本発明の様々なアッセイ法において、細胞培養の時間の長さが、リンパ球の感作の程度と関係していると考えられる。細胞が高度に感作されている場合(急性拒絶反応)、短時間の培養がアッセイにおける応答をもたらす。しかしながら、細胞が不十分に感作されている場合には(拒絶反応の初期段階)、より長時間の培養がアッセイにおいて必要となる。実際の検出において、これは、臨床経験に基づき調整される。本発明の方法により得られたデータは、レシピエント体内に拒絶が存在するか否か、そしてそれがどの程度重篤であるかを決定するために使用されるが、直接的に拒絶反応を定量するためには使用され得ない。拒絶反応の程度は、レシピエントの全てのアッセイ結果の分析及び技師の経験により定量される。本発明の実際の臨床的適用において、経験がない場合には、技師は、アッセイ結果を比較し確認することができるように、2つのアッセイ法を平行に使用した方がよい。即ち、技師は、本発明からの2つの異なる方法(1つはエフェクター細胞のアッセイ、もう一つは標的細胞のアッセイ)を選択し、同時にアッセイすることができる。豊富な経験が蓄積された後は、1つの方法で十分である。

【0038】

本発明の特異性は、単一の標準細胞アッセイプレートが、レシピエント由来のCD8<sup>+</sup>Tリンパ球及びNK細胞のドナー細胞に対する特異的キラー活性を決定しうるのみならず、ドナー抗原の刺激下でのレシピエント由来CD4<sup>+</sup>Tリンパ球の特異的な形質転換及び増殖能をも決定しうるという事実にある。本アッセイ法においては、ドナー抗原を含有している多数のウェルが、相互に比較される対象として相互に使用されるのみならず、CD8<sup>+</sup>亜群の特異的キラー活性及びCD4<sup>+</sup>亜群の特異的増殖能が、両実験法間の対照として使用される。これらは、本発明の方法の特異性及び感度を高くするのみならず、拒絶反応のモニタリングのための信頼性も高くする。

【0039】

本発明は、同種異系臓器移植後の免疫状況をモニタリングするために使用され

るのみならず、様々な動物抗原を含有する標準細胞株が入手可能であるならば、異種臓器移植後の免疫状況をモニタリングするためにも使用されうる。

#### 【0040】

本発明において記載されたような標準細胞株を調製する方法は、多く存在する。以下の方法が、遺伝子工学技術と共に使用されうる。Bリンパ球株のような細胞株を、修飾の対象として選択した。その染色体上のHLA遺伝子断片を、遺伝子ノックアウトの方法により除去した。次いで、ただ1種のI型又はII型のHLA抗原を発現している標準細胞株が発生しうるよう、相同遺伝子組み換え理論により、ある型のHLA抗原の遺伝子を細胞へトランスフェクトした。

#### 【0041】

遺伝子工学技術を利用して標準細胞株を調製するための具体的な方法は、以下の通りである。ヒトBリンパ球を修飾の対象として選択することができる。ヒトHLA遺伝子のヌクレオチド配列を、GenBankより見出し、HLA遺伝子の2つの末端のそれぞれ2つの2～4kb DNA断片が、相同組み換え領域として増幅されるよう、プライマーを設計した。得られたHLA遺伝子上流及び下流の断片を、使用するため精製した(Cell, 1991, 66:1051-1066; Science, 1982, 256:1392-1394)。(ネオマイシン耐性遺伝子(neo)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(HYP)、ピューロマイシン耐性遺伝子、Zeocin等のような)抗生物質スクリーニングマーカー遺伝子を含む、真核細胞のDNA発現ベクター(例えばLiving Color(登録商標)フルオレセインタンパク質レポーターシステム(Fluorescein Protein Reporting System)、SV40ベクター等のような、いわゆる真核生物発現ベクター)を、従来の遺伝子工学手法を使用してHLA遺伝子ノックアウトベクターを構築するために選択した。即ち、上流断片と下流断片との間に位置するマーカー遺伝子からなるタンDEM構造を、選択された真核生物発現ベクターに挿入した。次いで、確立された遺伝子ノックアウトベクターを、従来の分子生物学的手法により繁殖させた。

#### 【0042】

従来の方法による抽出の後、細胞培養のため、電気穿孔又はその他の分子生物学的方法により、精製された遺伝子ノックアウトベクターを選択されたB細胞株

へとトランスフェクトした。同時に、選択された耐性遺伝子に対応する抗生物質を、耐性遺伝子を含む（耐性遺伝子を含む、とは、標的遺伝子が細胞株にトランスフェクトされていることを示す）細胞株をスクリーニングするため、添加した。次いで、スクリーニングされた細胞クローンからゲノムDNAを抽出し、HLA遺伝子に特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により同定した。相同染色体内の両方のHLA対立遺伝子が交換されている細胞株を、将来的な使用のため、ヒトHLAを発現しないブランク細胞株として選択した（この細胞株は、HLA抗原遺伝子を含有していない、即ち、正常なヒトHLA遺伝子がこの細胞株からはロックアウトされている）。次いで、ほぼ全てのHLA抗原のcDNA又はゲノムDNAを、それぞれ逆転写又はヒトゲノムライブラリーからのスクリーニングにより調製した。次いで、それらを前記の発現ベクターへと導入した（耐性遺伝子の切り替え）。次いで、前記方法に従い、それぞれ異なるHLA抗原遺伝子を保持している発現ベクターを、HLA遺伝子がロックアウトされている前記のブランク細胞に導入した（1遺伝子、1細胞株）。即ち、様々なHLA抗原をそれぞれ発現している細胞株、即ち標準細胞株が得られた。次いで、様々なHLA抗原をそれぞれ発現している標準細胞株の系を樹立した。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

リンパ球形質転換の形態学的特徴を示す概略図である。「1」は、形質転換が起こっていないリンパ球の形態学的特徴を示し；「2」は、形質転換の遷移状態にあるリンパ球の形態学的特徴を示し；「3」は、リンパ芽球の形態学的特徴を示す。

##### 【図2】

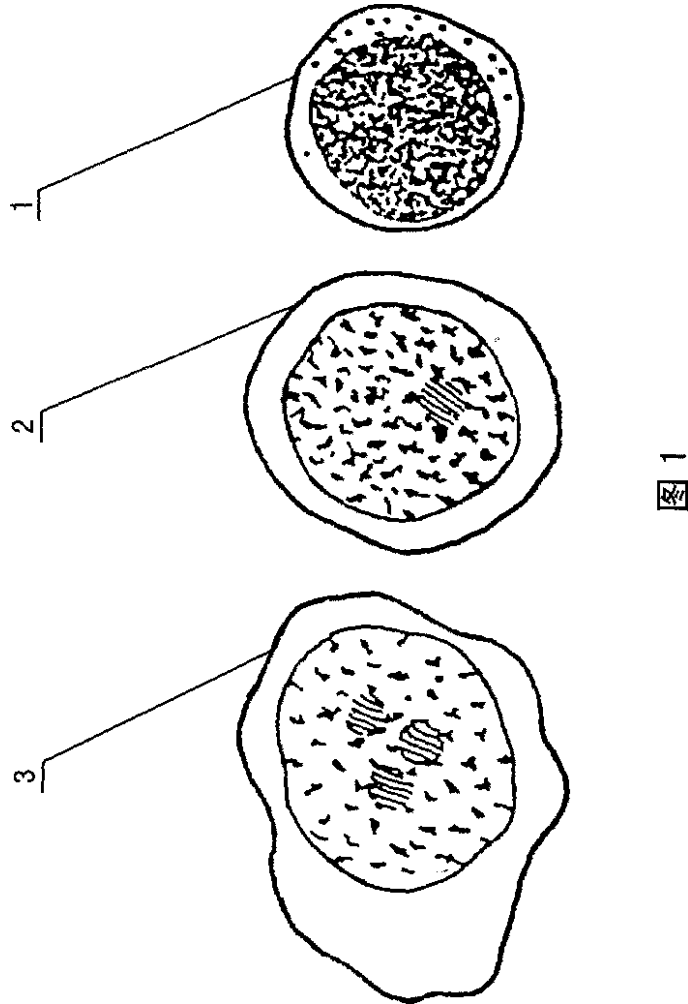
細胞アッセイプレート（カバーなし）の正面図である。

##### 【図3】

細胞アッセイプレート（カバーあり）の断面図である。図3中、「4」は、細胞アッセイプレート本体であり、「5」は培養ウェルであり、「6」は培養ウェルの位置を示すための記号であり、「7」は細胞アッセイプレートのカバーであり、「8」はフランジであり、「9」はシーリングパッドであり、「10」はノ

ツチである。

【図1】



【図2】

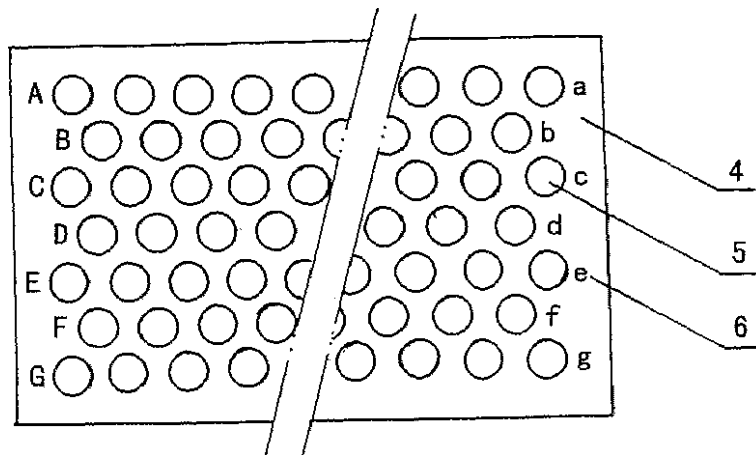


图 2

【图3】

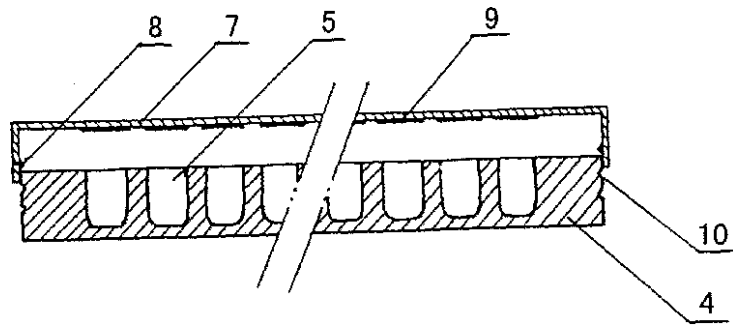


图3

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN01/00064
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC <sup>7</sup> G01N33/53, C12N1/00 According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols) IPC <sup>7</sup> G01N, C12N, A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, CNPAT		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	WO9532426(SANGSTAT MEDICAL CORPORATION[US/US]) 30 November 1995 See claims 1-13.	1-13
A	WO9738310(THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK[US/US]) 16 October 1997	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document 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 22 June 2001(22.06.01)		Date of mailing of the international search report 19 JUL 2001 (19 07. 01)
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer CHANG, mao Telephone No. 86-10-62093906

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN01/00064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO9532426	1995-11-30	CA2188807	1995-11-30
		US5482841	1996-01-09
		EP0763203	1997-03-19
		JP10501063	1998-01-27
WO9738310	1997-10-16	AU2439297	1997-10-29

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
G 0 1 N	33/48	G 0 1 N	33/48	P
	33/50		33/50	K
// C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00	A
	15/09		5/00	B

(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, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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) 2G045 AA02 BB24 CA17 FA16 FB01  
 FB07 FB12 GC10  
 2G054 AA07 AA08 EA03 EA04 GB10  
 4B024 AA15 CA03 CA04 DA02  
 4B063 QA05 QQ03 QQ08 QR04 QR80  
 QS28 QX01 QX10  
 4B065 AA94 AB01 BA02 CA46

专利名称(译)	确定血液淋巴细胞对特定抗原的反应性的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525452A</a>	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2001563900	申请日	2001-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	胡军		
申请(专利权)人(译)	胡军		
[标]发明人	胡军HU JUN		
发明人	胡军(HU,JUN)		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/32 G01N21/78 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N33/56972		
FI分类号	G01N33/53.K C12Q1/02 C12Q1/32 G01N21/78.C G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/50.K C12N15/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/BB24 2G045/CA17 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC10 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/GB10 4B024/AA15 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/DA02 4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR04 4B063/QR80 4B063/QS28 4B063/QX01 4B063/QX10 4B065/AA94 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA46		
优先权	00113747.6 2000-03-01 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血淋巴细胞对特定抗原的反应性的方法。首先，在体外用目标淋巴细胞富集含有已知HLA的标准细胞2至28小时，然后通过免疫学方法评估淋巴细胞的反应性。本发明提供了一种用于动态监测移植后受体的免疫状态的方法，并提供了用于调整给予受试者的免疫抑制药物剂量的临床数据。因此，它可以改善对移植可接受性的评估。

