

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4428628号
(P4428628)

(45) 発行日 平成22年3月10日 (2010. 3. 10)

(24) 登録日 平成21年12月25日 (2009. 12. 25)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/96 (2006. 01)	GO 1 N 33/96
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 K
GO 1 N 33/80 (2006. 01)	GO 1 N 33/80

請求項の数 13 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2003-536757 (P2003-536757)	(73) 特許権者	504152694
(86) (22) 出願日	平成14年10月16日 (2002. 10. 16)		コード バイオテック リミテッド
(65) 公表番号	特表2005-505779 (P2005-505779A)		ニュージーランド オークランド オーク
(43) 公表日	平成17年2月24日 (2005. 2. 24)		ランド ユニヴァーシティ オブ テク
(86) 国際出願番号	PCT/NZ2002/000214		ノロジー スコット ラボラトリー ビル
(87) 国際公開番号	W02003/034074		ディング マウント ストリート 19
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003. 4. 24)	(74) 代理人	100082005
審査請求日	平成17年10月14日 (2005. 10. 14)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	514849	(74) 代理人	100084009
(32) 優先日	平成13年10月16日 (2001. 10. 16)		弁理士 小川 信夫
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)	(74) 代理人	100084663
(31) 優先権主張番号	516901		弁理士 箱田 篤
(32) 優先日	平成14年1月29日 (2002. 1. 29)	(74) 代理人	100093300
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)		弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾細胞から製造される血清学用の感受性対照

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液型決定に使用される血液型試験試薬又は血液型検査システム用の感受性対照として使用するための形質転換細胞懸濁液であって、以下の工程、

既知濃度の血液型関連糖脂質溶液を、細胞の懸濁液と、該細胞の細胞膜中に前記血液型関連糖脂質を直接挿入するのに十分な時間と温度で接触させて形質転換細胞を得る工程と

、前記形質転換細胞を洗浄溶液で洗浄して、洗浄形質転換細胞を得る工程と、

前記洗浄形質転換細胞を予め決定した濃度で懸濁して、この懸濁液を感受性対照として使用できるようにする工程と

を含む方法により製造される形質転換細胞懸濁液。

【請求項 2】

前記細胞が、動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は人工細胞膜を有する細胞若しくはベシクルである、請求項 1 に記載の形質転換細胞懸濁液。

【請求項 3】

前記動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 2 に記載の形質転換細胞懸濁液。

【請求項 4】

前記ヒト細胞が、赤血球である、請求項 3 に記載の形質転換細胞懸濁液。

【請求項 5】

前記赤血球が、O型細胞である、請求項 4 に記載の形質転換細胞懸濁液。

【請求項 6】

前記血液型関連糖脂質が、A、B、H、ルイス（Le^a又はLe^b）又はGal（α）スフィンゴ糖脂質である、請求項 1 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

血液型決定に使用される血液型試験試薬又は血液型検査システム用の感受性対照として使用するための形質転換細胞懸濁液の製造方法であって、以下の工程、

既知濃度の血液型関連糖脂質溶液を、細胞の懸濁液と、該細胞の細胞膜中に前記血液型関連糖脂質を直接挿入するのに十分な時間と温度で接触させて形質転換細胞を得る工程と、

前記形質転換細胞を洗浄溶液で洗浄して、洗浄形質転換細胞を得る工程と、

前記洗浄形質転換細胞を予め決定した濃度で懸濁して、この懸濁液を感受性対照として使用できるようにする工程とを含む方法。

10

【請求項 8】

血液型決定に使用される血液型検査試薬又は検査システムの感受性の決定方法であって、以下の工程、

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の一定量の形質転換細胞懸濁液を、前記試薬又は検査システムと接触させて、前記形質転換細胞と、前記試薬又は検査システム中に含まれる抗体との間の抗原－抗体反応性を与える工程と、

この抗原－抗体反応性のレベルを評価する工程と、

前記試薬又は検査システムの感受性を決定する工程とを含む方法。

20

【請求項 9】

前記抗原－抗体反応性のレベルを直接凝集又は誘導凝集によって評価する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記凝集が、相乗作用により、又は抗グロブリン分子を用い、又は酵素を用いて誘導される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗原－抗体反応性のレベルの評価工程が、酵素標識、放射性標識、又は蛍光標識を使用することによる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞懸濁液の、血液型決定で使用する 1 種以上の血液型検査試薬又は検査システムの効率を測定するための使用。

30

【請求項 13】

血液型決定に使用される血液型試験試薬又は血液型検査システム用の感受性対照として使用するためのキットであって、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞懸濁液を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、血液型（又は血液型関連）抗原を発現し、免疫血液学／血液学／免疫学／血清学アッセイで感受性対照として有用な細胞を与える人工的に修飾した細胞の使用に関する。特に、本発明は、A 及び／又は B 抗原が挿入されている細胞から調製される輸血薬用の感受性対照に関する。

40

【背景技術】

【0002】

血液センターの重大な機能は、血液（又は他の産物）を得た個体の血液型を正確に決定するための血液検査である。血液型の知識は、輸血、臓器移植、及び新生児の溶血性疾患の治療を含む種々の療法で必須である。特に、輸血を与える前には、個体の血液型を決定しなければならない。血液型の不整合は、輸血をした個体の死につながる可能性のある悲惨な結果をもたらし得る。

50

【0003】

A B O血液型システムは、輸血血清学でヒト赤血球(RBCs)上の抗原が最も重要であることを表している。ヒトは、4つの主要型：A、B、A B、及びOの1つに属する。各型のRBCsは、それぞれA抗原、B抗原、AとBの両抗原を保有し、或いはどれも保有しない。天然の抗体は、該RBCsに存在しない血液型抗原に対して血液中に存在する。従って、A型の個体は抗-Bを有し、B型の個体は抗-Aを有し、O型の個体は抗-Aと抗-Bを有し、A B型の個体はどれも持たない。輸血前に交差試験を行い（供血者血液を受容者の血清に対して検査するか、或いは記録に対して電子的に血液を整合する）、ある型のRBCsに対する抗体を所有する個体に、該RBCsを与えないようにしなければならない。

【0004】

10

既知抗体を含有する試薬に対してRBCsを検査し（前検査法として知られる）、かつ既知抗原を有するRBCsに対して血清を検査する（逆検査法として知られる）。

1980年代以来、モノクロナール抗体(MAbs)が血液型決定試薬として使用されている。伝統的なポリクロナール抗血清に比し、モノクロナール試薬は特異性を高め、一貫した反応性を与え、かつ多くの場合、効力を高める。

【0005】

血液型決定システム（例えば、ゲルカード）及び試薬の日常品質管理はいかなる血液銀行検査室にも必須である。試薬及び血液型検査システムは、輸送、貯蔵時、又は貯蔵及び使用時の汚染の結果として特異性又は効力の低減を受け得る。

モノクロナール試薬は、A及びBの亜群を含むA B O血液型のすべての天然変種を同定するために必要である。正確な同定を確実にするため、血液銀行検査室内のモノクロナール血液型検査試薬及び血液型検査システムは、RBC試薬対照に対して検査する。この目的のためには、弱い抗原発現を有するRBCsが対照試薬として好ましい。これは、このようなRBCsは、弱い表現型の同定のため、抗血清の効力のより良い指標を与えることができるからである。

20

【0006】

弱い又は不十分にA B O亜群を発現する種々の天然型が存在する。各細胞表現型内のA/B抗原濃度は可変であり、一般に、広範な解析を行わない限り未知である。

対照試薬として弱い表現型のRBCsを使用することは、亜群表現型個体の非常に低い頻度のため実際には困難である。例えば、A x 表現型は、A型の0.003%と推定されており、他の亜群は、さらに低頻度である。従って、この目的のためには人工的な弱い表現型RBCsが有用だろう。

30

人工的なA型RBCs又はB型RBCs又はA B型RBCsに形質転換したO型RBCsは、血清学的に弱い表現型に似ているようである。これら抗原の発現は挿入抗原の濃度、及び／又はRBCの挿入用抗原に対する割合又は添加する合成抗原の量などのような挿入条件を変えることによって調節できる。挿入された抗原は、特定条件のRBC膜内で少なくとも6週間、おそらくそれ以上安定だろう。

【0007】

現在、炭水化物抗原を不十分に発現する細胞の検出に用いられるモノクロナール抗体（抗血清）の血清学的感受性は、以下のいくつかの方法の1つで決定できる。

40

1. 天然の弱い亜群に対する検査法。これは、希少な亜群を見つけ、この亜群を使用できるように調製してから対照として使用する工程を含む。
2. 正常細胞に対する検査法。これは、通常の細胞を検査する方法を含み、何らの感受性の指標をも与えない。
3. 抗血清を希釈して効力を決定する方法。これは、抗体を希釈する工程と、正常の抗原に対して検査する工程を含む。これは、真の対照が存在しない場合の最も一般的なプラクティスである。

【0008】

天然の細胞は、その頻度のため、供給を得、かつ維持することが非常に困難である。さらに、天然の細胞は個体間で異なる。非実用的でないとしても、一定供給は困難だろう。

50

さらに、異なる集団は、異なる頻度の弱い亜群を有する。

正常な細胞は、高レベル、例えば500,000コピー／赤血球より多い範囲の抗原を発現する。これら細胞を検査するときは、典型的は試薬を希釈し、低希釈でもRBCsと反応し、かつ血清学的にポジティブな結果を与え得ることを示す。この希釈感受性法は、時間がかかる。結果を外挿して普通の希釈での抗原の検出レベルを決定する。不運なことに、この欠点のある方法論が多くの場所のプラクティスである。規則的な時間消費希釈調査を行うか、或いは弱い亜群を検査する場合だけ、試薬の劣化の検出が可能だろう。

抗血清の希釈によってさらに問題が起こり得る。モノクロナール試薬は、しばしばビクロナールであり、特有の性能特性を与えるために調製される。いくつかのクローンは、A B O 亜群の検出で他のクローンより良いことは周知である。結果として、試薬はブレンドとして調製されることが多い。このような試薬の希釈は、それらの固有の性能特徴を打ち消し、ひいては試薬の真の性能を反映しないだろう。さらに、多くのモノクロナール試薬は、今や検査カードシステム（すなわちゲルカード）用に調製され、かつ検査カード内に前もって装填されるので希釈法によっては検査することができない。

【0009】

現在、多くの検査室は、日常的にはA B O 血液型検査薬の感受性管理を行っていない。代わりに、検査室は試薬の製造業者と歴史的な性能に依存している。これとは別に、検査室は、上述した3つの方法で一週間毎、或いは時には一ヶ月毎にバッチ検査をするだけである。さらに、多くは、弱い亜群の不適合な受容者への偶発的な輸血の文献結果に依存しており、これら事象は通常致命的でないことを示している。前もって交差試験（供血者の血液を受容者の血清にして検査すること）をすれば、弱い亜群の不適合型と、不適合な受容者への輸血の不適合性を検出するだろう。しかし、最近、多くのセンターでは交差試験は行わず、代わりに供血者と受容者の両者の正確な血液型決定に依存している。従って、今や血液型を正確に決めることがさらに重要である。いずれの試験も行わないという問題は、血液型決定試薬が劣化しているかもしれないことであり、かつ交差試験がない場合、臨床的に有意な亜群が正確な血液型に分類されないかもしれない。このような血液は、軽い乃至重い輸血反応を起こし得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、既知の所定量の抗原発現を有し、ひいては検査薬と検査システムを校正して正確かつ標準化された血液型の決定を与えるために使用できる感受性対照試薬が明らかに要望されている。

この発明の目的は、血液型決定用の感受性対照試薬を提供することであり、或いは、少なくとも有用な代替物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一局面では、血液型決定用の感受性対照の製造方法であって、以下の工程、

既知濃度の血液型関連糖脂質溶液を、細胞の懸濁液と、該細胞の細胞膜中に血液型関連糖脂質分子を挿入するのに十分な時間と温度で接触させて形質転換細胞を得る工程、又は

既知濃度のビオチン化血液型関連炭水化物溶液を、細胞膜中にリンカー分子を挿入して修飾した細胞の懸濁液と、前記リンカー分子にビオチン化血液型関連炭水化物分子が結合するのに十分な時間と温度で接触させて形質転換細胞を得る工程と、

前記形質転換細胞を洗浄溶液で洗浄し、この洗浄した形質転換細胞を、任意に1種以上の溶解塩を含んでもよい水中に懸濁させて形質転換細胞溶液を得る工程と、

前記形質転換細胞溶液の濃度を決定して、前記溶液を血液型決定用感受性対照として使用できるようにする工程とを含む方法が提供される。

【0012】

本発明の別の実施形態では、懸濁液の細胞は修飾されず、かつ形質転換細胞は細胞膜中に直接挿入された血液型関連糖脂質分子を含む。

本発明の代替実施形態では、懸濁液の細胞はリンカー分子の挿入によって修飾され、かつ形質転換細胞はリンカー分子を介して細胞膜に結合している血液型関連炭水化物分子を含む。

使用する細胞は、動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は人工細胞膜を有する細胞若しくはベシクルを含むいずれの細胞型でもよい。しかし、使用する細胞は動物細胞であることが好ましい。さらに、動物細胞がヒト赤血球であることが好ましい。

【0013】

リンカー分子は、脂質尾部と、この脂質尾部を抗原に結合するブリッジとを含むことが好ましい。

リンカー分子は、好ましくはビオチン化糖脂質を含む。ブリッジの一例は、ビオチン-アビジンブリッジである。

好ましくは、血液型関連糖脂質は、A、B、H、ルイス(Lewis)又はGal(α)スフィンゴ糖脂質である。また、ビオチン化血液型関連炭水化物は、A、B、H、ルイス、又はGal(α)であることが好ましい。

【0014】

本発明の第2局面では、この発明の第1局面の方法で得られる形質転換細胞が提供される。

本発明の別の局面では、血液型検査薬又は検査システムの感受性の決定方法であって、以下の工程、

この発明の第1局面の方法で得られる一定量の感受性対照を、血液型検査薬又は検査システムと接触させて、前記形質転換細胞と、前記検査薬又は検査システム中に含まれる抗体又はレクチンとの間の抗原-抗体反応性を与える工程と、

この抗原-抗体反応性のレベルを評価する工程と、

前記血液型検査薬又は検査システムの感受性を決定する工程とを含む方法が提供される。

【0015】

抗原-抗体反応性のレベルの評価は、直接凝集を評価するか、又は誘導凝集によって評価することができる。誘導凝集は、相乗作用又は抗グロブリン分子の使用、又は酵素の使用による場合を包含する。

好ましくは、この評価は、酵素標識、放射性標識、又は蛍光標識を使用する。

本発明のさらなる局面では、本発明の第1局面の方法で得られる感受性対照の、血液型決定で使用する1種以上の試薬又は検査システムの効率を測定するための使用が提供される。

本発明の別の局面では、血液型決定の実施に好適な成分を含有するキットであって、この発明の第1局面の方法で得られる感受性対照を含むキットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

(詳細な説明)

以下の説明の多くはスフィンゴ糖脂質抗原に言及しているが、他の糖脂質及び合成抗原を含む他の抗原も本発明に包含されることを認識すべきである。また、用語“抗原”は、リンカー分子に結合させる結合分子を有する抗原のような修飾された抗原を包含することも認識すべきである。例えば、アビジン中に末端があるリンカー分子の場合、抗原はビオチン化抗原である。

リンカー分子は、細胞膜に抗原を結合することができる、細胞膜中に挿入されている脂質であってもよい。炭水化物部分は、典型的にはビオチン-アビジンブリッジのようなブリッジで脂質に結合されているだろう。しかし、キレート結合に基づくいずれかのブリッジのような他のブリッジも使用できる。

疑いを避けるため、この明細書で溶液に対するいずれの言及も細胞の懸濁液を包含する意図である。

【0017】

血液型抗原としての糖脂質は、RBCsによって血漿から採取することができる。この知識は、部分的にルイスシステムの研究に由来する。血漿脂質は、RBC膜中の脂質と交換し、かつRBC膜中のリン脂質と脂肪酸の組成は血漿内における組成と似ている。結果として、ルイス又はABH構造を保有する血漿スフィンゴ糖脂質がRBC膜中に取り込まれる。

挿入法は、糖脂質抗原は細胞を損傷させることなく赤血球膜中に挿入できるという確立された原理に基づく。挿入され／発現される抗原の量は調節できるので、特定の性能特性を有する細胞を創造することができる。これら細胞は、天然の弱い亜群又は非天然の(天然に存在しない)血液型発現細胞のどちらかに似ていることがある。

細胞上で発現される抗原の量は、使用者の要求に応じて設定することができる。例えば、赤血球当たり、5%、10%、20%、又は1000コピー、5000コピーなど、異なるレベルの発現が可能である。ある対照は、抗原の検出に失敗すると臨床的に重大な輸血反応をもたらし得る臨床的に許容限界で設定することができる。他の対照は、弱い亜群の検出の信頼性を確実にするレベルで設定することができる。これら対照は、測定可能な感受性レベルを生じさせることでA B O血液型決定検査の性能を確認することができる。これは、より安全なA B O型血液の供給を保証することができる。

【0018】

本発明の感受性対照は、ゲルカードを含む血液型検査薬及び／又は検査システムの感受性の決定に有用である。

輸血薬用の弱い亜群感受性対照は、特定量のA及び／又はB抗原を挿入して抗原検出アッセイで特定の反応評点を得ているO型細胞から製造される。このアッセイとしては、タイル、チューブ、ゲル、カード、及び微量プレート法が挙げられ、凝集を利用するいずれの手動又は自動プラットフォーム、又は他のいずれの抗原検出法(例えば、酵素結合免疫アッセイ、フローサイトメトリー等)をも包含する。

【0019】

本発明ではヒトRBCsを使用することが好ましいが、他の動物のRBCsを使用することができる。さらに、以下の説明は主にRBCsに言及しているが、血小板、白血球、植物細胞、細胞培養細胞、細菌細胞及び人工細胞膜のような他の細胞を使用し得ることを認識すべきである。

挿入抗原を発現する赤血球は、ヒト又は他の動物細胞を用いてインビボ又はインビトロのどちらかで創造できる。細胞のインビボ創造は、特定量の抗原をヒト又は他の動物の循環系中に注入してから即座に或いは経時的に血液を得る工程を要する。後者は、発現抗原の量を減少させる(効率的には天然タイター)。この方法を用いて、ある抗原は発現するが他は発現しない細胞を創造することができる。例えば、動物RBCsを用いて、ヒトKell、Duffy、Rhesus、又はKidd抗原に対して陰性であるA B O型決定RBCsを創造することができる。

【0020】

凝集は、抗原反応の1つの尺度である。凝集は、異なる細胞上で抗原を架橋する抗体又はレクチンによって生じる赤血球の凝集である。凝集は、手動で(目で)或いは自動化技術で血液型分析機器で可視化することができる。手動の凝集反応は、以下のスキームに従って評点をつけることができる。

【0021】

10

20

30

40

凝集評点	観 察
—	全く凝集塊なし
(+)	不確定
vw	非常に弱い反応性—光学の助けによってのみ目に見える
w又は+w	弱い—非常に非常に小さい凝集塊
+	非常に小さい凝集塊
++	いくつかの小さい凝集塊
+++	小さい凝集塊に取り囲まれた1つの大きい凝集塊
++++	単一の大きい凝集塊

10

【0022】

挿入のために使用するA型又はB型抗原溶液の濃度を高くするほど、O型RBCs中に挿入される抗原の量が増加する。これは、抗-A又は抗-B試薬で形質転換したRBCsのより強力な凝集によって分かる。A型又はB型抗原溶液の低い濃度は、O型RBCs中へのA又はB抗原の少ない挿入につながり、その結果、抗-A又は抗-B試薬との弱い凝集となる。挿入される抗原の量は糖脂質挿入溶液の濃度及び／又は接触の温度及び／又は時間に比例する。

RBCsは、短鎖又は長鎖糖脂質で形質転換させることができる。しかし、細胞型決定試薬に対して検査するときの一般的な血清学ではこれら2種の型の形質転換RBCs間には有意な差異はないようである。特定の抗血清に対して検査すると、両型で同様の凝集が観察される。しかし、RBCsは、ABO系の特定成分で形質転換し得る。例えば、A抗原（ALe^b又はA型3のような）の成分を発現するRBCsを創造することができる。このような細胞は、特定抗体の特異性の決定及びモノクローナル抗体パネルのスクリーニングで重要だろう。

20

【0023】

RBC濃度の糖脂質濃度に対する比の影響は、1：1～3：1の比がO型RBCsの効率的な形質転換及び抗-A又は抗-Bとの強力な凝集評点をもたらすことである。4：1以上の比は、抗原の挿入を減らすことになる。特定条件では、3：1が強力な血清学評点を与える最も経済的な比である。しかし、弱い表現型が望ましい場合は、RBCsのより高い比を使用し得る。

濃糖脂質溶液は、2時間以内に抗原をRBCs中に効率的に挿入することができる。より長いインキュベーション時間は、より良い挿入につながるが、持続（32時間）後には血清学が低下する（実施例5参照）。この低下は、抗原の損失ではなく、37℃での長期インキュベーション後にRBCsが低下するためと考えられる。

30

抗原分子を細胞膜中に挿入するのにかかる時間は、抗原溶液と細胞溶液の相対濃度と温度によって決まる。しかし、抗原溶液の濃度が約10mg/ml、充填される赤血球の比が25℃で3：1、挿入時間が約4時間であることが好ましい。

【0024】

挿入条件を変えるとRBCs上での抗原発現の調節を可能にし得る。弱いA又は弱いB細胞が望ましい場合、挿入のため低い糖脂質濃度と、高いRBC：糖脂質比を使用することができる。強力に凝集している表現型が必要ならば、高濃度の糖脂質溶液又は低いRBCs：糖脂質比が最強の血清学を与え得る。糖脂質濃度を操作することで、RBC膜中に普通に見られる抗原量の20倍を超えて発現するRBCsを“創造する”ことができる。

40

本発明の主要な利点は、抗原発現の量を調節して特定の感受性要求を満たせることである。例えば、ある細胞は臨床的に有意なレベルと相関する数の抗原を含む。従って、この細胞がポジティブな血清学的な結果を生じさせる場合、使用者は、確実にいかなる臨床的に有意な亜型も見失わないようにすることができる。

【0025】

別の細胞は、特定抗原閾値、例えば、異なる亜型のそれぞれについてある値を設定して、感受性の既知レベルを斟酌することができる。このような細胞を用いて、高感度マシンを校正することもでき、抗原定量曲線のフローサイトメトリー分析でさえ使用できる。

本方法論は、細胞を標準化し、かつ世界的に一貫したものとすることができる。これは

50

、異なる検査室及び異なる方法論の性能の比較を可能にするだろう。輸血の血清学的品質保証プログラムに細胞を含めることで、A B O血液型検査の品質管理の‘基準’を定めることができる。

【0026】

業界には感受性対照に対する切実な要望がある。病理学において一般的に輸血経験の少ない多熟練技術者を検査室に配置するように変化しているので、この重要さが拡大している。

この発明の感受性対照は、好ましくは1セットのA型（弱い）表現型とB型（弱い）表現型である。さらに、一方がRh DCce(R1r)であり、かつ他方がRh ce(rr)であることが好ましい。これにより、確実にA B OとR h D血液型決定試薬の両方を同一セットの細胞で品質管理することができる。さらに、弱いA B抗原の範囲の別セットは、さらに特殊な検査室で有用かもしれない。代わりに、特定のヒト抗原を欠いている動物細胞を使用することができる。例えば、いくつかの動物細胞は、R hヌル（すなわちR h抗原を欠いている）の同等物だろう。

【0027】

A B O及びR h D品質管理を効率的に行っている検査室もあるが、他の検査室はそうではない。社内A B O及びR h D品質管理細胞（A2B、R1r、O rr）を製造している検査室もある。しかし、これら製品は、供血者表現型の不均一性のためある程度の変異がある。この発明の感受性対照は、正確に抗原発現が弱められ、可変性が無く、かつ容易に入手できるので、この欠点を被らない。

本発明のさらなる利点は、抗原を含有する挿入流体は乾燥していてよく、かつ長期間劣化せずに貯蔵できることである。形質転換溶液の再構成とその細胞への添加によって、必要どおりに少量の特定した細胞、例えば獲得Bを創造することができる。現在、このような製品は存在しない。

【実施例1】

【0028】

以下の実施例は、本発明を単に説明することを意図している。本発明は、いずれの実施例によっても限定されるものとみなされない。

（実施例1）

糖脂質挿入溶液は、以下の方法で調製した。

- ・ 乾燥糖脂質をクロロホルム：メタノール（2：1）に溶かして20mg/mlの濃度にした。
- ・ この糖脂質溶液200 µlをガラス管に分け、窒素ガス下で乾燥させた。
- ・ 300 µlのメタノール：水（1：1）を加えて乾燥糖脂質を溶かした。水浴内で管を37℃に温めて溶解を助けた。
- ・ 管の100 µlレベルに印をつけ、糖脂質を該印の下まで窒素ガス下60℃で乾燥させた。この段階で溶液中のほとんどのメタノールが蒸発し、水に溶解した糖脂質が残る。
- ・ 10 µlの10×リン酸緩衝食塩水(PBS)を管に加え、塩濃度を調整した。
- ・ 100 µlレベルまで脱イオン水を加えた。

【0029】

（実施例2）

以下の方法で糖脂質をRBCs中に挿入した。

- ・ 5 µlの40mg/mlの糖脂質挿入溶液をガラス培養管に加えた。
- ・ 15 µlのCelpresolと、40 µlのO型充填RBCsを加えた。
- ・ 管を37℃で2時間絶え間なく振りながらインキュベートした。
- ・ 形質転換RBCsを6回0.9%食塩水で洗浄後、5%濃度でCelpresolに懸濁させた。

Celpresolは、RBC保存溶液（CSL Biosciences, Adelaide, Australiaから得られる）である。しかし、食塩水又は他の等張溶液、或いは細胞貯蔵溶液（例えば、CellStab）を使用し得る。

【0030】

（実施例3）

以下の実施例は、本発明の対照を用いて抗血清を検査するための一方法である。

1. 形質転換RBCsを3回0.9%食塩水で洗浄した。管にCelpresolを加えて5%濃度のRBC懸濁液を調製した。
2. RBC懸濁液(25 µL)を小さいガラス管に添加した。次に、抗血清(25 µL)を添加した。
3. RBC懸濁液と抗血清をよく混ぜ合わせ、イムノフュージ内で15秒間回転させた。
4. 凝集の量を読み取って記録した。

【0031】

(実施例4)

この発明の対照を用いて検査できる入手可能な血清学的表現型である抗体の例を以下に示す。この例のリストは網羅的ではなく、他の抗体をこの発明に適用することができる。検査されるこれら試薬のいくつかは、有効期限が切れており、例示目的のみで使用した。

抗-A:

名前	製造業者
Bio-Clone (ブレンド)	Ortho Diagnostic, USA
Biolab (ヒト) 1	Biological Laboratories, NZ
Biolab (ヒト) 2	Biological Laboratories, NZ
Biolab	Biological Laboratories, NZ
Epiclone 1	CSL, AUS
Epiclone 2	CSL, AUS
Epiclone 3	CSL, AUS
Epiclone 4	CSL, AUS
Gamma-clone 1	Gammma Biologicals, USA
Gammma-clone 2	Gammma Biologicals, USA
Immucor	Immucor, USA
Lorne	Lorne Laboratories, UK
MonoClone	Organon Teknika B.V. NL
NovaClone	Dominion Biologicals, Canada
Ortho	OCD, USA
Seraclone 1	Biotest AG, Dreieich
Seraclone 2	Biotest Diagnostic, Dreieich
*CSL	CSL, AUS
*XXX ₁	Confidential
*XXX ₂	Confidential

【0032】

抗-B:

名前	製造業者
Biolab (ヒト)	Biological Laboratory, NZ
Biolab	Biological Laboratory, NZ
BioClone (ブレンド)	Ortho Diagnostic, USA
Epiclone 1	CSL, AUS
Epiclone 2	CSL, AUS
Gammma-clone	Gammma Biologicals, USA
Immucor	Immucor, USA
Lorne	Lorne Laboratories, UK
MonoClone	Organon Teknika B.V. NL
NovaClone	Dominion Biologicals, Canada
Seraclone	Biotest AG, Dreieich
*CSL	CSL, AUS
*XXX ₃	Confidential

10

20

30

40

50

*XXX₄

Confidential

*XXX₅

Confidential

*開発試薬

【0033】

抗-A B:

名前

製造業者

Biolab (ヒト)

Biological Laboratory, NZ

Biolab

Biological Laboratory, NZ

Gamma (ブレンド)

Gamma Biologicals, USA

Immucor

Immucor, USA

Seraclone 1

Biotest Diagnostics, Dreieich

Seraclone 2

Biotest Diagnostics, Dreieich

【0034】

(実施例5)

糖脂質挿入のインキュベーション時間は、180 μ lの充填O型RBCsをそれぞれ60 μ lの9.6、4.8、2.4、1.2及び0.6mg/mlの長鎖A又は短鎖B糖脂質溶液に添加して調査した。1、2、4、8、24、48及び72時間糖脂質と共にインキュベーション後25 μ l分量を取った。この細胞について血清学検査を行った。結果を表1及び表2にまとめる。

【0035】

【表1】

表1. 挿入インキュベーション時間に関する研究: O型RBCsを天然のA糖脂質で形質転換させ、Bioclone 抗-Aに対して検査した。								
形質転換媒体の A糖脂質濃度	インキュベーション時間(時間)							
(mg/ml)	1	2	4	8	24	32	48	72
9.6	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4.8	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
2.4	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
1.2	-	+	+	+	++	+++	++	++
0.6	-	-	+	+	+	++	++	++

【0036】

10

20

30

40

【表 2】

表 2. 挿入インキュベーション時間に関する研究：O 型RBCsを天然の B 糖脂質で形質転換させ、XXX ₅ 抗-B に対して検査した。								
形質転換媒体の B 糖脂質濃度	インキュベーション時間(時間)							
(mg/ml)	1	2	4	8	24	32	48	72
9.6	+	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
4.8	+	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
2.4	-	+	+	+	++	+++	+++	+++
1.2	-	-	-	-	-	-	++	++
0.6	-	-	-	-	-	-	-	-

10

【0037】

(実施例 6)

異なる量の充填 O 型RBCsをそれぞれ一定量の 9.6mg/ml の長鎖 A 又は B 糖脂質溶液で形質転換させた。結果を表 3 にまとめる。3 : 1 比の RBCs : 血漿 (糖脂質挿入溶液) は、挿入に対して 1 : 1 比と同じくらい効率的のようだった。RBCs の量が 4 : 1、5 : 1、及び 6 : 1 に増加した場合、RBC 毎の挿入量が減少した。

【0038】

【表 3】

表 3. RBC の糖脂質挿入流体 (血漿) に対する比の研究：異なる量の O 型RBCsを A 又は B 型糖脂質で形質転換させ、抗-A 又は抗-B 試薬に対して検査した。		
RBC : 糖脂質	抗-A に対して反応した 挿入された A	抗-B に対して反応した 挿入された B
1 : 1	++++	++++
2 : 1	++++	++++
3 : 1	++++	++++
4 : 1	++	+++
5 : 1	++	++
6 : 1	++	++

20

30

抗-A : Bioclone ; 抗-B : CSL。

【0039】

(実施例 7)

多種多様な抗-A、抗-B 及び抗-A B 試薬を、この発明の方法を用いて天然の A 及び B 糖脂質で形質転換させた RBCs に対するその効力について検査した。RBCs は挿入の日に検査した。

天然の A 糖脂質を挿入した O 型RBCsを異なる製造業者の抗-A 試薬に対して検査した。結果を表 4 に示す。

40

【0040】

【表 4】

表 4. A 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs を異なる抗-A 試薬に対して検査した（評点パターンで分類した）。

製造業者	形質転換媒体の A 糖脂質濃度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
*XXX ₂	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	++
Bio-Clone	++++	+++	+++	+++	++	++	+	-
Seraclone	++++	+++	+++	++	+	+	w	-
*CSL	++++	+++	+++	++	++	+	-	-
Novaclone	+++	++	++	+	-	-	-	-
*XXX ₁	+++	++	++	+	+	-	-	-
Ortho	++	++	+	w	-	-	-	-
Epiclone 1	++	+	+	-	-	-	-	-
Epiclone 2	+	+	-	-	-	-	-	-
Lorne	+	w	w	-	-	-	-	-
Gamma-clone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Seraclone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Immucor	+	-	-	-	-	-	-	-
Epiclone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Biolab (ヒト) 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Monoclone	w	-	-	-	-	-	-	-
Biolab	-	-	-	-	-	-	-	-
Biolab (ヒト) 2	-	-	-	-	-	-	-	-

* 開発試薬

【0041】

異なる製造業者の試薬（その有効期限をかなり過ぎているものもある）は、凝集評点が大きく相異した。表 4（評点パターンで分類されている）から分かるように、A 型挿入糖脂質濃度が 9.6mg/ml の場合、数種の抗-A 試薬は形質転換 RBC との凝集評点 4+ 又は 3+ を与えたが、他の試薬はたった 1+ 又はネガティブ反応を与えた。0.6mg/ml 濃度では、XXX₂ 開発試薬だけが挿入されて抗原を検出できた。

天然 A 糖脂質で形質転換させた O 型 RBCs を異なる製造業者の抗-A B 試薬に対しても検査した。結果を表 5 に示す。抗-A B 試薬も形質転換 RBCs との異なる凝集評点を与えた。

【0042】

【表 5】

表 5. A 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs を異なる抗-A B 試薬で検査した。								
製造業者	形質転換媒体の A 糖脂質濃度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
イムカー (Immucor)	+++	++	++	+	+	-	-	-
ガンマクロン (Gamma-clone)	+++	++	++	+	+	-	-	-
セラクロン (Seraclone)	++	++	++	W	-	-	-	-
バイオラブ (Biolab)	++	++	++	W	-	-	-	-
バイオラブ (ヒト)	++	+	+	-	-	-	-	-
セラクロン (Seraclone)	++	+	+	-	-	-	-	-

10

【0 0 4 3】

B 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs を異なる製造業者の抗-B 試薬に対しても検査した。結果を表 6 に示す。

20

30

40

【表 6】

表 6. B 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs を異なる抗-B 試薬に対して検査した (評点パターンで分類した)。

製造業者	形質転換媒体の B 糖脂質濃度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
*CSL	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
*XXX ₅	++	++	++	+	+	-	-	-
*XXX ₃	++	++	++	+	-	-	-	-
バイオクロン (Bioclone)	+	+	w	-	-	-	-	-
バイオラブ (Biolab)	w	-	-	-	-	-	-	-
バイオラブ (ヒト)	-	-	-	-	-	-	-	-
エピクロン (Epiclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
エピクロン (Epiclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
*XXX ₄	-	-	-	-	-	-	-	-
ノバクロン (Novaclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
モノクロン (Monoclonal)	-	-	-	-	-	-	-	-
ガンマクロン (Gammaclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
セラクロン (Seraclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
イムカー (Immucor)	-	-	-	-	-	-	-	-
ローン (Lorne)	-	-	-	-	-	-	-	-

* 開発試薬

ほんの少しの抗-B だけが、挿入された B 型抗原を検出できた。検出できた試薬のうち、Bioclone だけが市販の抗-B 試薬である。他は開発試薬である。

【0044】

B 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs は、異なる製造業者の抗-A B に対しても検査した。結果を表 7 に示す。

10

20

30

40

【表 7】

表 7. B 型糖脂質形質転換 O 型 RBCs を異なる抗-A B 試薬で検査した。								
製造業者	形質転換媒体の B 糖脂質濃度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
バイオラブ (Biolab) (ヒト)	+++	++	++	+	+	-	-	-
バイオラブ	+	w	w	-	-	-	-	-
イムカー (Immucor)	-	-	-	-	-	-	-	-
セラクロン (Seraclone)	-	-	-	-	-	-	-	-
セラクロン	-	-	-	-	-	-	-	-
ガンマクロン (Gamma-clone)	-	-	-	-	-	-	-	-

Biolab の抗-A B だけが、挿入された B 型抗原を検出できた。これは、ヒトポリクローナル抗-A + B 試薬（もはや商業的には入手できない）である。

【0045】

（実施例 8）

Le^b 糖脂質を Le(b-) 血漿に懸濁させ、異なる割合で同型の RBCs と混合し、2 時間 37℃ でインキュベートすると、Le^b 糖脂質は RBCs 中に挿入し得る。結果を表 8 に示す。

【表 8】

表 8. Le ^b 糖脂質の Le(b-) 細胞上への取込み					
RBC	Le ^b : RBC (v/v)	抗血清 との反応 時間 0		抗血清 との反応 1 週間	
		-Le ^b	-Le ^a	-Le ^b	-Le ^a
挿入前の Le(a+b-)		-	++	-	++
挿入後	1:2	++	++	+++	++
	1:3	++	++	+++	++
	1:5	++++	++	+++	++
	1:7	++	++	+++	++
	1:10	++	++	+++	++
挿入前の Le(a-b-)		-	-	-	-
挿入後	1:2	+	-	++	-
	1:3	++	-	++	-
	1:5	+++	-	++++	-
	1:7	++	-	++	-
	1:10	++	-	++	-

【0046】

（実施例 9）

この実施例は、フローサイトメトリー分析で用いる手順を述べる。

フローサイトメトリー分析は、Lysis II ソフトウェアで操作する Fascot 計器 (Becton Dickinson, San Jose, CA) で行った。10% ホルマリン 20 部に対して 1 部の赤血球を添加し、室温で一晩中インキュベートすることで、洗浄ラット赤血球を固定させた。この固定細胞を 4 回 PBS 内で洗浄し、緩衝液 1 (リン酸緩衝 50mM NaCl、pH 8.0) 中の 0.5% BSA に希釈し

て最終濃度を 5×10^6 細胞/ml にし、ルイス抗体と共にインキュベーションを行った。用いた蛍光標識条件は、Murai ら (Clinica Chimica Acta, 1994, 226, 21-28) の研究に基づいた。分析のため、100 μ l の固定赤血球懸濁液を 4 $^{\circ}$ C で 1 時間 100 μ l の抗-Le^b (Gamma 25-1, Gamma Biologicals Inc., TX、バッファ 1 中 1 : 2 希釈) と共にインキュベートし、1 ml の緩衝液 1 で 2 回洗浄し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間 100 μ l のビオチン化抗-マウス IgM (E0465, Dako A/S, Denmark; 緩衝液 2、リン酸緩衝 200mM NaCl 中 0.5% BSA に 1 : 400 に希釈、pH 8) と共にインキュベートした。標識化細胞を 2 回 1 ml の緩衝液 2 で洗浄し、4 $^{\circ}$ C で 10 分間 100 μ l の RPE-ストレプトアビジン (R0438 Dako A/S、緩衝液 3、リン酸緩衝 200mM NaCl 中 1 : 15 に希釈、pH 7.0) と共にインキュベートし、1 回緩衝液 3 で洗浄してから 500 μ l の緩衝液 3 に懸濁させた。フローサイトメトリー分析は 1 時間以内であり、各試料について 5000 個の細胞を数えた。

10

【0047】

(実施例 10)

ラット末梢血細胞のインビボ形質転換は、以下の方法で達成した。

大きい (250~350 g) 近交系のすべてオスのルイスラットを用いた。これらラットは、その名前にかかわらず Le^a 又は Le^b 糖脂質を発現しない。

20% ダイズ油フラクション、1.2% のレシチン/卵白、及び 22% のグリセロール (w/v) を含有する非経口脂質注入流体である Emulsan (登録商標) 中に糖脂質を乳化させた。

0.03~2.0 mg/150 μ l の範囲の糖脂質濃度を有する一連の希釈物は、Emulsan (登録商標) 中の糖脂質の原液 (13.3 μ g/ μ l) から調製した。麻酔後 (用量 3.3 ml/kg の 8% 抱水クロラル)、ラットの頸静脈を外科的に露出させ、150 μ l の糖脂質/Emulsan (登録商標) 希釈物を注入した。そして手術部位を縫合した。

20

【0048】

24 時間、及びその後、熱灯下でラットを温め、止血帯を尾に施し、マイクロランセットで尾静脈に小さい穴を開けて血液を得ることによって、約 50 μ l の赤血球を得た。遠心分離で全血から赤血球を得、3 回洗浄した。他の細胞 (例えば、血小板、白血球) は、適切な単離技術で得ることができる。以下の実施例 A~C で述べるように、血清学及びフローサイトメトリー分析を行った。

【0049】

(実施例 A)

赤血球のインビボ形質転換の抗-Le^b による血清学分析。ラットに異なる用量の Le^b-6 糖脂質を静脈内注射した。表 9 に示される日に血液試料を採取した。抗-Le^b との血清学的な直接凝集をネガティブ (-) ~ 非常に強いポジティブ (++++) に分類した。

30

40

【0050】

【表 9】

表 9. 血液試料を採取(投与後)した日及び抗-Le^b血清学を行った赤血球

ラット	mg Le ^b	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
a	2.0	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	++	++	++
b	1.0	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	++	++	++
c	0.50	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	+
d	0.25	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
e	0.10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
f	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
g	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
h	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラット	mg Le ^b	22	24	26	28	30	32	34	35			
a	2.0	++	++	++	++	+	+	-	-			
b	1.0	++	++	++	+	-	-	-	-			
c	0.50	+	-	-	-	-	-	-	-			
d	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-			
e	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-			
f	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-			
g	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-			
h	0	-	-	-	-	-	-	-	-			

【0051】

(実施例 B)

インビボ糖脂質抗-Le^bフローサイトメトリー関係。異なるラットに異なる用量のLe^b糖脂質を注射し、1日後に採血した。結果を図1に示す。ポジティブ血清学のゾーンは1+--+4+で示される。形質転換に用いた最高量の糖脂質(2mg)は、黒で塗りつぶした曲線を生成した。この2mg曲線の左側に減少している塗りつぶしていない曲線は、糖脂質の量を減らした結果を表す。用いた糖脂質の用量は、2mg、1mg、0.5mg、0.25mg、0.13mg、0.06mg、0.03mg及び0mgだった。

【0052】

(実施例 C)

インビボ形質転換させたラット赤血球のフローサイトメトリー抗-Le^b分析。ラットに2mg用量のLe^b糖脂質を注射し、1、2、6、8、10、12、16、18、20、22、24、26、28日に採血した。最高レベルの形質転換は、黒く塗りつぶした曲線内で見られる。結果は、抗原発現の減少の逐次的順序であり、すなわち図2では右から左に1、2、6、8、10、12、14日及びネガティブ対照であり、図3では16、18、20、22、24、26、28日及びネガティブ対照(黒く塗りつぶした曲線)である。

【0053】

(実施例 11)

以下の方法でウサギ抹消血細胞をインビボ形質転換させた。

小腸由来の全糖脂質(A型Le(a-b+))200mgを100μlの温エタノールに溶かして糖脂質を調製した。温(37℃)イントラリピド(Pharmacia)(2ml)を添加後、短時間超音波処理した。糖脂質を耳周辺の静脈に注入した(遅い注入)。注入前後にウサギから採血し(約0.2~0.5m

l)、抗-ルイス試薬(抗-Le^b Gamma Biological LBM26-1と、時には抗-Le^a Gamma Biological LAM25-1)で血清学を調べた(実施例D参照)。より遅い日の検査では、より早期の試料を貯蔵細胞の安定性の対照として再検査することも含めた。細胞は赤血球保存溶液(Celpresol, CSL Australia)内4℃で貯蔵した。

【0054】

(実施例D)

【表10】

表10. 血清学—ウサギ MO				
試料採取日	日	検査した日付	抗-Le ^b	抗-Le ^a
前 (5/10)	-1	12/10	-	-
前 (5/10)	-1	8/10	-	-
注入 6/10	0	12/10		
後 7/10	1	8/10	+++	-
後 7/10	1	12/10	+++	-
後 9/10	3	12/10	+++	-
後 11/10	5	12/10	+++	-
後 11/10	5	17/10	+++	-
後 11/10	5	24/10	+++	-
後 16/10	11	17/10	+++	-
後 24/10	19	25/10	+++	

10

20

【0055】

【表11】

表11. 血清学—ウサギ BK				
試料採取日	日	検査した日付	抗-Le ^b	抗-Le ^a
前 (8/8)		8/8	-	
注入 18/10	0			
後 (19/10)	1	20/10	+++	
後 (24/10)	6	25/10	+++	
後 (31/10)	13	3/11	+++	

30

【0056】

【表12】

表12. 血清学—ウサギ CO				
試料採取日	日	検査した日付	抗-Le ^b	抗-Le ^a
前 (5/10)	-13		-	-
前 (11/10)	-7		-	-
注入 18/10	0			
後 19/10	1	20/10	+++	
後 (24/10)	6	25/10	+++	
後 (31/10)	13	3/11	+++	

40

【0057】

(実施例12)

以下の方法に従って赤血球をインビトロ形質転換させた。

正常なラット血漿を糖脂質希釈剤として用いた(他のいずれの希釈剤も使用できるが)。すべての実験で、1mlの血漿中、血漿中糖脂質の原液1ml当たり250μgのLe^bで調製した。必要に応じてこのラット血漿中の原液のさらなる希釈物を調製した。

ルイス糖脂質(600μl)を含有する等量の血漿を等量の洗浄した充填赤血球(600μl)に添

50

加することによって、形質転換赤血球を調製し、適宜インキュベートした。時間間隔をあけて、75 μ lの混合物を除去し、細胞を食塩水で3回洗浄してから食塩水に懸濁させることによっていかなる反応も停止させた。血清学を検査するまで(抗-Le^bに対して)、細胞を4℃で貯蔵した(実施例E)。

【0058】

(実施例E)

異なる濃度のLe^b糖脂質で、異なる長さの時間インビトロ形質転換させたラット赤血球の血清学。結果を表13に示す。

【表13】

表13.									
Le ^b	インキュベートした時間(時間)								
濃度	0.5	1	2	4	8	12	24	36	48
25	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
12.5	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
6.3	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++
3.2	-	+	++	++	+++	+++	++++	++	+
1.6	-	-	+	+	++	++	++	+	-
0.8	-	-	-	-	+	+	+	-	-
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

濃度 = μ g Le^b/mlのラット血漿

【0059】

(実施例13)

フローサイトメトリー分析によって温度動力学を決定した。

この実験では、まず37℃における3時間の異なる濃度のLe^b糖脂質とのインキュベーション時に感作された細胞に対してフローサイトメトリー分析の感受性を評価した。フローサイトメトリー分析は100 μ g/mlより高い濃度の糖脂質で形質転換させた細胞を検出するためには非常に確実であることが分かり、インキュベーション時間内で血清学的評点3+又は4+をもたらした(結果は示さず)。これら結果によれば、250 μ g/ml(25 μ g/管)を含有する血漿により8時間までの時間で3つの異なる温度、4℃、22℃及び37℃で赤血球が形質転換した。結果はフローサイトメトリー分析で評価した(実施例F1及びF2参照)。

【0060】

(実施例F1)

形質転換温度37℃における経時的なヒトLe(a-b-)赤血球のLe^b糖脂質によるインビトロ形質転換。反応性は、2種の抗-Le^b試薬を用いてフローサイトメトリー分析で決定した。結果を図4に示す。黒く塗りつぶした曲線は、ネガティブ対照、すなわち未形質転換細胞を表す。左の方の塗りつぶしていない曲線は、最少量の形質転換時間を表し、右の方の曲線は、より長い時間を表す。結果は、逐次的順序、すなわち左から右へ0、1、2、3、4、5、6、7、及び8時間である。

【0061】

(実施例F2)

形質転換温度22℃(RT)における経時的なヒトLe(a-b-)赤血球のLe^b糖脂質によるインビトロ形質転換。反応性は2種の抗-Le^b試薬を用いてフローサイトメトリー分析で決定した。黒く塗りつぶした曲線は、ネガティブ対照、すなわち未形質転換細胞を表す。結果を図5に示す。左の方の塗りつぶしていない曲線は、最少量の形質転換時間を表し、右の方の曲線は、より長い時間を表す。結果は、逐次的順序、すなわち左から右へ0、1、2、3、4、5、6、7、及び8時間である。

【0062】

形質転換温度 4℃における経時的なヒトLe(a-b-)赤血球のLe^b糖脂質によるインビトロ形質転換。反応性は2種の抗-Le^b試薬を用いてフローサイトメトリー分析で決定した。結果を図6に示す。黒く塗りつぶした曲線は、ネガティブ対照、すなわち未形質転換細胞を表す。左の方の塗りつぶしていない曲線は、最少量の形質転換時間を表し、右の方の曲線は、より長い時間を表す。結果は、逐次的順序、すなわち左から右へ0、1、3、5、及び7時間である。

【0063】

(実施例14)

以下の方法で、PBS塩を有する乾燥糖脂質試料を調製して再構成した。

10

(実施例G1)

以下のように糖脂質試料を調製して乾燥させた。

- ・ 乾燥糖脂質をクロロホルム：メタノール(2：1)に溶かして50mg/mlの濃度にした。
- ・ 溶解糖脂質(500μl)をガラス管に移した。使用強さのリン酸緩衝食塩水(PBS 500μl又は50μlの10×PBS)を添加した。少量のメタノールも添加して単相溶液の形成を容易にした。
- ・ この溶液を窒素ガス下70℃の熱ブロック内で乾燥させた。乾燥時、溶液は周期的に2相に分離したので、少量のメタノールを加えてそれを1相に戻して蒸発を促した。この方法で糖脂質試料は完全に乾燥させることができた。代わりに、糖脂質をマイナス85℃で凍らせ、かつ凍結乾燥させることができる。

20

(実施例G2)

乾燥糖脂質試料を以下のように再溶解させた。

- ・ 脱イオン水(500μl)を乾燥糖脂質試料に添加してPBS中糖脂質の50mg/ml溶液を生成した。管を2分間超音波処理して試料を完全に溶解させた。試料は、使用強さのPBSで所望濃度にさらに希釈できた。

【0064】

(実施例15)

これはRBCs中に糖脂質を挿入する代替かつ好ましい方法であり、3：1比を使用する。

- ・ 血液型A糖脂質(20μl, 10mg/ml)と、洗浄した充填O型RBCs(60μl)をエッペンドルフ管に加えた。
- ・ 管を25℃の水浴内で4時間、時間毎にミキシングしながらインキュベートした(RTは、37℃でのインキュベーションに比し、無視できる溶血によって実証されるように、挿入段階のストレスが少ない)。
- ・ 形質転換RBCsを3回PBSで洗浄してから血清学に好適な濃度の細胞保存溶液に懸濁させた。

30

4℃で1日及び25と62日貯蔵した糖脂質挿入実験の管血清学結果を下表14に示す。

40

【0065】

【表 1 4】

表 1 4. 抗-Le^b (SCR A40-1-2/A40-1-1) 及び抗-A (KIL 2901 E6-2/E6-3) を用いて形質転換させられたRBCsの管血清学。

糖脂質 濃度 (mg/mL)	Le ^b			A	
	日 1	日 25	日 62	日 1	日 25
10	++++	nd	++/+++	+++	++
5	++++	nd	++/+++	++	++
2	+++	nd	+ / ++	0	+
1	++++	nd	++	0	+
0.1	+++	++	0	0	nd
0.01	++	++	0	0	nd
0.001	++	++	0	0	nd
0.0001	++	0	0	0	nd
対照	0	0	0	0	0

nd = 決定せず

【0 0 6 6】

(実施例 1 6)

(実施例 H 1)

細胞凝集は、従来の管血清学を用いることに加え、Diamed-ID Micro Typing Systemを用いて評価した。用いたカードは、NaCl、酵素試験及び冷凝集カードであり、いずれの抗血清又は他の試薬をもあらかじめ充填しない。このため特定の抗血清を使用できる。

下表 1 5 及び 1 6 は、このシステムで得られた凝集結果を示す。

【表 1 5】

表 1 5. 前もって A 糖脂質で 8 日形質転換させた O 型細胞の Diamed-ID Micro Typing System 凝集結果。用いた抗体は、Seraclone 抗-A である (実験 KIL2202 E16-1)。

レーン/ ウェル	形質転換 糖脂質 mg/ml	評点
188-1	対照	ネガティブ - 未反応 O 細胞
185-0	10	+++
185-1	5	+++
185-2	2	++
185-3	1	0
185-4	0.1	0

【0 0 6 7】

【表 1 6】

表 1 6. 前もって A 糖脂質で 17 日形質転換させた O 型細胞の Diamed-ID Micro Typing System 凝集結果。用いた抗体は、Seraclone 抗-A である (実験 KIL2202 E41-2)。

レーン/ ウェル	形質転換 糖脂質 mg/ml	評点
8-1	対照	++++
185-0	10	+++
185-1	5	++
185-2	2	0
185-3	1	0
190-1	0	ネガティブ - 未反応 O 細胞

10

【0 0 6 8】

(実施例 H 2)

管血清学及び Diamed システムを用いて比較検査を行い、この 2 システムの比較性能を立証した。Seraclone 及び Abba-clone 抗-A 血清を用いて、それらの性能特性が 2 システム間で同等であるかどうかを立証した。結果を下表 1 7 に示す。

20

【表 1 7】

表 1 7. 2 種の抗-血清 - Seraclone と Albaclone を用いた凝集結果。管内及び Diamed システム内で細胞と抗血清を検査した。

		A 糖脂質 (mg/mL)				
		10	5	2	1	0
管						
	セラクロン (Seraclone)	3+	2+	0	0	0
	アルバクロン (Alba-clone)	3+	2+	0	0	0
Diamed						
	セラクロン	3+	2+	1+	+w	0
	アルバクロン	2+	2+	0	0	0

30

【0 0 6 9】

(実施例 1 7)

以下の方法で糖脂質挿入の安定性を調べた。

2 セットの細胞を異なる濃度の A 糖脂質で形質転換させた。1 セットは 1 週間及び 6 週間で凝集について検査し、他は毎週検査した。管血清学と Diamed の凝集結果を下表 1 8 に示す。毎週検査するための細胞は、その性能を比較する手段として 2 つの細胞保存溶液 - CellStab と Celpresol - に分けた。すべての細胞は平底ビンに貯蔵した。凝集評点又は溶血の相異で判断した場合、2 つの細胞保存溶液間で、何ら有意な相異は見られなかった。細胞は、いつでも最少の溶血から溶血無しを示した。

40

【0 0 7 0】

【表 18】

表 18. 異なる濃度の A 糖脂質で形質転換させた細胞の凝集結果。29 日以後の結果は Alba-clone 抗-A を用いて得、その他はすべて Seraclone 抗-A を用いた（これら 2 つの抗血清の同等データについては上表 17 を参照せよ）。

		10	5	2	1	0.1	対照
長期検査							
日 1	管	4+	3+	2+	1+	+w	0
	Diamed	3+	3+	+w	0	0	0
日 17	管	3+	2+	0	0	nd	0
	Diamed	3+	2+	1+	0	nd	0
週検査							
日 1	管	3+	nd	2+	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
日 8	管	1+	nd	0	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
日 15	管	1+	nd	0	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	2+	nd	0	0
日 22	管	3+	nd	0	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
日 29	管	1+.w	nd	0	nd	2+	0
	Diamed	4+	nd	3+	nd	0	0
日 36	管	4+	nd	2+	nd	0	0
	Diamed	4+	nd	3+	nd	0	0
日 43	管	4+	nd	3+	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
日 49	管	1+	nd	nd	nd	nd	0
	Diamed	3+	nd	nd	nd	nd	0
日 57	管	2+	nd	nd	nd	nd	0
	Diamed	2+	nd	nd	nd	nd	0

【0071】

(実施例 19)

ビオチン化ガングリオシド (BioG) の調製。

ビオチン化ガングリオシド (BioG) は、Wilchek 及び Bayer によって述べられた (1987) 改良手順で調製した。

- ・ ブタ脳から精製した乾燥ガングリオシドを超音波処理の助けをかりて PBS 内で再構成した。
- ・ m-過ヨウ素酸ナトリウムを添加してガングリオシドシアル残基を酸化した。
- ・ 溶液を 24 時間透析に供し、結果のペルオキシドを除去した。
- ・ 酸化ガングリオシドをビオチンアミドカプロイル (amidocaproyl) ヒドラジド (Sigma B-3770) と共に 1 時間インキュベートした。
- ・ 溶液をさらに一晩中、水中で透析に供して過剰のビオチンアミドカプロイルヒドラジドを除去した。
- ・ 結果の溶液を回転式エバポレーションによって乾燥させ、50% のメタノール水中で再構成した。窒素ガス下減圧デシケーター内で一晩中さらにエバポレーションを行った。
- ・ BioG 試料 (50mg/ml) を使用強さの PBS 中、所望濃度に希釈した。

【0072】

(アビジンの調製)

- ・ アビジンを使用強さの PBS に溶かして 1 mg/ml の濃度にした。

(ビオチン化サッカリドの調製)

- 凍結乾燥ビオチン化サッカリドはSyntesomeから得た。
A-PAA-ビオチン=Syntesome Cat No 165-BP
B-PAA-ビオチン=Syntesome Cat No 186-BP
- それを脱イオン水で1 mg/mlに再懸濁させ、PBSで所望濃度に希釈した。

【0073】

(形質転換法)

合成形質転換システムは、3つの連続段階が存在する。まずビオチン化ガングリオシド (BioG) のRBC膜中への挿入、次いで該ガングリオシドのビオチン上へのアビジン(Av)の接合、最後に該アビジン分子上へのビオチン化サッカリド(例えば、A-PAA又はB-PAA)の接合である。すべて最初の実験はA-PAAで行った。

10

ビオチン化ガングリオシド挿入。

- BioG(20 µl, 0.01mg/ml A-PAA接合を意図した細胞用)と、洗浄した充填O型RBCs(60 µl)をエッペンドルフ管に添加した。
- 管を25℃の水浴内で1時間毎にミキシングしながら4時間インキュベートした(RTは、37℃でのインキュベーションに比し、無視できる溶血によって実証されるように、挿入段階のストレスが少ないことが分かった)。
- 形質転換RBCsをPBSで3回洗浄した。

アビジン接合。

- 洗浄したBioG RBCs(約60 µLの赤血球)を含有するエッペンドルフ管にアビジン(40 µL, 1mg/ml)を添加した。
- 管をRTで30分間、10分毎にミキシングを行いながらインキュベートした。
- Av-BioG RBCsをPBSで3回洗浄した。

20

ビオチン化サッカリド接合

- 洗浄したAv-BioG RBCs(約60 µlの赤血球)を含有するエッペンドルフ管にビオチン化サッカリド(60 µl, 0.001mg/mL)を添加した。
- 管をRTで30分間、10分毎にミキシングを行いながらインキュベートした。
- BioG-Av-A-PAA RBCsをPBSで3回洗浄し、血清学検査のためCelpresolに懸濁させて5%濃度にした。

【0074】

30

(実施例20)

ブロックタイター(block titre)を行い、抗-Aに対して検査したときにポジティブな凝集を生じさせるRBCsを生成するのに必要なBioGとA-PAAの両方の最小濃度を決定した。結果を下表19及び20に示す。

【0075】

【表19】

表19. Seraclone抗-Aを用いたA-PAAサッカリドのブロックタイターの結果。						
BioG 濃度 (mg/mL)	Bio-A-PAA濃度 (mg/mL)					
	0.01	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0
0.03	++++	++++	+++	++	+	0
0.02	++++	++++	+++	++	++	0
0.01	+++	+++	++	+	++	0

40

【0076】

【表 20】

表 20. より高いBioG濃度を有するA-PAAサッカリドのブロックタイターの結果、BioG又はA-PAAサッカリド、或いは両方を欠いている細胞のネガティブな結果を示す。用いた抗-AはSeracloneだった。

BioG濃度 (mg/mL)	Bio-A-PAA濃度 (mg/mL)					
	0.01	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0
6	++++	++++	++	+	(+)	(+)
3	++++	++++	++	+w	(+)	(+)
1.5	++++	++++	++	vw	0	0
0.75	++++	+++	++	vw	0	0
0.4	++++	+++	++	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

10

【0077】

(実施例 21)

以下の方法でBioG濃度の安定性を分析した。細胞は、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.12mg/ml及び0.05mg/mlのBioG濃度と、0.01及び0.0025mg/mlのA-PAAサッカリド濃度を用いて確立された方法で調製した。血清学的評点のため毎週0.01mg/ml細胞を調べた。実験中溶血は見られなかった。

20

30

40

【0078】

50

【表 2 1】

表 2 1. 異なる濃度のBioGとA-PAAで形質転換した細胞の凝集結果。1 日後の結果はAlbaclone抗-Aを用いて得、他はすべてSeraclone抗-Aを用いた（これら 2 つの抗血清の同等データについては表 6 を参照せよ）。

		BioG 濃度 (mg/mL)				
		0.5	0.25	0.12	0.05	0
A-PAA 0.0025 mg/mL						
日 1	管	1+	1+	2+	2+	0
	Diamed	2+	2+	2+	2+	0
A-PAA 0.01 mg/mL						
日 1	管	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 8	管	nd	nd	nd	nd	nd
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 15	管	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 22	管	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 29	管	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 36	管	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 43	管	4+	4+	4+	2+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 49	管	4+	4+	4+	2+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
日 56	管	4+	4+	4+	3+	0
	Diamed	4+	4+	4+	3+	0

nd = 決定せず

【0079】

管血清学を用いて比較検査を行い、SeracloneとAlbaclone抗-A血清が等価であるかどうかを立証した。示した濃度のBioGと、A-PAAサッカリド0.01mg/mlで細胞を形質転換させた。

【0080】

【表 2 2】

表 2 2. 2 種の抗-A血清—セラクロン(Seraclone)とアルバクロン(Albaclone)による凝集結果。管内でのみ細胞と抗血清を検査した。

A 抗血清	BioG濃度 (mg/mL)				
	0.5	0.25	0.12	0.05	0
セラクロン	4+	4+	4+	4+	0
アルバクロン	4+	4+	4+	4+	0

【0081】

(実施例 2 2)

10 µg/ml、7.5 µg/ml及び 5 µg/mlのA-PAAとのブロックタイター配合中0.5mg/ml、0.25 mg/ml、0.12mg/ml及び0.05mg/mlのBioGで形質転換させた細胞について、いくつかの有効期限切れ抗血清の検査を行った。使用した抗血清を表 2 3 に示し、結果を表 2 4 に示す。

【表 2 3】

表 2 3. 合成的にBioG-Av-B-PAA系で形質転換させた細胞に対する比較検査で使した抗血清。

A 抗血清			
Ref	製造業者	バッチ番号	有効期限
I	アルバクローン (Albaclone), SNBTS	Z0010680	1. 2. 03
II	バイオクローン (Bioclone)	01102	-
III	バイオラブ (Bio Labs)	8606	4. 87
IV	エピクローン (Epiclone), CSL	20901	11. 93
V	ガンマクローン (Gamma Clone)	AM30-1	19. 7. 93
VI	イムカー (Immucor)	1A6137A	22. 4. 93
VII	ローンラブ (Lorne Labs)	60086D	8. 01
VIII	ノバクローン (Nova Clone)	NA00503	8. 5. 93
IX	オルガノン (Organon)	112Z15A	19. 12. 93
X	セラクローン (Seraclone)	132051	29. 5. 93

10

【0 0 8 2】

【表 2 4】

表 2 4. A 抗血清比較検査の凝集結果。

BioG	A-PAA	A 抗血清									
(mg/mL)	(μ g/mL)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII I	IX	X
0. 5	10	2+	1+	0	+w	0	0	0	0	+w	2+
	7. 5	3+	2+	1+	2+	2+	2+	+w	0	1+	4+
	5	3+	3+	1+	1+	0	0	0	+w	2+	2+
0. 25	10	4+	2+	0	0	0	0	0	0	0	4+
	7. 5	3+	2+	0	1+	0	0	0	0	1+	4+
	5	4+	2+	0	+w	0	0	0	0	+w	4+
0. 12	10	3+	1+	0	0	0	0	0	0	+w	2+
	7. 5	1+	1+	0	2+	0	0	0	0	0	3+
	5	+w	+w	0	0	0	0	0	0	0	+w
0. 05	10	+w	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
	7. 5	2+	+w	0	0	0	0	0	0	0	2+
	5	+w	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
ネガティブ対照		0	0	(+)	0	0	0	0	0	0	0
ポジティブ対照		4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

20

30

I - Albaclone, II - Bioclone, III - Bio Labs, IV - CSL, V - Gamma Clone, VI-Immucor, VII - Lorne Labs, VIII - Nova Clone, IX - Organon, X - Seraclone.

40

【0 0 8 3】

これら抗血清のいくつかをDiamedシステム内で検査した。選択した結果を下表 2 5、2 6、及び 2 7 に示す。

【表 2 5】

表 2 5 . 表示濃度のBioGとA-PAAで形質転換させたO型細胞のDiamed-ID Micro Typing System凝集結果。用いた抗体は、アルバクローン(Albacclone) 抗-A (実験KIL2403 E93-1-1)である。		
レーン/ウェル	形質転換させるBioG(mg/mL)とA-PAA(μ g/mL)	評点
04-2	ポジティブ対照 - A型細胞	++++
66-1-1	0.5 mg/mL BioG と 10 μ g/mL A-PAA	++
66-1-2	0.25 mg/mL BioG と 10 μ g/mL A-PAA	+++
66-1-3	0.12 mg/mL BioG と 10 μ g/mL A-PAA	++
66-1-4	0.05 mg/mL BioG と 10 μ g/mL A-PAA	0
66-4	ネガティブ対照 - O型細胞	0

10

【0084】

【表 2 6】

表 2 6 . 表示濃度のBioGとA-PAAで形質転換させたO型細胞のDiamed-ID Micro Typing System凝集結果。用いた抗体は、アルバクローン(Albacclone) 抗-A (実験KIL2403 E93-1-2)である。		
レーン/ウェル	形質転換させるBioG(mg/mL)とA-PAA(μ g/mL)	評点
04-2	ポジティブ対照 - A型細胞	++++
66-2-1	0.5 mg/mL BioG と 7.5 μ g/mL A-PAA	++++
66-2-2	0.25 mg/mL BioG と 7.5 μ g/mL A-PAA	+++
66-2-3	0.12 mg/mL BioG と 7.5 μ g/mL A-PAA	++
66-2-4	0.05 mg/mL BioG と 7.5 μ g/mL A-PAA	0
66-4	ネガティブ対照 - O型細胞	0

20

【0085】

【表 2 7】

表 2 7 . 表示濃度のBioGとA-PAAで形質転換させたO型細胞のDiamed-ID Micro Typing System凝集結果。用いた抗体は、アルバクローン(Albacclone) 抗-A (実験KIL2403 E93-2-3)である。		
レーン/ウェル	形質転換させるBioG(mg/mL)とA-PAA(μ g/mL)	評点
04-2	ポジティブ対照 - A型細胞	++++
66-3-1	0.5 mg/mL BioG と 5 μ g/mL A-PAA	+++
66-3-2	0.25 mg/mL BioG と 5 μ g/mL A-PAA	+++
66-3-3	0.12 mg/mL BioG と 5 μ g/mL A-PAA	0
66-3-4	0.05 mg/mL BioG と 5 μ g/mL A-PAA	0
66-4	ネガティブ対照 - O型細胞	0

30

40

【0086】

ビオチン化した、PAAリンカーを有するB-トリサッカリド(B-PAA)でO細胞を合成的に形質転換させた。用いたBioG濃度は、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.12mg/ml及び0.05mg/mlであり、B-PAA濃度は、A-PAAに関して10 μ g/ml、7.5 μ g/ml及び5 μ g/mlだった。用いたB抗血清を表 2 8 に示し、検査の結果を表 2 9 に示す。

50

【表 2 8】

表 2 8. BioG-Av-B-PAA系で合成的に形質転換させた細胞に対する比較検査で用いた B 抗血清。

B 抗血清			
Ref	製造業者	バッチ番号	有効期限
I	アルバクローン (Albaclone), SNBTS	Z0110600	27. 4. 03
II	バイオクローン (Bioclone)	01103	—
III	バイオラブ (Bio Labs)	8625	7. 87
IV	エピクローン (Epiclone), CSL	23801	5. 00
V	エピクローン (Epiclone), CSL	20801	11. 93
VI	ローンラブ (Lorne Labs)	61003A	8. 01
VII	オルガノン (Organon)	112X19B	16. 12. 93
VIII	オルト臨床検査薬	BBB589A	21. 11. 99

10

【0087】

【表 2 9】

表 2 9. B 抗血清比較検査の凝集結果。

BioG	B-PAA	B 抗血清							
(mg/mL)	(μg/mL)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0.5	10	2+	3+	1+	+w	0	2+	0	4+
	7.5	0	0	2+	0	0	0	0	0
	5	0	0	1+	0	0	0	0	2+
0.25	10	2+	2+	1+	0	0	3+	0	4+
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	1+	0	0	0	0	2+
0.12	10	0	0	0	0	0	0	0	2+
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	1+
	5	0	0	+w	0	0	0	0	2+
0.05	10	0	0	0	0	0	0	0	+w
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	+w
ネガティブ対照		0	0	0	0	0	0	0	0
ポジティブ対照		4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

20

30

I - Albaclone, II - Bioclone, III - Bio Labs, IV & V - CSL, VI - Lorne Labs, VII - Ortho Clinical Diagnostics, VIII Organon。

【0088】

本発明を例によって述べたが、特許請求の範囲から逸脱せずに変更及び修正を行い得ることを認識すべきである。さらに、特定の特徴に対して周知の同等物が存在する場合、そのような同等物は、この明細書で明確に言及したかのように取り込まれる。

40

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図 1】一次抗体として抗-Le^bを用いたラット末梢血液細胞のインビボ形質転換において糖脂質Le^bの量を変えたフローサイトメトリー結果を示す。

【図 2】一次抗体として抗-Le^bを用いたラット末梢血液細胞のインビボ形質転換において1～12日間で時間を変えたフローサイトメトリー結果を示す。

【図 3】一次抗体として抗-Le^bを用いたラット末梢血液細胞のインビボ形質転換において16～28日間で時間を変えたフローサイトメトリー結果を示す。

50

【図 4】 2 種の抗-Le^b一次試薬を用いた37℃における赤血球のインビトロ形質転換の時間を0～8時間で変えたフローサイトメトリー結果を示す。

【図 5】 2 種の抗-Le^b一次試薬を用いた22℃(RT)における赤血球のインビトロ形質転換の時間を0～8時間で変えたフローサイトメトリー結果を示す。

【図 6】 2 種の抗-Le^b一次試薬を用いた4℃における赤血球のインビトロ形質転換の時間を0～7時間で変えたフローサイトメトリー結果を示す。

【図 1】

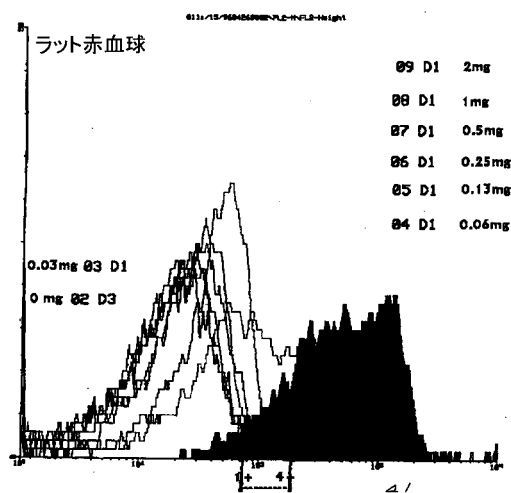


Figure 1

【図 2】

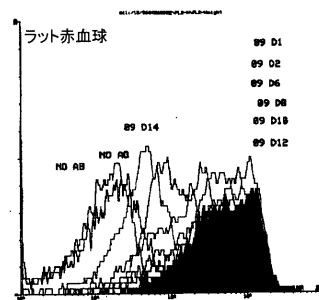


Figure 2

【図 3】

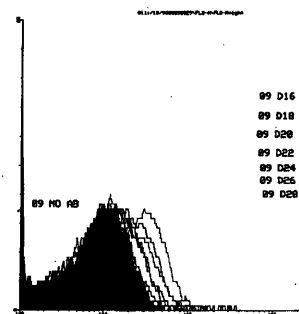


Figure 3

【図 4】

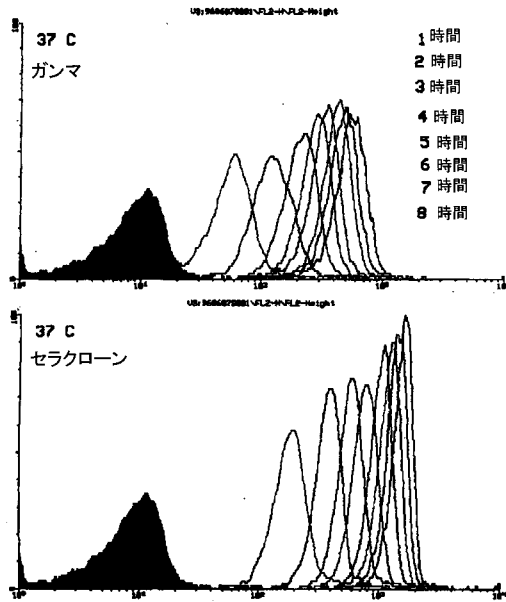


Figure 4

【図 5】

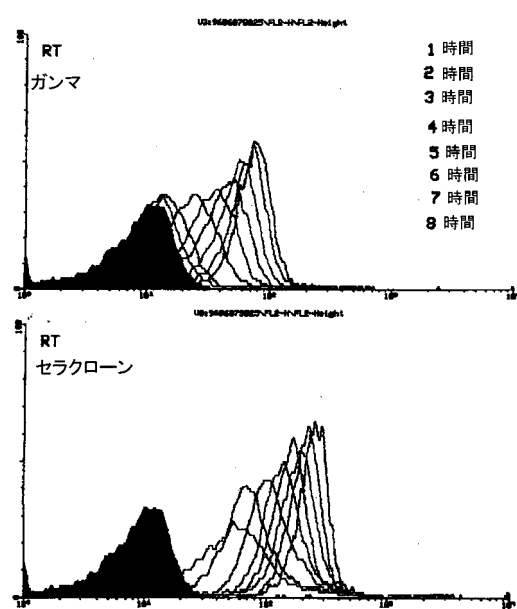


Figure 5

【図 6】

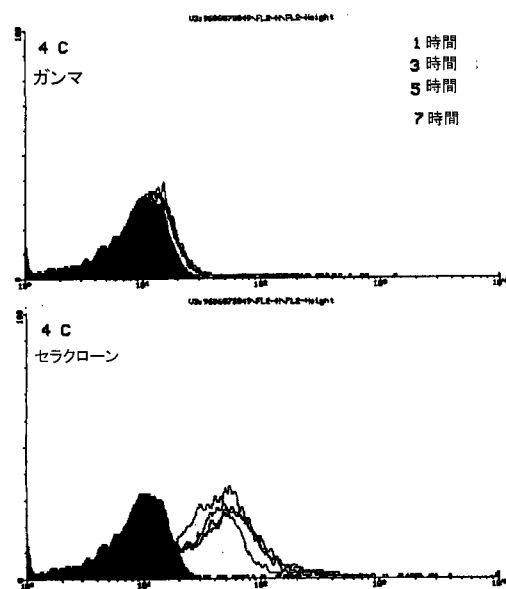


Figure 6

フロントページの続き

- (74)代理人 100114007
弁理士 平山 孝二
- (72)発明者 ブレイク デボラー アデラ
ニュージーランド オークランド マナーワ エイラ コティンガ ロード 38
- (72)発明者 ギリヴァー リッサ グウィネス
ニュージーランド オークランド スリー キングス ハンターズ パーク ドライヴ 47/21
- (72)発明者 ヘンリー スティーヴン マイケル
ニュージーランド オークランド ハウィック グレイスチャーチ ドライヴ 18
- (72)発明者 チェン ジ
ニュージーランド オークランド パ克蘭ガ ロード 287

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第00/023570 (WO, A1)
国際公開第01/049825 (WO, A1)
TOLVANEN M. et al., "In vitro attachment of mono- and oligosaccharides to surface glycoconjugates of intact cells.", The journal of biological chemistry, 1986年, Vol.261, No.20, P.9546-9511
KIM S. A. et al., "The use of palmitate-conjugated protein A for coating cells with artificial receptors which facilitate intercellular interactions.", Journal of Immunological Methods, 1993年, Vol.158, P.57-65
CIVENNI G. et al., "In vitro incorporation of GPI-anchored proteins into human erythrocytes and their fate in membrane.", BLOOD, 1998年, Vol.91, No.5, P.1784-1792
MEDOF M. E. et al., "Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins.", The FASEB journal, 1996年, Vol.10, No.4, P.574-586

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAplus(STN)