

顆粒球抗体検出用の HNA-1a, -1b, および -2a 遺伝子発現パネル細胞株の作成

保井 一太¹⁾ 宮崎 孔²⁾ 松山 宣樹¹⁾ 小島 芳隆¹⁾ 古田 里佳¹⁾
 藤澤 順一³⁾ 谷 慶彦¹⁾ 柴田 弘俊¹⁾ 佐藤進一郎²⁾ 加藤 俊明²⁾
 池田 久實²⁾ 平山 文也¹⁾

【目的】顆粒球抗原 (HNA) に対する抗体, とりわけ HNA-1a, -1b, -2a 抗体は TRALI などの非溶血性副作用の原因となる臨床的意義の高い抗体である. HNA 抗体の検出には抗原既知のパネル顆粒球が必要となるが, 顆粒球は長期保存が困難で, 血清によっては高い非特異反応を示し, HLA 抗体と HNA 抗体が混在する場合その判別が困難であり, パネル細胞としては最適なものではない. そこで我々は, HNA-1a, -1b, -2a 抗体検出用パネル細胞として, 特定の HNA のみを発現し, 半永久的に使用可能な細胞株の開発を試みた.

【方法】HLA, HNA の発現がなく, 正常血清との反応性も極めて低い K562 (ヒト赤白血病細胞株) 細胞を標的とし, HNA-1a, -1b, -2a 遺伝子をレトロウイルスベクターで同細胞に導入し, 遺伝子発現させ, その発現をそれぞれの HNA に対するモノクローナル抗体で調べた. さらに, 患者血清中に含まれる HNA 抗体 (特異性既知) の同定も HNA-1a, -1b, -2a パネル細胞株を用いて行なった.

【結果】遺伝子導入した細胞は低バックグラウンドで高い特異性が確認された. また, 細胞を 1 年以上培養しても抗原発現の低下は見られなかった. さらに, HNA 抗体以外の抗体 (HLA Class1 抗体など) を含む患者血清でも特異的に HNA 抗体を同定することが出来た.

【考察】作成したパネル細胞株は血中顆粒球抗体の高感度検出, とりわけ抗 HLA Class1 抗体を含む血清においては非常に有用な検出手段と考えられる.

キーワード: 顆粒球抗体, 顆粒球抗原, 遺伝子導入, 抗体検出用パネル細胞株

本論文内容は, Blackwell Publishing 社の許可のもと Transfusion 誌 (第 47 巻 第 3 号 478-485 2007 年) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである. (Yasui, K., Miyazaki, T., Matsuyama, N., Kojima, Y., Furuta, R.A., Fujisawa, J., Tani, Y., Shibata, H., Sato, S., Kato, T., Ikeda, H., Hirayama, F. : Establishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b, and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. Transfusion. 47 (3) : 478-485, 2007)

第 54 回日本輸血学会総会推薦論文

はじめに

顆粒球抗原 (Human Neutrophil Antigen, HNA), とりわけ HNA-1 と HNA-2 は重篤な非溶血性副作用や免疫性疾患の原因分子として知られている. HNA-1 システムは低親和性 Fcγ レセプター IIIb として知られている CD16b 上に表現され, アロ抗原として HNA-1a (NA1), HNA-1b (NA2), HNA-1c (SH) が報告されている^{1)~5)}. 一方, HNA-2 システムは CD177 上に表現され, アロ抗原として HNA-2a のみが確認されている^{1)~3)6)~8)}. これまでの多くの症例 (例えば, alloimmune

neonatal neutropenia⁹⁾¹⁰⁾, autoimmune neutropenia¹¹⁾¹²⁾, immune neutropenia after bone marrow transplantation¹³⁾¹⁴⁾, transfusion-related acute lung injury¹⁵⁾, 顆粒球輸血に伴う neutrophil alloimmunization¹⁶⁾¹⁷⁾ など)において HNA-1a, -1b, -2a に対する抗体の存在が報告されており, 患者血清および血液製剤中からこれらの抗体を検出することは非常に重要である.

現在, HNA 抗体の検出にはフローサイトメトリー法 (FCM 法) が広く使われているが, 同方法には, その発現する HNA の特異性がすでに同定された顆粒球(パ

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 北海道赤十字血液センター

3) 関西医科大学

〔受付日: 2007 年 2 月 28 日, 受理日: 2007 年 4 月 17 日〕

ネル顆粒球)が必要である。顆粒球は寿命が極めて短く、凍結保存によっても細胞凝集、抗原性の低下、非特異反応の増加などが顕著であり、測定ごとにパネル顆粒球の準備が必要である¹⁸⁾。さらに、HLA抗体とHNA抗体が混在する場合、HLA抗体と反応しないパネル顆粒球を準備するか¹⁸⁾、もしくは検査検体中のHLA抗体を除去しなければならない¹⁹⁾。このように、HNA抗体の検出に関しては技術的な問題から、本検査は限られた施設でしか実施できない。これらの問題を解決するため、遺伝子導入技術を利用したパネル細胞株の樹立が多くの研究者により試みられたが、論文としての報告はBuxらのHNA-1a, -1b, -1c発現細胞株のみである²⁰⁾。しかも、同細胞株は非特異反応も高く、また使用可能な寿命が短いため実用的とは言い難い。従って、現在使用可能なパネル細胞株は存在しない。

そこで我々は、HNA発現パネル細胞株の樹立の妨げとなっている2つの問題点、即ち 1)細胞株が示す高い非特異反応と 2)使用可能な寿命が短いことを、それぞれ 1)HLA, HNAの発現がなく血清(健康人)との反応性も極めて低いK562(ヒト赤白血病細胞株)細胞を標的とすること、2)レトロウイルスベクターで同細胞にHNA遺伝子を導入することで解決し、HNA-1a, -1b, -2a発現パネル細胞株を作成した。HNA-1a, -1b, -2aに対するモノクローナル抗体および患者血清で作成したパネル細胞株の特異性を調べたところ、いずれの場合でも低バックグラウンドで高い特異性が確認された。また、細胞を一年以上培養しても抗原発現の低下は見られなかった。

材料と方法

1. 血液および血清試料

用いた全血およびnormal血清は、予めHLA classI, HLA classII, HNA-1, HNA-2aをタイピングした大阪府赤十字血液センター職員由来のものを使用した。また、白血球抗体を含む抗血清は、non-hemolytic transfusion reaction, autoimmune neutropenia, alloimmune neutropenia症例に由来し、予めその特異性を5 cell-lineage immunofluorescence test (5 cell-lineage IFT)法¹⁸⁾で同定したものを用いた。これらの抗血清の一部は広島大学小児科、小林正夫教授から分与されたものである。

2. 細胞株

浮遊細胞株6種類と付着細胞株5種類を用いた。浮遊細胞株は、Jurkat細胞(human T-cell line, American Type Culture Collection (ATCC)より購入)、THP-1細胞(human monocyte cell line, ATCCより購入)、Namalwa細胞(human B-cell line, ATCCより購入)、L細胞(mouse B-cell line, ATCCより購入)、K562

細胞(human erythroleukemia cell line, 大阪大学医学部 金倉譲教授から分与)、CMK細胞(human megakaryocytic cell line, 大阪大学医学部 金倉譲教授から分与)の6種類で、RPMI1640に10% FBS, 50 U/ml penicillin (GIBCO社), 50 μ g/ml streptomycin (GIBCO社)を添加した培地で培養した。また、付着細胞株は、Hela細胞(human epithelial-like cell line, ATCCより購入)、293T細胞(human kidney cell line, ATCCより購入)、Cos7細胞(African green monkey kidney cell line, ATCCより購入)、3T3細胞(mouse fibroblast cell line, ATCCより購入)、CHO細胞(Chinese hamster ovary cell line, ATCCより購入)の5種類である。CHO細胞以外はDMEMに10% FBS, 50U/ml penicillin (GIBCO社), 50 μ g/ml streptomycin (GIBCO社)を添加した培地(complete DMEM)で、CHO細胞はHam'F 12に10% FBS, 50U/ml penicillin (GIBCO社), 50 μ g/ml streptomycin (GIBCO社)を添加した培地でそれぞれ培養した。

3. HNA-1a, -1b, -2a発現細胞株の作成

HNA-1a/a, -b/b, -2a(+)の遺伝子タイプを持つ大阪府赤十字血液センター職員の血液からtotal RNAを分取し、これをもとにHNA-1a, -1b, -2aのcDNAをRT-PCR法で合成した⁴⁾²⁰⁾²¹⁾。得られたcDNAをpCR2.1 TOPOベクター(Invitrogen社)でクローニングし、塩基配列を確認後、レトロウイルスベクターであるpQCXIPベクターにつなぎかえた。

次に、ウイルスエンベロープタンパク質発現細胞株であるGP293T細胞に、Lipofectamine PLUS Reagent (Invitrogen社)を用いて上記3種類のHNA発現レトロウイルスベクターおよびpVSV-Gベクター(ウイルスが細胞に感染する際に必要な受容体タンパク質を発現させるベクター)の導入を行なった。すなわち、 2×10^6 個のGP293T細胞を一晚培養後、培養液を無血清Opti MEM (GIBCO社)に交換し、添付マニュアルに従いLipofectamine PLUS Reagentで処理した4.2 μ gの各ベクター(pQCXIP:pVSV-Gを1:1の割合で混合)を同無血清培地に加えた。4時間後、無血清培地をcomplete DMEMに交換し、さらに48時間培養した培養上清をpseudovirusとして用いた²²⁾。このpseudovirusの感染効率をRat-1細胞で測定したところ約 1×10^5 unit/mlであった。

さらに、complete DMEM, pseudovirus, polybrene (4mg/ml)を250:250:1の割合で混合し、ウイルス感染溶液を作成した。この感染溶液にK562細胞を 1×10^6 /mlの濃度で懸濁し、CO₂インキュベーター内で2時間静置後、RPMI1640で2回洗浄したものをpseudovirus感染細胞とした。この感染細胞から限界希釈法(0.5 μ g/ml puromycinで選択)でHNA-1a, -1b, -2a

Table 1 Profile of cell lines summarized on the basis of background reactivity and expression of leukocyte antigens.

		Non-adherent cell lines						Adherent cell lines				
		K562	Jurkat	THP-1	Namalwa	CMK	L-cell	Hela	293T	Cos7	3T3	CHO
Normal Serum #1		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	1/3	2/3	0/3	2/3	2/3 weak
HLA #2	ABC	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	DR	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
	DR, DQ, DP	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HNA	1 #3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	weak
	2a #4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3a #5	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	4 #6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	5 #6	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

#1 determined by indirect immunofluorescence test using FITC-anti-human IgG after incubating with three kinds of normal human sera.

#2 determined by direct immunofluorescence test using FITC-anti-HLA ABC, PE-anti-HLA DR and PE-anti-HLA DR, DQ, DP antibodies.

#3 determined by direct immunofluorescence test using FITC-TAG-1, FITC-TAG-2 and TAG-3.

#4 determined by direct immunofluorescence test using FITC-TAG-4.

#5 determined by indirect immunofluorescence test using FITC-anti-human IgG after incubating with HNA-3a-reactive serum.

#6 determined by direct immunofluorescence test using PE-anti-HNA4 antibody (anti-Mac-1 antibody) and FITC-anti-HNA5 antibody (anti-LFA1 antibody).

の発現の高いクローンを選択し(それぞれ KY-1a, KY-1b, KY-2a と命名) 以後の実験に用いた。

4. FCM 測定

モノクローナル抗体: FITC-TAG-1 (against HNA-1a)²³⁾, FITC-TAG-2 (against HNA-1b)²³⁾, FITC-TAG-4 (against HNA-2a)²⁴⁾, FITC-anti-HLA ABC (Becton Dickinson 社), PE-anti-HLA-DR, -DQ, -DP (Beckman Coulter 社), PE-anti-Mac-1 (Becton Dickinson 社), FITC-anti-LFA-1 (Becton Dickinson 社), PE-anti-CD4 (Becton Dickinson 社), PE-anti-CD20 (Becton Dickinson 社), PerCP-anti-CD16 (Becton Dickinson 社) を用い、陰性コントロールにはそれぞれ FITC-mouse IgG1, PE-mouse IgG1 (Becton Dickinson 社) を用いた。なお, TAG-1, -2, -4 は広島医学技術専門学校 谷口菊代先生から分与されたものである。

染色方法: 5-cell lineage IFT における染色方法¹⁸⁾ に従い染色した。細胞浮遊液に被検血清を加え 4°C, 15 分間反応させ PBS (10Mm EDTA, 0.5% BSA) にて洗浄後, FITC-goat-anti-human IgG (Jackson 社) もしくは FITC-donkey-anti-human IgM (Jackson 社) で 4°C, 15 分間染色した。全血試料を染色する場合, BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson 社) で溶血させ, 二次抗体の残余結合部位をマウス血清でブロックし, PE-anti-CD4, PE-anti-CD20, PerCP-anti-CD16 で更に 4°C, 15 分間染色した。また, いくつかの実験では遺伝子導入した K562 細胞を予め 10µg/ml anti-CD16 (3G8, Becton Dickinson 社) で 4°C, 15 分間処理後, 染色を行なった。最後に FACSCalibur (Becton Dickinson 社) で抗体の有無を測定した。

結 果

1. パネル細胞の作成

HNA-1a, -1b, -2a 抗体検出用パネル細胞の作成を目的に, その親株となる細胞の選択を行なった。我々は 6 種類の浮遊細胞株と 5 種類の付着細胞株を候補とし, これらから健常人血清との反応性がなく(極めて低く), HLA, HNA 抗原の発現もない細胞株を選択した。健常人血清との反応性は Hela, 293T, CHO, および L 細胞で観られ, 他の 7 種類の細胞では観られなかった (Table 1)。また, これら 7 種類のうちで HLA, HNA 抗原の発現がなかったのは K562 細胞のみであった (Table 1)。そこで K562 細胞を親株とし, レトロウイルスベクター (pQCXIP) を用いて HNA-1a, -1b, -2a 遺伝子を導入し, パネル細胞を作成した (KY-1a 細胞, KY-1b 細胞, KY-2a 細胞)。同ベクターは目的遺伝子とマーカー遺伝子 (puromycin 耐性遺伝子) を IRES システムによって同時に発現させることが可能で²⁵⁾²⁶⁾, 安定した目的遺伝子の発現が期待される。我々は, 上記細胞を puromycin 存在下で培養し, 一年以上安定した HNA-1a, -1b, -2a の発現を観察した (Fig. 1)。また, HNA-1a, -1b, -2a に対するモノクローナル抗体 (TAG-1, -2, -4) を用いて, KY-1a, -1b, -2a 細胞での発現特異性も確認した (data not shown)。さらに, 上記モノクローナル抗体を段階希釈し KY-1a, -1b, -2a 細胞と反応させたところ, その検出限界は 1µg/ml であった (Fig. 2)。以上の結果から, 我々が作成した KY-1a, -1b, -2a 細胞は低バックグラウンドかつ特異的に HNA-1a, -1b, -2a 抗原を発現していた。

2. パネル細胞の健常人血清との反応性

我々は KY-1a, -1b, -2a 細胞および pQCXIP ベクターのみを導入した KY-mock 細胞について、健常人血清との反応性を調べた。親株の K562 細胞と同様に (Table 1), KY-2a および KY-mock 細胞と高い反応性を示す健常人血清はなかった。しかし、KY-1a, -1b 細胞とりわ

け KY-1a 細胞とは、予想に反して半数以上の血清がやや高い反応性を示した (Fig. 3A)。これら KY-1a, -1b 細胞上には導入した FcγRIIIb を発現しており、FcγRI, IIb は monomeric IgG と弱く結合し ($K_a = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), polymeric IgG とは強く結合する ($K_a > 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) ことが知られている²⁷⁾。そこで我々は、KY-1a, -1b 細胞と血清との非特異反応は、血清中に含まれる polymeric IgG 量に依存するのではないかと予想した。その検証のため、KY-1a, -1b, -2, および mock 細胞をモノクローナル抗体 3G8 (FcγRIIIb のリガンド結合を特異的に阻害する抗体^{2)28)~30)} で予め処理し、健常人血清との反応性を処理しなかった場合と比較したところ、3G8 抗体で処理することにより、明らかに KY-1a, -1b 細胞の健常人血清との反応性が低下し、KY-mock 細胞と同レベルになった (Fig. 3B)。また、3G8 抗体はリガンド結合部位に特異的に結合し、FcγR3b の多系を示す部位には結合しないと報告されており^{28)~30)}、実際、3G8 抗体で処理しても TAG-1 および TAG-2 の結合能に変化はなかった (data not shown)。従って、KY-1a, -1b 細胞と健常人血清との反応は、細胞に導入した FcγRIIIb のレセプターとしての性状に起因するものと結論される。以上の結果から、パネル細胞を 3G8 抗体で処理することによりバックグラウンドが低下し、血清中に含まれるアロ抗体を高感度に検出することが出来ると考えられる。尚、上記パネル細胞と HLA 抗体を含む血清との反応性も調べ、健常人血清の同様の結果が得られた (data not shown)。すなわち、上記パネル細胞に血清中の HLA 抗体が反応しないことも確認出来た。

3. ヒト血清中の HNA 抗体の検出

我々は 7 種類の HNA 抗体を含む血清 (その中に含ま

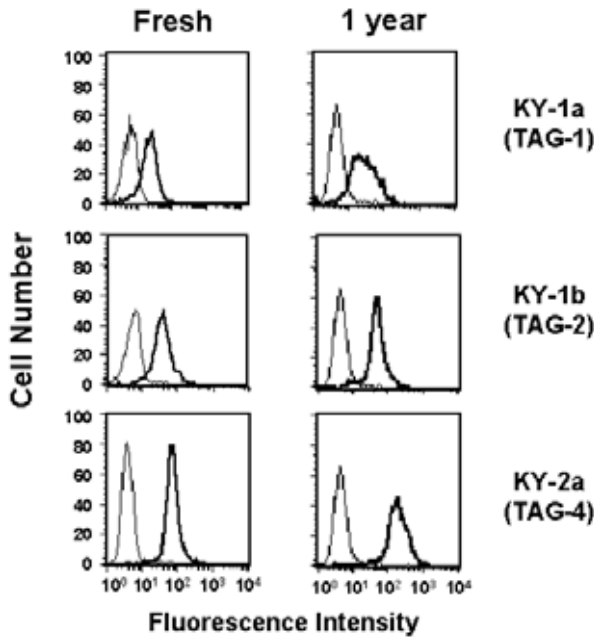


Fig. 1 Stability of HNA-1a, HNA-1b, and HNA-2a expression in the K562 panel cells.

KY cells were maintained in culture for one year and tested in the FCM assay for their reactivity with HNA mAbs as compared to freshly established KY cells. These cells were stained with 10 μg/ml of FITC-TAG-1, -2, or -4 or isotype matched mouse IgG as a control. Thin lines represent the results with the isotype control antibody.

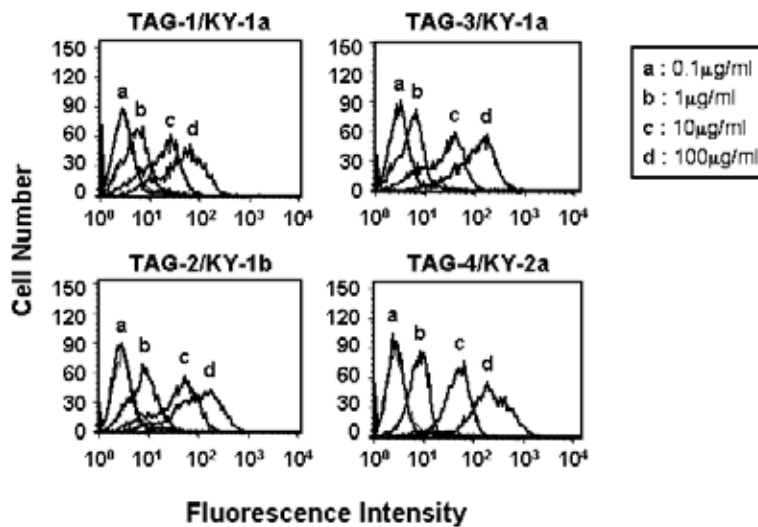


Fig. 2 HNA-1a, HNA-1b, and HNA-2a expression in the K562 panel cells. Various concentrations of TAG-1, -2, -3, and -4 bound to the corresponding K562 panel cells. Thin lines represent the results with the isotype control antibody. a = 0.1 μg per mL; b = 1 μg per mL; c = 10 μg per mL; d = 100 μg per mL.

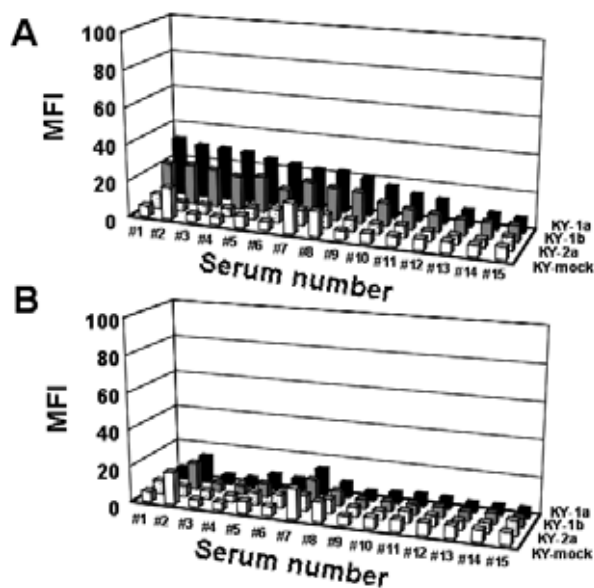


Fig. 3 Reactivity of normal human sera to K562 panel cells in the absence and presence of anti-Fc γ R3b mAb 3G8.

K562 panel cells were stained with several normal human sera, washed, and labeled with FITC-conjugated goat anti-human IgG. (A) The mean fluorescence intensities (MFIs) of the K562 panel cells incubated with human sera obtained from 15 healthy donors (#1-15) are shown. (B) The MFIs of K562 panel cells preincubated with mAb 3G8 are shown.

れる HNA 抗体の特異性は、予め 5 cell-lineage IFT 法¹⁸⁾で同定済みで、5 種類は IgG、2 種類は IgM) を用い、上記パネル細胞の実用性を検証した。

5 種類の IgG 性抗体を含む抗血清のうち #1 と #2 は HNA-1a 抗体を含んでいた。KY-1a 細胞はこれら抗血清と明らかに強く反応したが、KY-1b、-2a 細胞にも非常に弱くではあるが反応した (Fig. 4A, #1 and 2)。HNA-1b 抗体は抗血清 #3 と #4 に含まれ、KY-1b 細胞は同抗血清と強く反応した。また、KY-1a 細胞との微弱な反応が #4 で観られた (Fig. 4A, #3 and 4)。抗血清 #5 に含まれる HNA-2a 抗体と強く反応する細胞は KY-2a 細胞のみであった (Fig. 4A, #5)。我々は上記微弱反応が前述の Fc γ R3b に起因すると考え、次に抗体 3G8 で処理したパネル細胞を用いた測定結果を行ったところ (Fig. 4B)、抗体処理によって、含まれる HNA 抗体の特異性を損なうことなく、非特異反応を抑制することが出来た (Fig. 4B, #1, 3, and 4)。次に、抗血清 #2 と #4 を段階希釈し我々の検出系の検出限界を調べた。両抗血清を 1/1,000 に希釈してもその中に含まれる抗体を同定することが可能であった (Fig. 4C)。また、上記 IgM 性抗体を含む抗血清 (#6, #7) についても、二次抗体を anti-human IgM に換えることでその特異性を同定することが可能であった (data not shown)。

以上の結果より、我々のパネル細胞は、患者血清中に含まれる臨床的意義の高い HNA-1, -2 抗体を明確に同定することが可能であり、従って HNA 抗体が原因で発症する疾患の診断に有用と考えられる。

考 察

K562 は HLA, HNA の発現がなく、健常人血清との反応性も低いいため HNA 抗体検出用パネル細胞株の親株には最適な細胞である (Table 1)。我々は、いくつかの遺伝子導入法で K562 細胞に遺伝子導入を試みたが、レトロウイルスベクター法以外はどれも極めて低い遺伝子導入効率であった (data not shown)。そこで我々は、レトロウイルスベクターを用いて HNA-1a, -1b, -2a 遺伝子を K562 細胞に導入し、長期に渡って安定して同遺伝子を発現させることに成功した。その要因として、レトロウイルスベクターが K562 細胞のゲノムに組み込まれることがあげられる²²⁾³¹⁾。また、同ベクターは目的遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を IRES システムによって同時に発現させていることもあげられる²⁵⁾²⁶⁾。すなわち、puromycin 存在下で培養すれば、常に目的遺伝子の発現が保証されるものである。

我々のパネル細胞は、モノクローナル抗体とはバックグラウンドもなく特異的に反応したが、いくつかの健常人血清と KY-1a, -1b 細胞とは少なからぬ反応性を示した (Fig. 3A)。この反応性は血清中の polymeric IgG が KY-1a, -1b 細胞上の Fc γ R3b に結合したもので、同細胞を 3G8 抗体 (Fc γ R3b のリガンド結合を特異的に阻害する抗体^{2)28)~30)} で処理することで大きく低減させることが出来た (Fig. 3B)。さらに 3G8 抗体処理後もいくつかの非特異反応 (#2, #7, #8) が観察されたが (Fig. 3A, B)、少なくとも我々のパネル細胞による HNA 抗体検出を阻害するものではなかった。なぜなら、これらの血清は KY-1a, -1b, -mock 細胞と同レベルの反応性を示し、HNA 抗体に関しては陰性と判定できるからである。

HNA 抗体検出法には GIFT 法¹⁰⁾、GAT 法³²⁾、MAIGA 法³³⁾、MPHA 法³⁴⁾ などがある。これらの方法は精製した好中球をパネル細胞として用いるが、好中球は精製することで全血中のそれに比べヒト血清との非特異的な反応を起こしやすくなる¹⁸⁾。これまでの研究で我々は、全血をパネル細胞として用いることで非特異反応を抑えた改良型 GIFT 法 (5 cell-lineage IFT 法) の開発に成功している¹⁸⁾。同方法は好中球以外の血球 (T, B リンパ球, 単球, 血小板) との反応性の情報も得られ、HNA 抗体の特異性の同定に有用である。しかし、検査検体中に HLA 抗体と HNA 抗体の両方が存在した場合、5 cell-lineage IFT 法でも HNA 抗体の検出は困難である。それに対して我々のパネル細胞株は、HLA 分子を発現

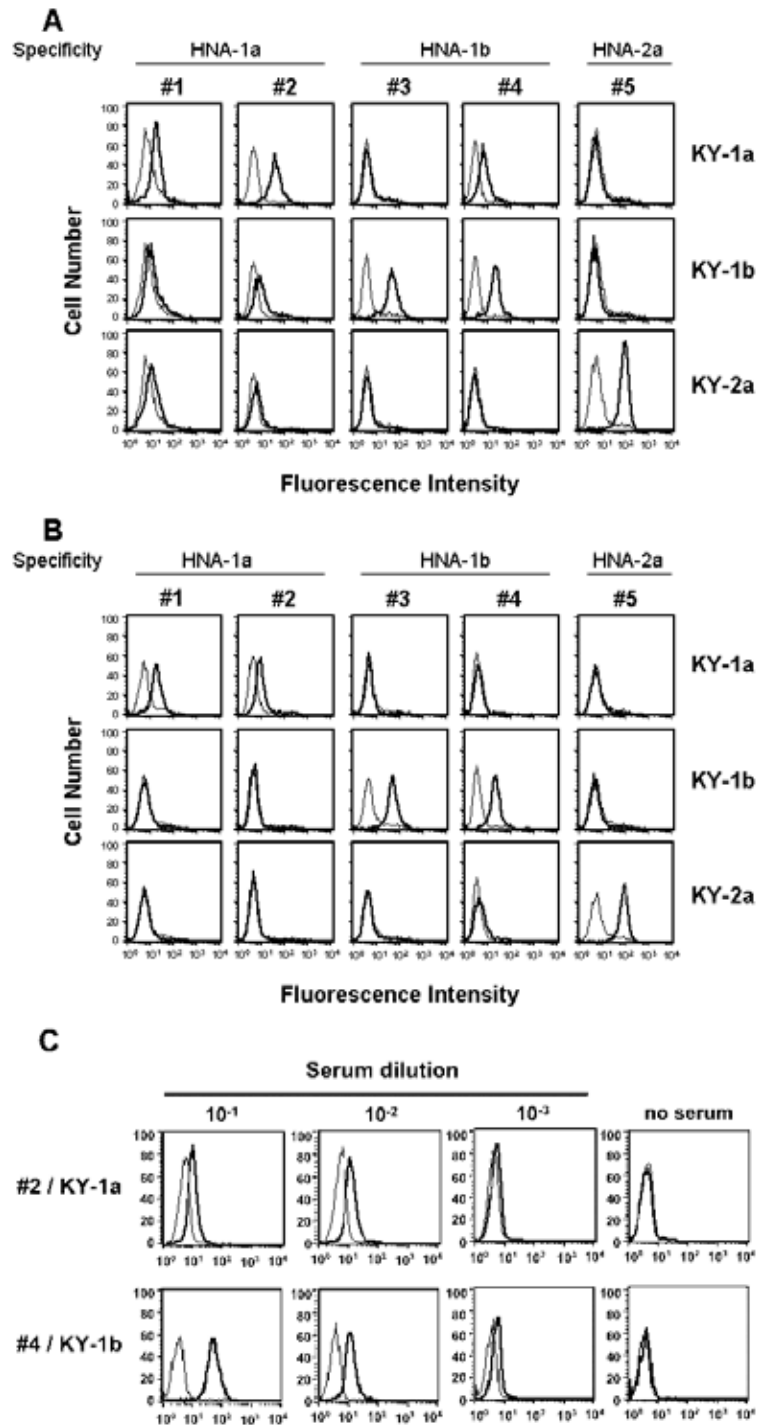


Fig. 4 Histogram profiles of the K562 panel cells stained with various HNA antisera.

The test serum samples were derived from patients with autoimmune neutropenia (1st and 2nd panels), a patient with alloimmune neutropenia (3rd panel), a case of non-hemolytic transfusion reaction (4th panel), and a case of TRALI (5th panel). The K562 panel cells were preincubated in the absence (A) or presence (B) of anti-FcγR3b mAb 3G8, stained with various test sera, washed, and labeled with FITC-conjugated goat anti-human IgG. Representative flow cytometric profiles are shown. (C) Various concentrations of serum #2 and #4 bound to the K562 panel cells. Thin lines indicate the results with K562 mock-transduced cells.

していないため HLA 抗体存在下でも容易に HNA 抗体を検出することが可能である。

現在、大阪府赤十字血液センターでは HLA classI 抗体、HLA classII 抗体のスクリーニングおよび特異性の同定は LABScreen を用いて行い、それ以外の HNA 抗体は 5-cell lineage IFT 法で同定している¹⁸⁾。これに加えて、今回樹立したパネル細胞株を用い、HNA-1a、HNA-1b、HNA-2a 抗体の存在とその特異性の確認検査も行っている。今後、塩基情報が明らかになっている HNA-4、HNA-5 発現パネル細胞を作成する予定である。

文 献

- 1) Bux J: Molecular nature of granulocyte antigens. *Trans Clin Biol*, 8: 242—247, 2001.
- 2) Bux J: Molecular genetics of granulocyte polymorphisms. *Vox Sang*, 78: 125—130, 2000.
- 3) Stroncek D: Neutrophil alloantigens. *Transfusion Med Rev*, 16: 67—75, 2002.
- 4) Koene HR, Kleijer M, Roos D, et al: FcγR3B gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct FcγR3B genes in NA (1 +, 2 +) SH (+) individuals. *Blood*, 91: 673—679, 1998.
- 5) Bux J, Stein EL, Bierling P, et al: Characterization of new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγ receptor 3b. *Blood*, 89: 1027—1034, 1997.
- 6) Kissel K, Scheffler S, Kerowgan M, et al: Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood*, 99: 4231—4233, 2002.
- 7) Taniguchi K, Nagata H, Katsuki T, et al: Significance of human neutrophil antigen-2a (NB1) expression and neutrophil number in pregnancy. *Transfusion*, 44: 581—585, 2004.
- 8) Kissel K, Santoso S, Hofmann C, et al: Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol*, 31: 1301—1309, 2001.
- 9) Marin L, Torio A, Muro M, et al: Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies. *Pediatr Allergy Immunol*, 16: 279—282, 2005.
- 10) Bux J, Jung KD, Kauth T, et al: Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med*, 2: 143—149, 1992.
- 11) Kwon SW, Procter J, Dale JK, et al: Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Vox Sang*, 85: 307—312, 2003.
- 12) Bruin M, Dassen A, Pajkrt D, et al: Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course. *Vox Sang*, 88: 52—59, 2005.
- 13) Herzog P, Korinkova P, Stambergova M, et al: Auto anti-A1 and auto anti-NA1 after bone marrow transplantation. *Folia Haematol. (Leipz)*, 114: 874—880, 1987.
- 14) Klumpp TR, Herman JH, Schnell MK, et al: Association between antibodies reactive with neutrophils, rate of neutrophil engraftment, and incidence of post-engraftment neutropenia following BMT. *Bone Marrow Transplant*, 18: 559—564, 1996.
- 15) Webert KE, Blajchman MA: Transfusion-related acute lung injury. *Transfusion Med Rev*, 17: 252—262, 2003.
- 16) McCullough J, Weiblen BJ, Clay ME, et al: Effect of leukocyte antibodies on the fate in vivo of indium-111-labeled granulocytes. *Blood*, 58: 164—170, 1981.
- 17) Stroncek DF, Leonard K, Eiber G, et al: Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion*, 36: 1009—1015, 1996.
- 18) Matsuyama N, Kojima Y, Hirayama F, et al: Simultaneous 5 cell-lineage flow cytometric analysis system for detection of leukocyte antibodies. *Transfus Med*, 16: 111—118, 2006.
- 19) Prou O, Kaplan C, Muller JY: Freeze dried platelets for HLA alloantibodies absorption. *Tissue Antigens*, 16: 105—107, 1980.
- 20) Bux J, Kissel K, Hofmann C, et al: The use of allele-specific recombinant Fcγ receptor 3b antigens for the detection of granulocyte antibodies. *Blood*, 93: 357—362, 1999.
- 21) Wolff J, Brendel C, Fink L, et al: Lack of NB1 (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Blood*, 102: 731—733, 2003.
- 22) Yasui K, Furuta RA, Matsumoto K, et al: HIV-1-derived self-inactivating lentivirus vector induces megakaryocyte lineage-specific gene expression. *Microbes Infect*, 7: 240—247, 2005.
- 23) Kobayashi M, Nakamura K, Kawaguchi H, et al: Significance of the detection of antineutrophil antibodies in children with chronic neutropenia. *Blood*, 99: 3468—3471, 2002.
- 24) Taniguchi K, Kobayashi M, Harada H, et al: Human neutrophil antigen-2a expression on neutrophils from healthy adults in western Japan. *Transfusion*, 42: 651—657, 2002.
- 25) Adam MA, Miller AD, Osborne WRA: Internal initiation of translation in retroviral carrying picornavirus 5' non-translated regions. *J Virol*, 65: 4985—4990, 1991.

- 26) Ghattas IR, Sanes JR, Majors JE: The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol Cell Biol*, 11: 5848—5859, 1991.
- 27) Tamm A, Kister A, Nolte UK, et al: The IgG binding site of human Fc γ 3B receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J Biol Chem*, 271: 3659—3666, 1996.
- 28) Takai T: Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Rev Immunol*, 2: 580—592, 2002.
- 29) Tamm A, Schmidt RE: The binding epitopes of human CD16 (Fc γ R3) monoclonal antibodies: implication for ligand binding. *J Immunol*, 157: 1576—1581, 1996.
- 30) Watanabe Y, Shimada E, Fujiwara K, et al: Nucleotide sequence of a new Fc gamma receptor 3B allele that codes for a neutrophil antigen. *Tissue Antigens*, 56: 272—275, 2000.
- 31) Sabatino DE, Seidel NE, Cline AP, et al: Development of a stable retrovirus vector capable of long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 938: 246—261, 2001.
- 32) Jiang AF, Lalezari P: A micro-technique for detection of leukocyte agglutinins. *J Immunol Methods*, 7: 103—108, 1975.
- 33) Bux J, Kober B, Kiefel V, et al: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus Med*, 3: 157—162, 1993.
- 34) Araki N, Nose Y, Kohsaki M, et al: Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination methods. *Vox Sang*, 77: 44—51, 1999.

ESTABLISHMENT OF CELL LINES STABLY EXPRESSING HNA-1a, -1b, AND -2a ANTIGEN WITH LOW BACKGROUND REACTIVITY IN FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS

*Kazuta Yasui*¹⁾, *Toru Miyazaki*²⁾, *Nobuki Matsuyama*¹⁾, *Yoshitaka Kojima*¹⁾, *Rika A. Furuta*¹⁾, *Jun-ichi Fujisawa*³⁾, *Yoshihiko Tani*¹⁾, *Hirotohi Shibata*¹⁾, *Shin-ichirou Sato*²⁾, *Toshiaki Kato*²⁾, *Hisami Ikeda*²⁾ and *Fumiya Hirayama*¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Osaka Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center

³⁾Kansai Medical University

Keywords:

human neutrophil antibody, human neutrophil antigen, transfection, panel cell line