



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, C12N 5/20 G01N 33/577 // C12N 15/06 (C12P 21/08, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 92/11384</p> <p>(43) 国際公開日 1992年7月9日 (09. 07. 1992)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP91/01736 (22) 国際出願日 1991年12月19日 (19. 12. 91)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平2/411805 1990年12月20日 (20. 12. 90) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤトロン (IATRON LABORATORIES, INC.) [JP/JP] 〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 徐 吉夫 (SOE, Gilbu) [JP/JP] 河野 功 (KOHNO, Isao) [JP/JP] 椎葉真美 (SHIIBA, Mami) [JP/JP] 〒101 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 森田憲一 (MORITA, Kenichi) 〒174 東京都板橋区志村2丁目14番18号 秀和志村城山レジデンス204号 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US</p>	<p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title : ANTIBODY AGAINST HUMAN PLASMIN-<math>\alpha_2</math>-PLASMIN INHIBITOR COMPLEX, HYBRIDOMA AND IMMUNOASSAY</p>		
<p>(54) 発明の名称 抗ヒトプラスミン-<math>\alpha_2</math>-プラスミンインヒビター複合体抗体、ハイブリドーマ及び免疫学的測定方法</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A first monoclonal antibody which specifically reacts with a human plasmin-<math>\alpha_2</math>-plasmin inhibitor complex (PIC) and a human plasminogen; a second monoclonal antibody which reacts with PIC and also with a human <math>\alpha_2</math>-plasmin inhibitor; a third monoclonal antibody which reacts with PIC but not with a human plasminogen and a human <math>\alpha_2</math>-plasmin inhibitor; hybridomas which secrete the first to third monoclonal antibodies; and an immunoassay using these antibodies. This invention makes it possible to determine the PIC content in the plasma of a patient by agglutination specifically, conveniently and rapidly without suffering from the interference of a free plasminogen and a free <math>\alpha_2</math>-plasmin inhibitor present in the plasma even when the plasma specimen is undiluted.</p>		

(57) 要約

本発明は、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ - $\alpha_1$ プラスミンインヒビター複合体 (P I O) 及びヒトプラスミノゲンと特異的に反応する第1のモノクローナル抗体、P I O 及びヒト $\alpha_2$ - $\alpha_1$ プラスミンインヒビターとも反応する第2のモノクローナル抗体、並びにP I Oと反応するがヒトプラスミノゲン及びヒト $\alpha_2$ - $\alpha_1$ プラスミンインヒビターとは反応しない第3のモノクローナル抗体、第1~第3のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ、並びにモノクローナル抗体を用いる免疫学的定量方法

本発明によれば、血漿試料の希釈増強

遊離プラスミノゲン及び遊離 $\alpha_2$ - $\alpha_1$

渉を受けることなく、患者血漿中のP I

迅速に、凝集法により測定することができ

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU*	ソヴィエト連邦
CI	コートジボワール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

\*SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

## 明 細 書

抗ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合  
体抗体、ハイブリドーマ及び免疫学的測定方法

## 技術分野

本発明はヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体 (Plasmin- $\alpha_2$ -Plasmin Inhibitor Complex : 以下 P I C の略称を用いることがある) に対して反応性を有する各種のモノクローナル抗体群、それらのモノクローナル抗体を分泌する各種のハイブリドーマ群及びそれらのモノクローナル抗体群を用いたヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体の免疫学的定量方法に関する。

## 背景技術

汎発性血管内凝固症候群 (D I C : Disseminated intravascular coagulation) 患者の血漿中や、ウロキナーゼ又はティッシュプラスミノゲンアクチベータ (t - P A) を用いた血栓溶解療法実施中の患者血漿中では、プラスミノゲンが活性化されてプラスミンが生成される。生成されたプラスミンは、流血中では瞬時に $\alpha_2$ プラスミンインヒビター ( $\alpha_2$  P I : 青木ら、J.Biol.Chem.,251,5956-5965,1976) と 1 : 1 の複合体、即ち前記の P I C を形成する。従って、P I C を測定することにより、プラスミンの生成、即ち、線溶系活性化の事象を把握することができる。最近、血漿中の P I C は D I C の診断及び血栓溶解療法のモニター等の分子マーカーとして重要視されている。そ

のため、血液あるいは血漿中のP I Cの量を正確かつ簡単に測定する必要がある。

従来から知られているP I Cの測定法としては、以下の5つの方法を挙げることができる。第1の方法は、二次元交叉免疫電気泳動法を用いる方法である。第2の方法は、P I Cのネオアンチゲンを認識するポリクローナル抗体を用いたラテックス凝集法である。第3の方法は、プラスミノゲンに対するポリクローナル抗体と $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターに対するポリクローナル抗体の両者を用い、その一方を固定化抗体とし、他方を酵素標識抗体とした、酵素免疫測定法である。第4の方法は、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターに存在するプラスミンの繊維素溶解作用を阻止する部位を特異的に認識するモノクローナル抗体とプラスミンポリクローナル抗体の両者を用い、その一方を固定化抗体とし、他方を酵素標識抗体とし、血漿検体を1200倍に希釈して測定する酵素免疫測定法である。第5の方法は、P I Cのネオアンチゲンを認識するモノクローナル抗体2種又は3種を用いるラテックス凝集法である。

しかしながら、第1の方法には、感度が低く定量性に欠けるという欠点があった。第2の方法には、P I Cを特異的に測定できないという欠点があった。第3の方法は、感度は良好であるが、抗血清の安定な確保が困難であり、免疫反応が2工程であるので操作が煩雑で、測定に長時間を要するという欠点があった。第4の方法は、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターに対するモノクローナル抗体を使用する点及び免疫反応を1工程で操作する点で前記の第3の方法が改良されているが、酵素免疫反応が有する欠点、即ち、操作が煩雑で測定に長時間を要するとい

う問題点を解消するものではなかった。更に、第4の方法には、1工程の免疫反応を導入するために、検体を1200倍に希釈する工程が必要になるという欠点もあった。第5の方法は、ポリクローナル抗体を用いた第2の方法と比較して、特異性や測定感度において差異はなく、PICを特異的に測定できないという問題点を解決するものではなかった。

本発明者は、PICを簡便に、正確にそして再現性よく測定する方法を開発するべく鋭意研究をした結果、PIC及びプラスミノゲンの両者に反応性を示す第1のモノクローナル抗体(PIC-1)、PIC及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの両者に反応性を示す第2のモノクローナル抗体(PIC-2)、そしてPICに特異的反応性を示すが、PICの構成タンパク質であるプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターには反応性を示さない第3のモノクローナル抗体(PIC-3)の、3種のモノクローナル抗体を見出し、これらのモノクローナル抗体の2種以上の組み合わせを用いると、血漿中のPICを、血漿検体の希釈工程を必要とせず、迅速かつ正確に、しかも検体中に遊離の状態で存在するプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの妨害を受けずに、特異的に測定することができることを見出した。従って、本発明の目的は、前記の新規モノクローナル抗体、そのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、及びそのモノクローナル抗体を用いる免疫学的定量方法を提供することにある。

#### 発明の開示

従って、本発明は、

(1) ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒトプラスミノゲンと特異的に反応する第1のモノクローナル抗体、

(2) ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターと特異的に反応する第2のモノクローナル抗体、及び

(3) ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体と特異的に反応し、ヒトプラスミノゲン及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しない第3のモノクローナル抗体に関する。

更に、本発明は、前記の第1～第3の各モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ又はそれらに由来する細胞株にも関する。

更に、本発明は、不溶性担体に固定化された、前記の第1～第3の各モノクローナル抗体少なくとも2種と、被検試料とを接触させ、被検試料における凝集反応を観察することを特徴とする、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体の測定方法にも関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のモノクローナル抗体ラテックス複合体を用いて、健常人血漿（12検体）及びDIC患者血漿（15検体）中のPIC量を測定した結果を示す説明図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を、モノクローナル抗体、ハイブリドーマ及び

免疫学的測定方法の順に説明する。

免疫原として用いるヒトPICは、例えば、P I o wらの方法 (J.Lab.Clin.Med.93,199-209,1979) に従って調製することができる。即ち、ヒト (健常人) の血漿からプラスミノーゲンを除去し、プラスミノーゲン不舎のこの血漿に、プラスミンを徐々に加えることによりPICを生成させ、生成したPICを適当な親和性ゲルに吸着させる。この吸着PICを適当な緩衝液で溶出させ、更に、イオン交換クロマトグラフィーや分子ふるいクロマトグラフィー等による精製操作で処理し、純化ヒトPICを得る。こうして得られたヒトPICは、SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidegel electrophoresis) で単一のバンドを示す。

次に、精製したヒトPIC免疫原溶液を用いて哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ又はウマ) をイン・ビボ免疫法により免疫する。

具体的には、例えば、精製したヒトPIC免疫原溶液を等量のプロインド氏完全アジュバント又は不完全アジュバントと乳化するまで混合する。この混合液を、例えばマウスの皮下に投与する (第1回免疫)。以後、2~4週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から数日後に脾臓を無菌的に取り出し、ステンレスメッシュなどで押しつぶして脾臓細胞を調製し、細胞融合工程に用いる。

細胞融合に用いるもう一方の親細胞であるミエローマ細胞 (骨髓腫細胞) としては、各種の公知の細胞株、例えば、p 3 (p 3 / × 6 3 - A g 8) [Nature,256,495-497(1975)]、p 3 - U 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology,

81;1-7(1978)]、NS-1 [Eur.J.Immunol.,6;511-519(1976)]、MPC-11 [Cell,8;405-415(1976)]、SP2/O [Nature,276;269-270(1978)]、FO [J.Immunol.Meth.,35;1-21(1980)]、×63.6.55.3 [J.Immunol.,123;1548-1550(1979)]、S194 [J.Exp.Med.,148;313-323(1978)]、又はラットにおけるR210 [Nature,277;131-133(1979)]などを使用することができる。

免疫脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合は通常の方法で行うことができ、例えば、公知の融合促進剤（ポリエチレングリコール又はセンダイウイルスなど）を用い、場合により補助剤（ジメチルスルホキシドなど）を用いることもできる。免疫脾臓細胞とミエローマ細胞との使用比率も常法と同様でよく、例えば、ミエローマ細胞に対して脾臓細胞を約1～10倍程度の量で用いる。融合用培地としては、例えば、40%（w/v）ポリエチレングリコールを含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）を用いることができる。融合は、前記の培地内で免疫脾臓細胞とミエローマ細胞とをよく混合することによって行う。続いて、選別用培地（例えば、HAT培地）を用いてハイブリドーマ以外の細胞を除去し、ハイブリドーマ培養上清の抗体産生の有無を、例えばELISA法によって測定し、目的とするハイブリドーマを分離する。

こうして得られた、本発明のモノクローナル抗体PIC-1、PIC-2又はPIC-3を分泌するハイブリドーマPIC-1、PIC-2又はPIC-3は、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素等の中で容易に長期間保存することができる。



また、前記のハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した任意の培地を用いることができ、好適にはD MEMにウシ胎児血清、L-グルタミン、L-ピルビン酸及び抗生物質（ペニシリンGとストレプトマイシン）を含む培地が用いられる。

前記のハイブリドーマの培養は、イン・ビトロの場合には例えば培地中で5%CO<sub>2</sub>濃度及び37℃で約3日間、またイン・ビボ例えばマウスの腹腔中で培養する場合には約14日間実施するのが好ましい。

前記のハイブリドーマPIC-1、PIC-2又はPIC-3を常法によって培養した培養液から、あるいは前記3種のいずれかのハイブリドーマを投与した適当な哺乳動物（例えばマウス又はラット）の腹水から、目的とするモノクローナルを分離し、精製することが可能である。

このようにして製造された培養液又はマウスの腹水からモノクローナル抗体を分離、精製する場合にはタンパク質の単離、精製に一般的に用いられる方法を用いることが可能である。そのような方法としては硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、凍結乾燥の方法等がある。

こうして得られた本発明の抗PICモノクローナル抗体は、その反応性によって以下の3種に分類することができる。

(1) PIC及びプラスミノゲンとは反応するが、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しない第1のモノクローナル抗体（PIC-1）。

(2) PIC及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応するが、プラスミノゲンとは反応しない第2のモノクローナル抗体(PIC-2)。

(3) PICとは反応するが、プラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しない第3のモノクローナル抗体(PIC-3)。

前記の第1のモノクローナル抗体(PIC-1)は、好ましくはヒトプラスミノゲンのクリングル2及びクリングル3を含む領域を認識する。

本発明による前記の第1～第3の抗PICモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させ、それらの少なくとも2種を被検試料と接触させると、被検試料中の遊離のプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは凝集反応を起こさず、PICとの間でのみ凝集反応を起こさせることができるので、PICの免疫学的定量方法に用いることができ、そして免疫学的定量用試薬としても有用である。

本発明の免疫学的定量方法に用いる被検試料は、PICを含有する可能性のある試料であれば特に制限されるものではないが、例えば、生体試料、特には血液、血清、血漿又は尿、好ましくは血漿である。本発明の免疫学的定量方法においては、被検試料を希釈せずに、そのまま使用しても、被検試料中に遊離の状態で存在するプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの妨害を避けることができる。即ち、本発明方法によれば、被検試料中に存在するプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの干渉を受けずに、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体の測定を行うことができる。

不溶性担体としては、抗原抗体凝集反応を利用する免疫学的測定方法において一般的に用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子（特には、ポリスチレンラテックス粒子）を挙げることができる。

本発明によるモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法（架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる）又は物理吸着法を用いることができる。こうして、モノクローナル抗体と不溶性担体との複合体を形成し、これを本発明の免疫学的定量方法に用いることができる。

本発明の免疫学的定量方法においては、前記の不溶性担体に固定化した少なくとも2種のモノクローナル抗体を使用するが、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した複合体を2種又は3種用いるか、あるいは、2種又は3種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した複合体を用いることができる。更に、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した複合体1種と、2種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した複合体1種との組み合わせを用いることもできる。本発明のモノクローナル抗体2種の組み合わせは任意でよいが、前記の第1のモノクローナル抗体（PIC-1）と第2のモノクローナル抗体（PIC-2）との組み合わせを用いるのが好ましい。

本発明の測定方法においては、前記のモノクローナル抗体固定化不溶性担体複合体の既知一定量と未知量のPICを含有する水性被検試料の一定量とを適当な反応容器（例えば、スライ

ド板上あるいは反応セル) 中で接触させる。例えば血漿試料の場合には、血漿試料(非希釈液) 1容量部に対して前記の複合体懸濁水(1%以上の濃度) を1容量部又は1容量部以上加えて接触させる。また、凝集像をより鮮明にするために、試料と複合体懸濁水に更に緩衝液(例えば、トリス塩酸緩衝液) を加えて接触させてもよい。こうして形成される凝集の程度からPIC濃度の定量を行うことができる。この凝集反応は、血漿試料中に存在する遊離のプラスミノゲン及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの妨害を受けない。例えば、スライド板の場合には目視的に、反応セルの場合は特定の波長を用いて分光学的に凝集反応を測定し、被検試料中のPIC濃度を定量することができる。

#### 実施例

次に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

##### 実施例1：PICの精製

(a) ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体(PIC)の精製はP1owらの方法(J.Lab.Clin.Med.93,199-209,1979)に従って行った。簡単に説明すると、ヒト(健常人)血漿100mlをリジン-セファロースカラム(ベッド容量、100ml)に通過させ、プラスミノゲンを除去した。プラスミノゲン不含のこの血漿に、プラスミン水溶液(60 $\mu$ g/ml)100mlを徐々に加えた後、37 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。反応後の水溶液をリジン-セファロースカラム(ベッド容量、200ml)に通し、PICを吸着させた。PIC吸着カラムを

0. 1 Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、50 mMε-アミノカプロン酸を含むPBSでPICを溶出させた。

更に、得られたPICをウルトロゲルACA44による分子篩クロマトグラフィーによって精製した。この精製PICを免疫原及び抗PICモノクローナル抗体のスクリーニングに使用した。

(b) 免疫化脾臓細胞の調製:

PIC免疫原溶液 (A280nm=0.1) を等量のフロイド氏完全アジュバンドと乳化するまで混合し、その混合液200μlをBALB/c系マウスの腹腔内に投与することにより免疫を行った(第1回免疫)。30日経過後、前記と同様の混合液200μlを前記マウスの腹腔内に投与した(第2回免疫)。第2回免疫から21日経過後、PIC免疫原溶液 (A280nm=0.1) を等量の生理食塩水で希釈して調製したPIC希釈液200μlを、前記マウスの静脈内に投与した(最終免疫)。最終免疫から3日経過後、脾臓を無菌的にマウスから取り出し、次の細胞融合工程に使用した。

(c) 細胞融合

15%ウシ胎児血清を含むDME培地5mlを入れたシャーレに、無菌的に抽出した前記の脾臓を入れた。次に、15%ウシ胎児血清を含むDME培地約15mlで前記脾臓を還流して脾臓細胞を流出させた後、この脾臓細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した。この脾臓細胞を50ml遠心チューブに集め、500×gで10分間遠心した。こうして得たペレットにヘモライジング溶液 (155mM-NH<sub>4</sub>Cl、10mM-KHCO<sub>3</sub>、1mM-Na<sub>2</sub>EDTA:pH7.0) 4mlを加え、懸濁させた。

0℃で5分間放置して懸濁液中の赤血球を破壊させた。15%ウシ胎児血清10mlを含むDME培地を加えてから遠心分離した。こうして得たペレットをDME培地で遠心法により洗浄し、生きている脾臓細胞数を測定した。

一方、予め培養しておいたマウスミエローマ細胞（骨髄腫細胞）SP2/0-Ag14（理化学研究所ジーンバンク細胞銀行）約 $2 \times 10^7$ 個に前記脾臓細胞 $1 \times 10^8$ 個を加え、DME培地中でよく混合し、遠心分離を行った（ $500 \times g$ 、10分間）。その上清を吸引し、ペレットをよく解きほぐし、40%ポリエチレングリコール4000溶液（38℃に保温）0.5mlを滴下し、遠心チューブを手で1分間穏やかに回転することによってポリエチレングリコール溶液と細胞ペレットとを混合させた。次に、38℃に保温しておいたDME培地を30秒毎に1mlずつ加えて、チューブを穏やかに回転させた。この操作を10回繰り返した後、15%ウシ胎児血清20mlを含むDME培地を加えて、遠心分離（ $500 \times g$ 、10分間）を行った。上清を除去した後、15%ウシ胎児血清を含むHAT培地（DME培地にアミノプテリン $4 \times 10^{-7} M$ 、チミジン $1.6 \times 10^{-5} M$ 、ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4} M$ になるように添加したもの）で細胞ペレットを遠心法によって2回洗浄した後、前記HAT培地40mlに懸濁した。この細胞懸濁液を96ウエル細胞培養プレートの各ウエルに $200 \mu l$ ずつ分注し、5%炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器で37℃にて培養を開始した。培養中、2～3日間隔で各ウエルの培地を約 $100 \mu l$ 除き、新たに前記のHAT培地 $100 \mu l$ を加えることによりHAT培地中で増殖するハイブリドーマを選択した。8日目から15%ウ

シ胎児血清を含むHAT培地（DME培地にチミジン $1.6 \times 10^{-5}$ M、ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}$ Mになるように添加したもの）に交換し、ハイブリドーマを観察するとともに、10日目に、後記のELISA法により、PIC抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

（d）ハイブリドーマの樹立

ハイブリドーマ培養液の上清における産生抗体の有無はELISA法により測定した。96ウエルELISA用プレート（ImmulonII、日本ダイナテック株式会社）の各ウエルに前記のPIC免疫原溶液（ $A_{280nm} = 0.05$ 、生理食塩水で希釈した） $50 \mu l$ ずつを分注し、 $25^\circ C$ で2時間放置した。次に、 $0.05\%$  Tween 20-生理食塩水で3回洗浄した後、各ウエルに培養液上清 $50 \mu l$ を加え、 $25^\circ C$ で1時間反応させた。

次に、Tween 20-生理食塩水で200倍に希釈したペルオキシターゼ結合抗マウス抗体（ダコ社、デンマーク） $50 \mu l$ を各ウエルに加えた。反応終了後、 $0.05\%$  Tween 20-生理食塩水で各ウエルを3回洗浄し、 $0.5mM$  アミノアンチピリン、 $10mM$  フェノール及び $0.005\%$  過酸化水素水を含む溶液 $250 \mu l$ を各ウエルに加え、 $25^\circ C$ で30分間反応させ、各ウエルの $490nm$ における吸光度を測定した。その結果、192ウエル中、3ウエルに抗体産生が認められた。その3ウエル中のハイブリドーマを24ウエルプレートに移し、 $15\%$  ウシ胎児血清を含むHAT培地で4～5日間培養した。その後、再度ELISA法によって抗PIC抗体の産生の有無を確認してから限界希釈法によりクローニングした。限界希釈

法は、HT培地でハイブリドーマが5個/mlとなるように希釈した細胞浮遊液を、予め正常BALB/C系マウスの腹腔細胞がウエル当たり $2 \times 10^4$ 個分注してある96ウエルプレートの各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。10日後、ELISA法によって抗PIC特異的抗体を産生するハイブリドーマのクローンをスクリーニングした。

その結果、各ハイブリドーマにつき、20~40個の抗体産生クローンが得られた。これらのクローンの中から、増殖力が強く、抗体分泌能が高く、しかも安定なクローンを選び、前記と同様の方法で再クローン化を行い、3種の抗PIC抗体産生ハイブリドーマPIC-1、PIC-2及びPIC-3を樹立した。これら3種のハイブリドーマから分泌される3種のモノクローナル抗体PIC-1、PIC-2及びPIC-3とヒトプラスミノゲン（アテンズ・リサーチ社、アメリカ）あるいはヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター（アテンズ・リサーチ社、アメリカ）との反応性を、96ウエルELISA用プレートにヒトプラスミノゲンあるいはヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを被覆し、前記のELISA法と同様の方法により調べた。モノクローナル抗体PIC-1はヒトプラスミノゲンと反応したが、ヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しなかった。モノクローナル抗体PIC-2は $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターと反応したが、ヒトプラスミノゲンとは反応しなかった。一方、モノクローナル抗体PIC-3はヒトプラスミノゲンにも、ヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターにも反応しなかった。

前記の各ハイブリドーマは通商産業省工業技術院微生物工業



技術研究所（あて名：〒305日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に1990年12月4日から国内寄託され、1991年12月16日から国際寄託に移管されている。国際寄託番号（国際寄託番号につづく〔〕内は国内寄託番号）は、ハイブリドーマPIC-1が微工研条寄第3681号（FERM BP-3681）〔微工研菌寄第11888号（FERM P-11888）〕、ハイブリドーマPIC-2が微工研条寄第3682号（FERM BP-3682）〔微工研菌寄第11889号（FERM P-11889）〕そしてハイブリドーマPIC-3が微工研条寄第3683号（FERM BP-3683）〔微工研菌寄第11890号（FERM P-11890）〕である。

#### 実施例2：モノクローナル抗体の製造

##### (a) イン・ビトロ法

マウスハイブリドーマPIC-1、PIC-2及びPIC-3を、それぞれ15%ウシ胎児血清を含むDME培地で、37℃で5%二酸化炭素雰囲気中において72~96時間培養した。培養物を遠心分離（10000×g、10分間）後、上清に固形の硫酸アンモニウムを50%最終濃度となるように徐々に加えた。混合物を氷冷下で30分間攪拌した後、60分間放置してから遠心分離（10000×g、10分間）処理し、得られた沈渣を少量の10mMリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解し、1000倍量の10mMリン酸緩衝液ですでに平衡化したDEAE-セルロースのカラムに充填した。モノクローナル抗体の溶出は10mMリン酸緩衝液（pH8.0）と0.2M-NaClを含む10mMリン酸緩衝液（pH8.0）の間で濃

度勾配法により行った。溶出されたモノクローナル抗体を限外濾過法で濃縮し、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH8.0) に対して透析した。ウシ血清 IgG を除くために、透析物をヤギ抗ウシ血清 IgG-セファロース 4 B カラムに通した。次に、通過液を 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH8.0) で平衡化したプロテイン A-セファロース 4 B カラムに充填した。カラムを pH3.5 の緩衝液で溶出して、精製した抗 PIC 特異モノクローナル抗体 PIC-1、同様にモノクローナル抗体 PIC-2、及びモノクローナル抗体 PIC-3 の溶液を得た。

(b) イン・ビボ法

プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 ml を 10~12 週齢の BALB/c 系マウスの腹腔内に投与し、それから 14~20 日目のマウスの腹腔内にインビトロで増殖されたハイブリドーマ PIC-1、PIC-2、又は PIC-3 をマウス一匹あたり  $2 \times 10^6$  個となるように接種した。各ハイブリドーマにつき一匹のマウスから約 10~15 ml の腹水が得られた。その抗体濃度は、2~10 mg/ml であった。腹水中のモノクローナル抗体の精製は、前記のイン・ビトロ精製と同様の方法 (但し、ヤギ抗ウシ血清 IgG-セファロース 4 B のカラムを通す操作を除く) で行なった。

実施例 3 : モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス及び特異性の同定

抗 PIC 特異モノクローナル抗体 PIC-1、PIC-2 及び PIC-3 の免疫グロブリンクラス及び特異性の同定はそれぞれオクテロニー免疫拡散法、エンザイムイムノアッセイ法及びイムノブロット法により行った。結果は表 1 に示す通りであ

る。

表 1

モノクローナル抗体	免疫グロブリンクラス	ヒトプラスミノーゲンとの反応性	PICとの反応性	ヒト $\alpha_2$ -プラスミンインビクターとの反応性
PIC-1	IgG <sub>1</sub>	+	+	-
PIC-2	IgG <sub>1</sub>	-	+	+
PIC-3	IgG <sub>1</sub>	-	+	-

表 1 (続き)

モノクローナル抗体	ヒトプラスミノーゲンクリンクル2及び3を含む領域との反応性	ヒトプラスミノーゲンクリンクル1との反応性	ヒトval-プラスミノーゲンとの反応性
PIC-1	有	無	無
PIC-2	無	無	無
PIC-3	無	無	無

表 1 において、「+」はELISA法で反応を示すことを、そして「-」はELISA法で反応を示さないことを意味する。更に、「有」はイムノブロット法で反応を示すことを、そして「無」はイムノブロット法で反応を示さないことを意味する。

実施例 4 : 抗体と不溶性担体 (ラテックス) との結合

モノクローナル抗体PIC-1 (2.0 mg/ml) を含有する水溶液 2 ml と、ラテックス溶液 (2%、Dow Chemical社: 粒径 0.482  $\mu$ m) 2 ml とを混合し、約 1 時間攪拌した。遠心 (20,000  $\times$  g、10 分間) した後、沈澱を 0.1% BSA 溶液に懸濁し、約 1 時間攪拌した。再び遠心 (20,000  $\times$  g、10 分間) した後、沈澱を水に懸濁し、約 2 時間攪拌し

た。こうして、モノクローナル抗体P I C - 1 / ラテックス複合体含有液を得た。同様にしてモノクローナル抗体P I C - 2 又はモノクローナル抗体P I C - 3 を用いて、単独の各モノクローナル抗体とラテックスとの複合体の含有液を調製した。

抗体混合物とラテックスとの複合体は以下のように調製した。モノクローナル抗体P I C - 1、モノクローナル抗体P I C - 2 及びモノクローナル抗体P I C - 3 をそれぞれ0.66 mg / ml ずつ含有する水溶液2 ml と、ラテックス溶液（2%、Dow Chemical社：粒径0.482  $\mu$ m）2 ml とを混合し、約1時間攪拌した。以下、前記と同様に処理して、モノクローナル抗体P I C - 1 / モノクローナル抗体P I C - 2 / モノクローナル抗体P I C - 3 / ラテックス複合体を調製した。

モノクローナル抗体P I C - 1 及びモノクローナル抗体P I C - 2 をそれぞれ1 mg / ml ずつ含有する水溶液とラテックス溶液とを等量混合すること以外は前記と同様にして、モノクローナル抗体P I C - 1 / モノクローナル抗体P I C - 2 / ラテックス複合体を調製した。

#### 実施例5 スライド凝集反応による定量

実施例4で調製した抗体ラテックス複合体含有液40  $\mu$ l と種々な濃度のP I C を含有する水溶液40  $\mu$ l とをスライドガラス上で混合し、揺動して3分後に凝集像を目視的に判定した。結果を以下の表2に示す。

表2において、「+」は凝集ありを、そして「-」は凝集なしを各々意味する。また、表2の抗体 / ラテックス複合体の欄において、複合体の種類をその複合体に結合するモノクローナル抗体によって示す。従って、例えばP I C - 1 はモノクロー

ナル抗体PIC-1/ラテックス複合体を意味し、PIC-1 + PIC-2はモノクローナル抗体PIC-1/ラテックス複合体とモノクローナル抗体PIC-2/ラテックス複合体との等量混合液を意味する。更に、PIC-1/PIC-2はモノクローナル抗体PIC-1/モノクローナル抗体PIC-2/ラテックス複合体を意味する。

表 2

モノクローナル抗体 /ラテックス複合体 の種類	PIC濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	256	128	64	32	16	8
	-512	-256	-128	-64	-32	-16
PIC-1	-	-	-	-	-	-
PIC-2	-	-	-	-	-	-
PIC-3	-	-	-	-	-	-
PIC-1+PIC-2	+	+	+	+	+	+
PIC-1/PIC-2	+	+	+	+	+	+
PIC-1+PIC-2 +PIC-3	+	+	+	+	+	+
PIC-1/PIC-2 /PIC-3	+	+	+	+	+	+

表 2 (続き)

モノクローナル抗体 /ラテックス複合体 の種類	PIC濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	4	2	1	1	0.5
	-8	-4	-2	-0.5	-0.25
PIC-1	-	-	-	-	-
PIC-2	-	-	-	-	-
PIC-3	-	-	-	-	-

PIC-1+PIC-2	+	+	+	+	-
PIC-1/PIC-2	+	+	+	+	-
PIC-1+PIC-2					
+PIC-3	+	+	+	+	-
PIC-1/PIC-2					
/PIC-3	+	+	+	+	-

表2において、「+」は凝集ありを、そして「-」は凝集なしを各々意味する。

実施例6：精製PICの添加回収試験

5種の検体（健常人A、健常人B、DIC患者C、DIC患者D及びDIC患者Eから採取した血漿）中のPIC濃度を、実施例5のモノクローナル抗体PIC-1/モノクローナル抗体PIC-2/ラテックス複合体溶液を用いて測定した。次いで、それぞれの検体に精製PIC 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、添加回収試験を行った。測定値は検体を倍々希釈して凝集の消失する希釈倍数から半定量的に測定した。結果は表3に示すように、良好な回収が得られた。

表3

検体	PIC測定量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PIC添加量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	添加後の測定値
A	<1	2	2-4
		4	4-8
		8	8-16
B	<1	2	2-4
		4	4-8

		8	8-16
C	1-2	2	2-4
		4	4-8
		8	8-16
D	4-8	2	4-8
		4	8-16
		8	8-16
E	8-16	2	8-16
		4	8-16
		8	16-32

#### 実施例7：健常人とDIC患者群のPIC値

実施例6で使用したモノクローナル抗体PIC-1/モノクローナル抗体PIC-2/ラテックス複合体溶液を用いて、健常人血漿12検体、DIC患者血漿15検体のPIC量を測定した。結果を図1に示す。健常人群のPIC量は全例 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であった。それに対してDIC患者群は全例 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。

#### 産業上の利用可能性

以上詳細に説明したとおり、本発明によれば、血漿試料の希釈操作を行わなくても、血漿中の遊離プラスミノゲン及び遊離 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターの干渉を受けることなく、患者血漿中のPIC量を特異的に、簡便かつ迅速に、凝集法により測定することができる。これは、本発明によって初めて可能になったものである。従って、本発明はDIC等の診断及び病

理研究に有用な手段を提供するものである。



## 請 求 の 範 囲

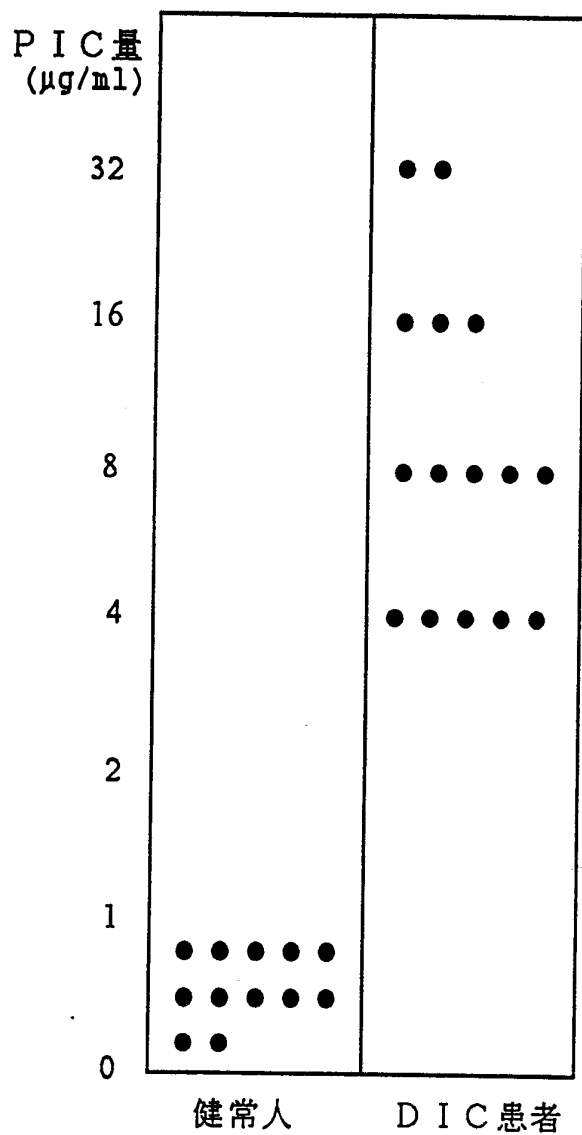
1. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒトプラスミノーゲンと特異的に反応するモノクローナル抗体。
2. ヒトプラスミノーゲンのクリングル2及びクリングル3を含む領域を認識する請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体で免疫した哺乳動物の脾臓細胞と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒトプラスミノーゲンと特異的に反応するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株。
4. 前記のモノクローナル抗体がヒトプラスミノーゲンのクリングル2及びクリングル3を含む領域を認識する、請求項3記載のハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株。
5. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体およびヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターと特異的に反応するモノクローナル抗体。
6. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体で免疫した哺乳動物の脾臓細胞と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターと特異的に反応するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株。
7. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体と

特異的に反応し、ヒトプラスミノゲン及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しないモノクローナル抗体。

8. ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体で免疫した哺乳動物の脾臓細胞と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体と特異的に反応し、ヒトプラスミノゲン及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しないモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株。

9. 不溶性担体に固定化された、請求項1、請求項5及び請求項7記載のモノクローナル抗体少なくとも2種と、被検試料とを接触させ、被検試料における凝集反応を観察することを特徴とする、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体の測定方法。

第 1 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01736

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C12P21/08, C12N5/20, G01N33/577//C12N15/06 (C12P21/08, C12R1:91)		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C12P21/08, C12N5/12-5/28, 15/06-15/08, G01N33/577	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X/A	JP, A, 60-222426 (Teijin Ltd.), November 7, 1985 (07. 11. 85), & JP, A, 61-91200 & EP, A2, 159025 & NO, A, 8501518 & DK, A, 8501704	5, 6, 9/1- 4, 7, 8
X/A	JP, A, 61-213671 (Teijin Ltd.), September 22, 1986 (22. 09. 86), & EP, A2, 169549 & DK, A, 8503399	5, 6, 9/1- 4, 7, 8
A	JP, A, 63-3795 (Teijin Ltd.), January 8, 1988 (08. 01. 88), & EP, A2, 251186 & NO, A, 8702633 & DK, A, 8703216	1-9
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
March 18, 1992 (18. 03. 92)	April 7, 1992 (07. 04. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V.  OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1.  Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

別紙 797°

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING<sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

Claims 1 to 4 and 9 pertain to a monoclonal antibody which specifically reacts with a human plasmin- $\alpha_2$ -plasmin inhibitor complex and a human plasminogen, a hybridoma which secretes the antibody or a cell strain derived therefrom, and an assay of a human plasmin- $\alpha_2$ -plasmin inhibitor complex by using the antibody. Claims 5 and 6 pertain to a monoclonal antibody which specifically reacts with a human plasmin- $\alpha_2$ -plasmin inhibitor complex and a human  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor, and a hybridoma which secretes the antibody or a cell strain derived therefrom. Claims 7 and 8 pertain to a monoclonal antibody which specifically reacts with a human plasmin- $\alpha_2$ -plasmin inhibitor complex but not with a human plasminogen and a human  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor, and a hybridoma which secretes the antibody or a cell strain derived therefrom. Such being the case, these three invention groups cannot be deemed to be one group of inventions wherein they are associated with each other so as to form a single general inventive conception.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP91/01736

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>8</sup> C12P21/08, C12N5/20, G01N33/577/C12N15/06 (C12P21/08, C12R1:91)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12P21/08, C12N5/12-5/28, 15/06-15/08, G01N33/577	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X/A	JP, A, 60-222426 (帝人株式会社), 7. 11月. 1985 (07. 11. 85), &JP, A, 61-91200 & EP, A2, 159025 &NO, A, 8501518 & DK, A, 8501704	5,6,9/1- 4,7,8
X/A	JP, A, 61-213671 (帝人株式会社), 22. 9月. 1986 (22. 09. 86), &EP, A2, 169549 & DK, A, 8503399	5,6,9/1- 4,7,8
A	JP, A, 63-3795 (帝人株式会社), 8. 1月. 1988 (08. 01. 88), &EP, A2, 251186 & NO, A, 8702633 &DK, A, 8703216	1-9
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	18. 03. 92	国際調査報告の発送日 07.04.92
国際調査機関	日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 内田俊生
		4B 8214

第2ページから続く情報

V.  一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI.  発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

**請求の範囲 1-4, 9は、ヒトプラスミン-α、-βプラスミンインヒビター複合体及びヒトプラスミノゲンと特異的に反応するモノクローナル抗体、それを分泌するハイブリドーマ又はそれに由来**

1.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3.  追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4.  追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。



( VI欄の続き )

する細胞株、並びに同モノクローナル抗体を使用するヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体の測定方法に関するものであり、請求の範囲 5, 6 は、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターと特異的に反応するモノクローナル抗体、並びにそれを分泌するハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株に関するものであり、請求の範囲 7, 8 は、ヒトプラスミン- $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター複合体と特異的に反応し、ヒトプラスミノゲン及びヒト $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとは反応しないモノクローナル抗体、並びにそれを分泌するハイブリドーマ又はそれに由来する細胞株に関するものである。そして、これら 3 つの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように迷関している一群の発明であるとは認められない。