



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ³ C07G 7/00, C12P 21/00 A61K 39/395 // (C12P 21/00 C12R 1/91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 85/ 02188 (43) 国際公開日 1985年5月23日 (23. 05. 85)																												
<table border="0"> <tr> <td>(21) 国際出願番号</td> <td>PCT/JP84/00120</td> </tr> <tr> <td>(22) 国際出願日</td> <td>1984年3月23日 (23. 03. 84)</td> </tr> <tr> <td>(31) 優先権主張番号</td> <td>特願昭58-210381</td> </tr> <tr> <td>(32) 優先日</td> <td>1983年11月9日 (09. 11. 83)</td> </tr> <tr> <td>(33) 優先権主張国</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>(71) 出願人; および</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(72) 発明者</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">高橋利志 (TAKAHASHI, Toshitada) [JP/JP] 〒458 愛知県名古屋市緑区鳴海町白山68 Aichi, (JP)</td> </tr> <tr> <td>(72) 発明者; および</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">(75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">上田龍三 (UEDA, Ryuzo) [JP/JP] 〒465 愛知県名古屋市名東区猪高町大字上社字平池145 Aichi, (JP)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">太田和雄 (OHTA, Kazuo) [JP/JP] 〒464 愛知県名古屋市千種区橋本町1丁目50番地 Aichi, (JP)</td> </tr> <tr> <td>(81) 指定国</td> <td>DE, GB, US.</td> </tr> <tr> <td>添付公開書類</td> <td>国際調査報告書</td> </tr> </table>			(21) 国際出願番号	PCT/JP84/00120	(22) 国際出願日	1984年3月23日 (23. 03. 84)	(31) 優先権主張番号	特願昭58-210381	(32) 優先日	1983年11月9日 (09. 11. 83)	(33) 優先権主張国	JP	(71) 出願人; および		(72) 発明者		高橋利志 (TAKAHASHI, Toshitada) [JP/JP] 〒458 愛知県名古屋市緑区鳴海町白山68 Aichi, (JP)		(72) 発明者; および		(75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ)		上田龍三 (UEDA, Ryuzo) [JP/JP] 〒465 愛知県名古屋市名東区猪高町大字上社字平池145 Aichi, (JP)		太田和雄 (OHTA, Kazuo) [JP/JP] 〒464 愛知県名古屋市千種区橋本町1丁目50番地 Aichi, (JP)		(81) 指定国	DE, GB, US.	添付公開書類	国際調査報告書
(21) 国際出願番号	PCT/JP84/00120																													
(22) 国際出願日	1984年3月23日 (23. 03. 84)																													
(31) 優先権主張番号	特願昭58-210381																													
(32) 優先日	1983年11月9日 (09. 11. 83)																													
(33) 優先権主張国	JP																													
(71) 出願人; および																														
(72) 発明者																														
高橋利志 (TAKAHASHI, Toshitada) [JP/JP] 〒458 愛知県名古屋市緑区鳴海町白山68 Aichi, (JP)																														
(72) 発明者; および																														
(75) 発明者/ 出願人 (米国についてのみ)																														
上田龍三 (UEDA, Ryuzo) [JP/JP] 〒465 愛知県名古屋市名東区猪高町大字上社字平池145 Aichi, (JP)																														
太田和雄 (OHTA, Kazuo) [JP/JP] 〒464 愛知県名古屋市千種区橋本町1丁目50番地 Aichi, (JP)																														
(81) 指定国	DE, GB, US.																													
添付公開書類	国際調査報告書																													
(54) Title: NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY (54) 発明の名称 新規モノクローナル抗体 (57) Abstract Monoclonal antibody for detecting human leukocyte antigen such as T cell differentiation antigen, T cell subset antigen, or antigen present in T cells and other leukocytes, and a process for producing this monoclonal antibody from a culture liquor of hybridoma capable of yielding monoclonal antibody for human leukocyte cell antigen. This monoclonal antibody is produced by culturing hybridoma obtained, for example, by cell fusion of ATL V-yielding strain-immunized mouse spleen cell and mouse myeloma cell. The antibody detecting T cell differentiation antigen can be used for diagnosing T cell tumor. (57) 要約 T細胞分化抗原、T細胞サブセット抗原、T細胞と他の白血球に存在する抗原等のヒト白血球抗原を検出するモノクローナル抗体、及びヒト白血球細胞抗原に対するモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマの培養液からのこのモノクローナル抗体の製造方法。 このモノクローナル抗体は、例えばマウスをATLV産生株で免疫したマウス脾細胞とマウスミエローマ細胞とを融合させてえたハイブリドーマを培養することにより製造される。 T細胞分化抗原を検出する抗体はT細胞腫瘍の鑑別診断に使用できる。																														

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	FR	フランス	ML	マリ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MW	マラウイ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NL	オランダ
BR	ブラジル	IT	イタリア	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	JP	日本	RO	ルーマニア
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SD	スーダン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SE	スウェーデン
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CM	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソビエト連邦
DE	西ドイツ	LU	ルクセンブルグ	TD	チャード
DK	デンマーク	MC	モナコ	TG	トーゴ
FI	フィンランド	MG	マダガスカル	US	米国

- 1 -

明 細 書

新規モノクローナル抗体

技 術 分 野

本発明はヒト白血球に存在する抗原を検出するモノクローナル抗体およびその製造法に関する。

背 景 技 術

ヒトリンパ球T細胞，B細胞および各々のサブセットに対するモノクローナル抗体が最近の細胞工学の手法を用いることにより作製可能となり、各々の細胞群が次第に明確になってきた〔Reinherz, E. L. et al : Cell 19, 821 (1980), Foon, K.A. et al : Blood 60, 1 (1982)〕。

即ち、これらサブセットを認識するモノクローナル抗体を用いることにより、ヒトリンパ球の機能的細胞亜群がより明確となり、各種疾患におけるこれらの異常が明らかにされつつある。

発 明 の 開 示

本発明者らは、各種造血器疾患の診断等に使用できるモノクローナル抗体を見出すべく研究を重ねた結果、白血球に存在する抗原および成人T細胞白血病（以下ATLと略記する）に対するモノクローナル抗体を見出し、本発明を完成するに至った。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、白血球に存在する抗原およびATLウィルス（以下ATLVと略記する）に対するモノクローナル抗体を提供する。

本発明のモノクローナル抗体は、具体的には、Tp w 40, Tp 120, Ta 60 a, Ta 60 b, Ta 60 c, Ts 60, Tsw 32, Ts A, Ts B, Ts 145, Lp 95, Ls 70, Ls A, ATV 19 a, ATV 19 bと命名されたものがあげられる。

Ta 60 a, Ta 60 bおよびTa 60 cは正常人末梢血T細胞分



- 2 -

画，非T（B）細胞分画，単球，顆粒球，胸腺細胞などの正常血液細胞とは反応せず、T細胞群をインターロイキン-2〔IL-2，バイオテスト社（西独）〕，フィトヘマグルチニン〔PHA，ディフコ社（米国）〕，コンカナバリンA〔ConA，E.T.社（米国）〕，ポークウィードマイトジェン〔PWM，ギブコ社（米国）〕などのマイトジェンやアロB細胞などで刺激することにより得られたいわゆる活性化T細胞に反応することを特徴としている（実施例8参照）。すなわち、対照としてマイトジェンを含まない培養液のみの培養条件では発現してこないことを特徴としている。

本発明のモノクローナル抗体のうちTa60a，Ta60bは、固型腫瘍由来の細胞とは反応しない造血器腫瘍細胞に対しては、T細胞由来のうちでもATLの全例に陽性を示し、ATL以外のT細胞由来悪性疾患に関してほとんど全ての症例で陰性である。このことは臨床上鑑別困難な症例群を明確に区別するために本発明のモノクローナル抗体が使用できることを示している。

また本発明のモノクローナル抗体は、T細胞由来以外の腫瘍細胞として、B-CLL（B細胞性慢性リンパ性白血病）やB-ML（B細胞性悪性リンパ腫）の一部症例に弱陽性に反応し、骨髄性細胞由来のAML（急性骨髄性白血病）の一部症例にも弱陽性に反応することも特徴としている。

Tpw40およびTp120は、末梢血リンパ球T細胞分画の大部分の細胞と反応し、いわゆるT細胞（panT）抗原を検出する。

Ts60，Tsw32，TsA，TsBおよびTs145の5抗体は、T細胞分画の一部分の細胞に存在する抗原，T亜分画（サブセット）抗原を検出する。Ts60は、Ta60と同じ抗原分子量を示すが、血清学的特異性は異なり、活性化T細胞とは反応せず、T細胞株の一部とのみ反応を示す。

Lp95は、全ての白血球細胞と反応を示す白血球（Pan leukocyte）



- 3 -

抗原を検出し、一方L s 7 0およびL s Aは、単球およびその他の白血球細胞の一部と反応を示し、白血球亜分画 (leukocyte subset) 抗原を認識する。

T p w 4 0, T p 1 2 0は、ともにp a n T抗原を検出しているが、T p w 4 0は、T細胞腫瘍のうち比較的未熟なT細胞型急性リンパ性白血病 (T - A L L) およびリンパ芽球腫 (L L) に反応を示し、一方T p 1 2 0は、成熟型T細胞腫であるT₂リンパ腫およびA T Lに反応を示す。また、T p 1 2 0はB細胞型慢性リンパ性白血病 (B - C L L) にも反応を示す。(第6表)

T s w 3 2は、T - A L LおよびL Lに反応を示し、T s Aはこの両T細胞腫瘍とともにT₂リンパ腫, A T L等の成熟型T細胞腫とも反応を示した。

T s Bは、成熟型T細胞腫であるT₂リンパ腫, A T Lに高率に反応した。T s Bは、B - C L Lとも反応を示した。

これら、T細胞分化抗原を検出する抗体は、T細胞腫瘍の鑑別診断に有用である。

T s 1 4 5は、末梢リンパ球にはほとんど反応を示さず、I L - 2存在下で長期培養されているT細胞株に特異的に反応を示すという特徴を持つ。

L p 9 5は、白血球の大部分と反応を示し、また、ほぼ全ての白血病およびリンパ腫とも反応を示す。

L s 7 0は、単球および他の白血球の一部に存在し、T細胞リンパ腫中T₂リンパ腫およびA T Lに反応し、またB - C L Lとも反応する。

L s Aは、単球およびT細胞と主に反応し、T細胞リンパ腫とはまったく反応を示さない。また、単球性白血病には高率に反応を示す。

A T V 1 9 aおよびA T V 1 9 b抗体は、A T L V構成蛋白中のP 1 9成分に対するモノクローナル抗体であり、M T - 1, M T - 2な



- 4 -

どの A T L 由来の培養株ならびに A T L 白血病細胞の I L - 2 存在下の短期培養した細胞にも存在する抗原を検出することを特徴とする。

A T V 1 9 a および A T V 1 9 b は、ウィルスの粒子構成蛋白で、分子量 19×10^3 のペプチドを認識しており、A T L の診断に有用である。

本発明モノクローナル抗体の生物学的活性は実施例 6 ~ 1 3 に示した。実施例中に用いたマウス混合血球吸着試験 [Mouse - mixed hemadsorption assay , M - M H A] 法は下記の方法に従い、マイクロプレート [Falcon 社 , 3 0 4 0] に単層細胞培養または浮遊細胞を付着させた標的細胞への指示細胞の付着の有無で観察する。指示細胞としては、ヒツジ赤血球とマウス抗ヒツジ赤血球抗体を反応させた後、さらに家兎抗マウスイムノグロブリン血清を反応させたものを用いる。

マウス混合血球吸着試験 [M - M H A] :

M - M H A は Espmark と Fagreu s の原法 (Acta . Pathol . Microbiol . Scand . Suppl . 154 258-262 , 1962) を改良して行う。

指示赤血球の作製法は以下の通りである。

洗滌羊赤血球 2 % 浮遊液と等量の 1 , 0 0 0 倍希釈マウス抗羊赤血球抗体 (B A L B / c マウスに羊赤血球を過免疫して作製) とを 2 4 ℃ にて 4 5 分間反応させ洗滌後再び 2 % 浮遊液として等量の 2 0 0 倍希釈家兎抗マウスイムノグロブリン (C a p p e l 社 , 米国) を 2 4 ℃ にて 4 5 分間反応させた後、2 回洗滌後再び 2 % 浮遊液としたものを、いわゆる M - M H A の指示赤血球として用いる。

M - M H A 検査法の手法としては、被検索細胞は、ハイブリドーマ細胞、培養上清またはハイブリドーマ細胞接種 B A L B / c マウスもしくは B A L B / c 由来ヌードマウス腹水と 2 4 ℃ にて 4 5 分間反応させ、抗体を洗滌除去後、0 . 2 % 指示羊赤血球と 2 4 ℃ にて 4 5 分間反応させ、軽く一度リン酸緩衝液生理食塩水 (P B S) で洗滌後光学顕微鏡下、指示赤血球のロゼット形成の有無にて判定する。



- 5 -

また実施例中において用いた間接蛍光抗体法〔細胞質蛍光抗体法 (Cy-IF) または膜蛍光抗体法 (M-IF) は下記方法で行った。

細胞質蛍光抗体法：

1～5×10⁴ の標的細胞を、スライドガラス上に95%アセトンで10分間固定し、-70℃に保存しておいたものを標的細胞として用いる。

第1次抗体として、ハイブリドーマ細胞培養上清またはハイブリドーマ細胞接種BALB/cマウスもしくはBALB/c由来ヌードマウス腹水25μlを用いて4℃または25℃にて30分間反応させる。PBSで洗滌後2次抗体として、20～40倍希釈蛍光標識家兎マウスイムノグロブリンGAM (GAM-FITC, コール・ター社, 米国) を25℃にて30分間反応させる。反応は蛍光顕微鏡下で蛍光の有無にて判定する。

膜蛍光抗体法：

5×10⁵ 個/mlの標的細胞50μlと、第1次抗体としてハイブリドーマ細胞培養上清またはハイブリドーマ細胞接種BALB/cマウスもしくはBALB/c由来ヌードマウス腹水50μlとを用いて、4℃または25℃にて30分間反応させる。PBSで洗滌後、2次抗体として20～40倍希釈蛍光標識家兎マウスイムノグロブリンGAM (GAM-FITC, コール・ター社, 米国) を25℃にて30分間反応させる。反応は蛍光顕微鏡下で蛍光の有無にて判定する。

本発明のモノクローナル抗体はマウスをATL細胞, ATL V産性株MT-2細胞またはMT-2より分離したATLウィルス (ATL V), 混合培養リンパ球, プロテインA (PA) 活性化リンパ球などで免疫し、脾細胞を取り出し、これとマウスミエローマ細胞とを融合して得たハイブリドーマを培養することによって製造することができる。

このハイブリドーマ製造に際しては Kohler と Milstein の方法



- 6 -

[Nature 256, 495-497 (1975)] を改良した Ueda らの方法
[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5122-5126 (1981)] に従って
行えばよい。

免疫用マウスとしては、BALB/c 系マウス、BALB/c 系マウスと他系マウスとの F1 マウスなどが用いられる。

免疫はマウス 1 匹 (4~8 週令, 20~30 g) に対して細胞 $10^{7\sim8}$ 個またはウィルス 50~500 μ g を用いて 2~5 週間ごとに 2~3 回行う。マウスの飼育および、脾細胞の採取は常法に従う。

ミエローマ細胞としては、MOPC-21 NS/1 [Nature, 256, 495-497 (1975)]、SP2/0-Ag14 [Nature, 277, 131-133 (1979)]、S194/5、XXO.BU.1 [J. Exp. Med. 148, 313-328 (1978)] などが用いられる。脾細胞とミエローマ細胞は 1 対 1~10 対 1 の割合で混合し、融合は、NaCl (約 0.85%)、ジメチルスルホキシド [10~20% (V/V)] および分子量 1,000~6,000 のポリエチレングリコールを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2~7.4) 中で行う。

融合は両細胞を 35~37℃ で 1~3 分間インキュベートすることによって行う。

融合細胞 (ハイブリドーマ) の選択は、ヒポキサンチン (1.3~1.4 mg/dl), アミノプテリン (18~20 μ g/dl), チミジン (375~400 μ g/dl), ストレプトマイシン (50~100 μ g/ml), ペニシリン (50~100 単位), グルタミン (3.5~4.0 g/l), 牛胎児血清 (10~20%) を含む基礎培地を用い、生育してくる細胞として選択する。

基礎培地としては、動物細胞の培養に一般に使用されている RPMI 1640 培地, Eagle の MEM 培地などが用いられる。

融合細胞 (ハイブリドーマ) のクローン化は限界希釈法にて少なくとも 3 回繰返して行う。



- 7 -

ハイブリドーマを通常の動物細胞の培養と同様にして培養すれば、培地中に本発明の抗体が生産される。例えば $2 \sim 5 \times 10^6$ のハイブリドーマ細胞をストレプトマイシン ($50 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$)、ペニシリン ($50 \sim 100$ 単位/ ml)、グルタミン ($3.5 \sim 4.0 \text{ g}/\ell$)、牛胎児血清 ($10 \sim 20\%$) を含む RPMI 1640 培地 $10 \sim 20 \text{ ml}$ を用い、フラスコ内で $95\% \text{ CO}_2 - 5\% \text{ O}_2$ 存在下、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ で、 $3 \sim 7$ 日間培養することによって培養液中に抗体が分泌、蓄積される。

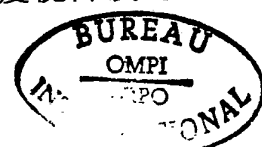
またハイブリドーマ細胞をプリスタン (Pristane) 処理のヌードマウスまたは BALB/c マウスの腹腔内に移植して増殖することにより腹水中に本発明の抗体を蓄積させることができる。すなわち、これらのマウス腹腔内にプリスタン (Pristane, 2, 6, 10, 14 tetramethyl pentadecane, 米国アルドリッチ社製) $0.5 \sim 1 \text{ ml}$ 注射し、その後 $2 \sim 3$ 週目に腹腔に $5 \sim 10 \times 10^6$ 個のハイブリドーマ細胞を移植する。通常 $7 \sim 10$ 日後に腹水が貯溜し、これを採取する。

本発明においては、ATL 由来細胞株 MT-2 を免疫原として用いてモノクローナル抗体 Ta60b, Ta60c および Ts60 を得、ATLV を免疫原として用いてモノクローナル抗体 Ta60a, ATV19a および ATV19b を得た。

ATL 細胞を免疫原として TsA を得、混合リンパ球培養細胞を免疫原として Tpw40, Tp120, Tsw32, Lp95, Ls70, LsA を得、PA 活性化リンパ球を免疫原として TsB および Ts145 を得た。

これらモノクローナル抗体の抗原特異性は実施例 6～13 に示した方法により確認した。

本発明のモノクローナル抗体の抗体クラスは、Tp120 および Lp95 が IgG2a, TsA が IgM で、他はすべて IgG1 に分類される。また [^3H] - グルコサミン 標識による下記免疫沈降反応



- 8 -

による分子量測定では、T a 6 0 a , T a 6 0 b , T a 6 0 c および T s 6 0 抗原は M T - 2 または M T - 1 細胞において 60,000 ダルトン (g p 6 0 M T - 2) を示し、H U T 1 0 2 細胞においては 53,000 ダルトン (g p 5 3 H U T 1 0 2) であり、これら 4 抗原はほぼ同一分子量を示した。

また、T p 1 2 0 抗原は、H U T 1 0 2 細胞においては 120,000 ダルトンであった。また ^{125}I 標識による免疫沈降反応による分子量測定では、T s 1 4 5 抗原および L s 7 0 抗原は N K 3.3 細胞においてそれぞれ 145,000 ダルトン、70,000 ダルトンであった。

^{35}S メチオニン標識による分子量測定では、L p 9 5 抗原は、H U T 1 0 2 細胞において 95,000 ダルトンを示した。

イムノブロッティング法による分子量測定では、A T V 1 9 a および A T V 1 9 b は、ともに A T L V の 19,000 ダルトンのウィルス粒子構成成分と同じ分子量を示した。

他の 5 つの抗原 (T p w 4 0 , T s w 3 2 , T s A , T s B , L s A) の分子量は、現在のところ不明である。

免疫沈降反応：

標的細胞 (M T - 2 , M T - 1 および H U T 1 0 2) は $[^3\text{H}]$ - グルコサミンを用いて標識する。15 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H - グルコサミン (38 Curies/mmol, Amersham 米国) を含んだ R P M I 1 6 4 0 培養液 (日水製薬社製) にて 35 ~ 40 時間培養して標識する。

標的細胞 H U T 1 0 2 は ^{35}S メチオニンを用いて標識した 500 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{35}S メチオニンを含んだ R P M I 1 6 4 0 培養液にて 8 時間培養して標識する。また N K 3.3 標的細胞は、 5×10^7 細胞を 200 μg のアイオドゲン存在下で 0.5 mCi の $\text{Na } ^{125}\text{I}$ で標識する。

これら標識した細胞を 0.1 ~ 1 % (v / v) N P - 4 0 を用いて可溶化し、その細胞抽出物 (1 ~ 10 $\times 10^5$ c p m) をモノクローナル抗体 (1 ~ 10 μl) と 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 6 ~ 12 時間反応させ、第 2 次抗



- 9 -

体として5～20 μ lの家兎抗マウスイムノグロブリン (Cappel 社、米国) と4℃で30分間反応させ、さらに4℃で1時間スタフィロコッカス・アウレウス (Cowan I 株) と反応させ免疫沈降物を作製し、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により解析する。

イムノブロッティング法 (Towin, H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979) :

ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法により展開し、ニトロセルロース膜に各ペプチドを転移させ、その後モノクローナル抗体と反応させ、さらに2次抗体である 131 I 標識抗マウス免疫グロブリン抗体と反応せしめ、その後、フルオログラフィーで観察する。

なお、本発明のモノクローナル抗体は、昭和58年9月25日発行の日本癌学会第42回総会記事〔日本癌学会発行〕100頁の290番およびシンポジウムVI23の2番に記載があり、該記事中、TA-53c, TA-53b, TA-53a, TS-53, ATV-W26aおよびATV-W26bは、それぞれ本明細書におけるTa60a, Ta60b, Ta60c, Ts60, ATV19aおよびATV19bに相当する。また昭和58年11月10日発行の日本免疫学会要旨集で発表のあったTP-W40, LP-94, TP-W67およびTP-120はそれぞれ本明細書におけるTpW40, Lp95, TSAおよびTp120に相当する。

発明を実施するための最良の形態

実施例1.

Ta60a, Ta60c, ATV19aおよびATV19bモノクローナル抗体の製造:

ATL由来培養株MT-2 [Gann 71, 155 (1980)] の培養上清より採取分離した [Yoshida, H. et al : Primary and tertiary structure of nucleic acids and cancer research, M. Miwa et al. (EDS, Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp 255-294, 1982)] ウィル



- 10 -

ス粒子蛋白分画を免疫原として用いた。

上記蛋白分画（蛋白量 0.45 mg）を免疫直前瞬時にドライアイス含有エチルアルコール中にて凍結し、再び 37℃ 恒温槽にて融解せしめる凍結融解過程を 6 回行った後、完全フロイントアジュバント 0.02 ml と混合し、BALB/c マウス（8 週令，24 g）〔Charles River, Inc., Atsugi, Japan より購入〕1 匹の背面に皮下接種することにより免疫した。この免疫を 4 週ごとに 4 回行い、最終免疫 4 日目にマウスを殺し、脾臓を摘出し、常法により浮遊細胞を得た。

この脾臓浮遊細胞 10^8 個と、マウスミエローマ MOPC-21NS / 1 細胞 2×10^7 個とを、42% (W/V) ポリエチレングライコール (M. W. 4,000, Koch-Light, Bucks, 英国) および 15% (V/V) ジメチルスルホキシド (Merck, Darmstadt, 西独) をふくむリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 0.2 ml 中で Ueda らの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5122-5126 (1981)〕に従って融合させた。

融合細胞は、HAT 培地〔ヒポキサンチン 1.36 mg/dl, アミノプテリン 19.1 μ g/dl, チミジン 387 μ g/dl, ストレプトマイシン 100 μ g/ml, ペニシリン 100 単位/ml, グルタミン 2 mM および牛胎児血清 10% を含む RPMI 1640 培地 (pH 7.2)〕を用いて常法〔前記 Ueda らの方法〕に従い選択した。

得られた融合細胞 3 個を限界希釈法を 3 回繰返すことによりクローン化した。得られたクローン (3 個) を、下記の方法で培養して、ATL 関連抗原に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を著量生産する株を得た。すなわち、 5×10^6 のハイブリドーマ細胞をストレプトマイシン 100 μ g/ml, ペニシリン 100 単位/ml, グルタミン 3.8 g/l, 牛胎児血清 10% を含む RPMI 1640 培地 15 ml を用い、150 cm² のフラスコ内で 95% CO₂ - 5% O₂ の存在下、37℃ で 7 日間培養した。

得られた細胞株 Ta60a, Ta60c, ATV19a および AT



- 11 -

V 1 9 b が生産するモノクローナル抗体をそれぞれ T a 6 0 a , T a 6 0 c , A T V 1 9 a および A T V 1 9 b とした。

この細胞株をマウスの腹腔内に投与する下記の方法で培養すると T a 6 0 a , T a 6 0 c , A T V 1 9 a および A T V 1 9 b がそれぞれ 3 ~ 1 0 mg / ℓ 生成した。すなわちマウス腹腔内にプリスタン 0.5 ml 注射し、その後 3 週目の腹腔に 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞を移植し、10 日後に腹水を採取した。

実施例 2 .

T a 6 0 b および T s 6 0 モノクローナル抗体の製造 :

A T L 由来培養株 M T - 2 [Miyoshi et al : Gann 71, 155 (1980)] を 10^7 個マウス皮下に初回免疫し、その 3 週後に 2 回目の免疫を同様にを行い、さらに 3 回目の免疫を 10^7 個腹腔内に注射した。その後 4 日目に、免疫マウスを殺し、脾臓細胞を採取し、細胞融合を行った。以下は実施例 1 と同様に行い、T a 6 0 b および T s 6 0 モノクローナル抗体を得た。

実施例 3 .

T s A モノクローナル抗体の製造 :

A T L 患者末梢血より分離した A T L 細胞を 10^7 個、マウス皮下に初回免疫し、その 3 週後に 2 回目の免疫を同様にを行い、さらに 3 回目の免疫を 10^7 個腹腔内に注射した。その後 4 日目に免疫マウスを殺し、脾臓細胞を採取し細胞融合を行った。以下は実施例 1 と同様に行い、T s A モノクローナル抗体を得た。

実施例 4 .

T p w 4 0 , T p 1 2 0 , T s w 3 2 , L p 9 5 , L s 7 0 および L s A モノクローナル抗体の製造 :

混合培養 4 日目のリンパ球を採取し、洗滌後 5×10^6 個の細胞をマウス皮下に初回免疫し、その 3 週間後に 2 回目の免疫を同様にを行い、さらに 3 回目の免疫を 10^7 個腹腔内に注射した。その後 4 日目に免



- 12 -

疫マウスを殺し、脾臓細胞を採取し細胞融合を行った。以下は実施例 1 と同様に行い、標記モノクローナル抗体を得た。

実施例 5 .

T s B および T s 1 4 5 モノクローナル抗体の製造 :

プロテイン A (P A) $10 \mu g / ml$ の存在下で、末梢血リンパ球を 3 日間培養後、活性化リンパ球を採取し、洗滌後 5×10^6 個の細胞をマウス皮下に初回免疫し、その 3 週後に 2 回目の免疫を同様に行い、さらに 3 回目の免疫を 10^7 個腹腔内に注射した。その後 4 日目に免疫マウスを殺し、脾臓細胞を採取し、細胞融合を行った。以下は実施例 1 と同様に行い、T s B および T s 1 4 5 モノクローナル抗体を得た。

実施例 6 .

モノクローナル抗体 T a 6 0 a , T a 6 0 b , T s 6 0 および A T V 1 9 a の各種培養株細胞ならびにヒト正常血液細胞成分に対する反応性 :

細胞表面抗原と標記モノクローナル抗体との反応を調べる為に、マウス混合血球吸着試験 [M - M H A] [前記] および細胞質内抗原と抗体との反応を検索する目的での間接蛍光抗体法 [前記] を行った。結果を第 1 表に示す。



- 13 -

第 1 表

細胞表面抗原 (M-MHA 検査法) 細胞質内抗原 (Cy-IF-検査法)[#]

	Ta60a	Ta60b	Ts60	ATV19a	Ta60a	Ta60b	Ts60	ATV19a
ATL 関連								
MT-2	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
MT-1	+++	+++	-	-	+++ *	+++	±	+++ *
HUT102	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
HUT78	-	-	+++	-	-	-	+++	-
ATN-1	+++	+++	-	-	+++	+++	±	+++
T 細胞								
RPMI8402	-	-	-	-	-	-	-	-
HPB-ALL	-	-	-	-	-	-	-	-
MOLT-3	-	-	-	-	-	-	-	-
Jurkat	-	-	+++	-	-	-	-	-
IL-2依存								
NK3.3	+++	+++	-	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B 細胞								
Daudi	-	-	-	-	-	-	-	-
Raji	++	++	-	-	-	-	-	-
RPMI1788	++	++	-	-	±	-	-	-
RPMI8226	-	-	-	-	-	-	-	-
固型腫瘍								
SK-MEL-37	-	-	-	-	-	-	++	-
SK-MEL-33	-	-	-	-	-	-	-	-
正常造血器細胞								
胸腺細胞	-	-	-	-	-	-	-	-
末梢白血球	-	-	-	-	-	-	-	-
単球	-	-	-	-	-	-	-	-
顆粒球	-	-	-	-	-	-	-	-
骨髓細胞	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : $> 10^7$, ++ : $> 10^5$, + : $> 10^3$, #+++ : $> 10^4$
 ± : 10^2 , * positive cells : 1-5X

この結果、Ta60a, Ta60bは同一反応性を示し、これら両抗原は特にT細胞由来株のうちATLVまたHTLVに関係ある(ATL-関連)細胞に存在するのみで他のT細胞には存在しておらず、RPMI8402, HPB-ALL, MOLT-3, JurkatおよびIL-2依存性のNK3.3株細胞には陰性であった。但し、B細胞株に対しては、M-MHAでRaji, RPMI1788の2細胞



- 14 -

株に陽性であった。固型腫瘍細胞由来株は第1表に示したメラノーマ株 (SK-MEL-37, SK-MEL-33) ならびに、肺癌, 腎癌, 胃癌, 脳腫瘍株などはすべて陰性であった。正常血液細胞に関しては、胸腺, 末梢白血球, 単球, 顆粒球, 骨髓細胞を含めてすべて陰性であった。

Ts60は、ATL関連細胞 (MT-2, HUT102, HUT78) に存在するほかは、例外的にT細胞由来のJurkat細胞に存在したのみで、他の培養株細胞, 正常細胞には存在していない。興味あることに、細胞質内抗原に対する蛍光抗体法による結果からは、Jurkatは陰性で、固型腫瘍のSK-MEL-37に陽性であり、細胞膜抗原と存在の様式を異にしている。

ATV19aは、細胞質内抗原で、ATL-関連細胞であるMT-2, MT-1, HUT102およびATN-1に存在するが、他の細胞にはすべて陰性であった。

実施例7.

Ta60b, Ts60抗体の各種細胞に対する抗体価の比較 (MHA法による) :

TA60bの抗体価を50%陽性値で比較すると、MT-2, HUT102, MT-1, RPMI1788, Rajiの順で、HUT78, Jurkatは陰性であった。

MT-2, HUT102 : $10^{7\sim8}$

MT-1 : 10^7

RPMI1788, Raji : 10^6

Ts60は、MT-2, HUT78, Jurkat, HUT102に陽性で、MT-1, RPMI1788, Rajiには陰性であった。

MT-2 : $10^{7\sim8}$

HUT78, Jurkat, HUT102 : 10^6

MT-1, RPMI1788, Raji : 陰性



- 15 -

実施例 8 .

本発明モノクローナル抗体の正常血液細胞に対する反応性 (M-MHA 法による) :

第 2 表に示すごとく Ta 6 0 a , Ta 6 0 b は、ともに無処理の末梢血液成分には全く反応しないが、下記のマイトジェンを含有する培養液で培養するとこれら両抗原が陽性となる。

I) IL - 2 10~25% (Biotest 社, 西独)

II) フィトヘムアグルチニン (PHA) 20~50 μ g/ml (GIBCO 社)

III) コンカナバリン A (ConA) 20~25 μ g/ml (GIBCO 社) 一方、

Ts 6 0 は、いかなる条件下でも陰性であった。

第 2 表

M-MHA 検査法

細胞群	試験 症例数	陽性症例数		Ts60
		Ta60a	Ta60b	
末梢白血球				
新鮮	12	0	0	0
新培養対照*	10	0	0	0
IL-2	7	6	6	0
PHA	5	5	5	0
ConA	5	5	5	0
単球				
新鮮	3	0	0	ND
顆粒新球				
新鮮	2	0	0	0
胸腺細胞				
新鮮	6	0	0	0
新培養対照	3	0	0	0
骨髓細胞				
新鮮	1	0	0	0
脾細胞				
新鮮	2	0	0	0

* 10% FCS 含有 RPMI 1640



- 16 -

実施例 9 .

本発明モノクローナル抗体の造血器腫瘍細胞に対する反応性 (M-MHA 法) :

造血器腫瘍 79 症例検索の結果を第 3 表に示す。

第 3 表

M-MHA 検査法

細胞群	試験 症例数	陽性症例数		
		Ta60a	Ta60b	Ts60
ATL :				
新培 鮮養*	16* ¹	10(5)	8(8)	0
T-CLL :	14	9(5)	7(7)	0
新培 鮮養*				
T-CLL :	1* ²	1	0(1)	ND
T-ALL :				
新培 鮮養*	7	0	0	0
T-ML :				
新培 鮮養*	12	0	0(1)	0
B-CLL :	2	0	0	0
新培 鮮養*				
B-CLL :	9	0(4)	0(3)	0
新培 鮮養*	5	0(2)	0(2)	0
B-ML :				
新培 鮮養*	10	0(4)	3(1)	0
Null-ALL :				
新培 鮮養*	11	1	1(1)	0
AML :				
新培 鮮養*	4	2	2	0
AMOL :				
新培 鮮養*	6	0	0	0
CML-BC :				
新培 鮮養*	3	0(1)	1(1)	ND

* 10% FCS 含有 RPMI 1640

第 3 表中カッコで示した抗体価 10^5 以下の弱陽性例を含めると、Ta60a, Ta60b 両抗体とも ATL 症例全例に陽性で、他の T 細胞由来症例には全て陰性であった。T-CLL の 1 例が陽性であるが、この症例は既にプロバイラル (proviral) DNA を有しており、臨床診断は T-CLL であるが、ATL とも考えられる。即ち、この両抗原は ATL と鑑別診断上問題となる T 由来細胞の悪性造血器疾患



- 17 -

に陰性であり、これら抗体は診断上有用である。なお、これらの抗体は、B細胞由来のB-CLL, B-ML (B細胞悪性リンパ腫)の一部症例とも反応し、また骨髄性白血病 (AMC) の一部症例にも弱陽性ながら反応を示した。

一方、Ts 60はすべての造血器疾患に陰性であった。

実施例 10.

本発明モノクローナル抗体のIL-2依存性細胞に対する反応性:

IL-2依存細胞株であるクローン化T細胞4E8 [ツベルクリン陽性健常者の末梢血とPPD (結核菌細胞膜抗原の一種) 抗原とを試験管内で反応させ、長期培養したT細胞株] を96穴平底培養用プレート [Falcon 社製] に、各ウェル宛 2×10^4 / 0.2 ml 培養液 (10% FCS 含有 RPMI 1640 培地) で播き、室温で30分間各種濃度の抗体で反応させた。

その後IL-2を最終濃度5% (V/V) になるように加えて5% CO₂ - 95% O₂, 37℃で72時間培養後、0.4 μ Ci の ³H-メチル-チミジンの4時間の取り込みを見て、IL-2依存性細胞増殖阻止を観察した。

その結果、Ta 60aは 10^{-2} ~ 10^{-4} 濃度まで75%~95%の阻止率を、またTa 60bは 10^{-2} ~ 10^{-4} まで60%以上の阻止率を示した。一方Ts 60は、なんら細胞増殖阻止効果を有していなかった。

実施例 11.

本発明モノクローナル抗体ATV19aの正常および悪性造血器細胞に対する反応性 (M-MHA法による) を調べた結果を第4表に示す。



- 18 -

第 4 表

細胞群	M - I F 検査法	
	試験症例数	陽性症例数
A T L :		
新培養対照*	20	0
I L - 2	9	7
I L - 2	9	7
T - C L L :		
新培養対照	1	0
I L - 2	1	0
I L - 2	1	0
T-cell lymphoma:		
新培養対照	5	0
I L - 2	3	0
I L - 2	3	0
B-cell lymphoma:		
新培養対照	6	0
I L - 2	3	0
I L - 2	2	0
B - C L L :		
新培養対照	3	0
A L L :		
新培養対照	7	0
I L - 2	2	0
I L - 2	2	0
A M L :		
新培養対照	2	0
A M O L :		
新培養対照	2	0
C M L - B C :		
新培養対照	1	0
感 染 性 核 症		
新培養対照	1	0
正末梢白血球		
新培養対照	3	0
I L - 2	10	0
I L - 2	10	0
単 顆 球		
新培養対照	2	0
球		
新培養対照	2	0
球		
小 板		
新培養対照	2	0
板		
新培養対照	2	0

* 3日間培養



実施例 12 .

ヒト白血球分化抗原を検出する 9 抗体の正常造血器細胞に対する反応性：

第 5 表に示すごとく、T p w 4 0 , T p 1 2 0 抗体は、末梢血 T 細胞の 6 0 ~ 8 0 % に反応を示すが、B 細胞，単球，顆粒球等には反応を示さない。

T p w 4 0 抗体は、胸腺細胞の大部分と反応を示すが、T p 1 2 0 抗体は、胸腺細胞の 3 0 ~ 4 0 % のみと反応を示し、ともに p a n T 細胞抗原を検出しているが、その特異性においては、差異が見られた。

T s w 3 2 , T s A , T s B および T s 1 4 5 の 4 抗体は、末梢血 T 細胞のある一分画に反応を示したが、B 細胞，単球，顆粒球には反応を示さず、いわゆる、T 細胞サブセット抗原を検出していた。胸腺細胞に対する反応性は、抗体間で異なっており、T s w 3 2 は 8 0 ~ 9 0 % の胸腺細胞に反応を示したが、T s B , T s 1 4 5 抗体は、ごく一部の細胞に反応を示したのみであった。

L p 9 5 抗体は、ほぼすべての白血球細胞群と反応を示し、p a n 白血球抗原を検出すると考えられた。

L s 7 0 および L s A 抗体はともに単球およびその他の白血球と反応を示し、白血球の一部の細胞に存在する抗原を検出していた。



第 5 表

ヒト白血球分化抗原を検出する 9 抗体の正常造血器細胞に対する反応性

標的細胞	膜蛍光抗体法による陽性細胞率 (%)									
	検体数	Tpw40	Tp120	Tsw32	TsA	TsB	Ts145	Lp95	Ls70	LsA
胸腺細胞	4	90<	30-40	80-90	20-40	0-20	0-10	60-80	0-10	0-10
末梢血										
T 細胞	10	60-70	70-80	25-35	50-70	40-60	10-30	60-80	10-20	20-30
非 T (B) 細胞	10	0-5	0-5	0-5	0-5	0-10	0-10	60-80	10-20	50-60
単球	4	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	80-90	90<	50-60
顆粒球	4	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	90<	20-30	0-5
脾細胞	3	50-60	50-60	40-50	30-40	10-20	10-20	60-70	20-30	40-50
活性化リンパ球										
PHA	8	70-90	30-40	40-70	50-70	50-70	10-30	70-80	40-60	10-30
ConA	8	85-95	60-80	40-70	60-80	60-80	15-35	70-90	20-40	5-15
混合培養リンパ球	8	60-70	60-70	20-30	50-70	30-50	20-40	70-80	20-40	10-20
混合培養リンパ球 の長期培養	4	60-70	60-70	30-40	50-70	40-50	50-60	40-50	40-50	30-40



実施例 13.

ヒト白血球分化抗原を検出する 9 抗体の各種造血器腫瘍に対する反応性：

各種造血器腫瘍 60 症例に対する反応性を検索し、第 6 表に示した。

p a n 白血球抗原を検出する L p 9 5 抗体は、ほとんどの造血器腫瘍細胞と反応を示した。p a n T 抗原を認識する T p w 4 0 , T p 1 2 0 抗体は反応性を異にしており、T p w 4 0 はより未熟な T 細胞リンパ腫である T - A L L , L L に反応を示し、また、I a 抗原陰性の N u 1 1 - A L L とともに反応を示した。一方 T p 1 2 0 抗体は、成熟型 T 細胞リンパ腫である T₂ リンパ腫および A T L に高率に反応した。この抗体は、また B - C L L とともに反応を示した。

T 亜分画抗原を認識する T s w 3 2 および T s A 抗体は、ともに T - A L L および L L には反応を示し、T s A 抗体は、さらに T₂ リンパ腫、A T L とともに反応性を示した。

T 亜分画抗原を認識する T s B 抗体は T₂ リンパ腫 A T L らの成熟 T 細胞リンパ腫と主に反応を示した。また、この抗体は B - C L L とともに反応を示した。T s 1 4 5 抗体は、いずれの T 細胞リンパ腫とも高率の反応は示さなかった。白血球の一部に存在する抗原を認識する L s 7 0 抗体は成熟 T 細胞リンパ腫および B - C L L に反応を示した。

L s A 抗体は、正常単球細胞に反応を示すが、急性単球性白血球とも反応を示した。この抗体は、T 細胞リンパ腫 B - C L L らとはまったく反応を示さなかった。



第 6 表

ヒト白血球分化抗原を検出する 9 抗体の各種造血器腫瘍に対する反応性

造血器腫瘍	膜蛍光抗体法による陽性症例数								
	試験症例数	Lp95	Tpw40	Tsw32	TsA	Tp120	TsB	Ls70	LsA
Nu111 型急性リンパ型白血病 (Nu11-ALL)									
Ia 抗原陽性	6	2	1	0	0	0	0	0	0
Ia 抗原陰性	4	3	3	0	0	0	0	0	0
T細胞型急性リンパ性白血病 (T-ALL)	7	7	7	5	5	3	2	0	0
リンパ芽球腫 (LL)	5	5	5	4	4	4	1	0	0
成熟 T 細胞リンパ腫 (T ₂ リンパ腫)	8	8	3	3	8	6	8	7	0
成人 T 細胞白血病 (ATL)	11	10	3	1	10	9	9	8	0
B細胞型慢性リンパ性白血病 (B-CLL)	8	6	0	0	5	8	8	8	0
急性骨髄性白血病 (AML)	6	4	1	0	0	0	0	2	2
急性単球性白血病 (AMOL)	5	5	0	0	1	2	2	4	4

- 23 -

請 求 の 範 囲

1. ヒト白血球に存在する抗原を検出するモノクローナル抗体。
2. ヒトT細胞に対する特許請求の範囲第1項のモノクローナル抗体。
3. 成人T細胞白血病（以下ATLと略記する）関連抗原に対する特許請求の範囲第2項のモノクローナル抗体。
4. gp60〔MT-2〕抗原を認識することを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のモノクローナル抗体。
5. 活性化T細胞およびATL細胞に特異的に反応する特許請求の範囲第3項記載のモノクローナル抗体。
6. ATL関連培養細胞のみに反応することを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のモノクローナル抗体。
7. ATLウィルス（以下ATLVと略記する）産生株細胞のみに反応することを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のモノクローナル抗体。
8. Ta60a, Ta60bまたはTa60cと命名した特許請求の範囲第3～6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。
9. Ts60と命名した特許請求の範囲第3, 4または6項記載のモノクローナル抗体。
10. ATV19aまたはATV19bと命名した特許請求の範囲第3, 6または7項記載のモノクローナル抗体。
11. 末梢血T細胞の大部分に存在するT細胞分化抗原（pan T抗原）に対する特許請求の範囲第1項のモノクローナル抗体。
12. Tpw40またはTp120と命名した特許請求の範囲第11項のモノクローナル抗体。
13. T細胞の亜分画に存在する抗原（T細胞サブセット抗原）に対する特許請求の範囲第1項のモノクローナル抗体。



- 24 -

14. T s w 3 2 , T s A , T s B または T s 1 4 5 と命名した特許請求の範囲第 1 3 項のモノクローナル抗体。
15. T 細胞および他の白血球に存在する抗原に対する特許請求の範囲第 1 項のモノクローナル抗体。
16. L p 9 5 , L s 7 0 または L s A と命名した特許請求の範囲第 1 5 項のモノクローナル抗体。
17. ヒト白血球細胞抗原に対するモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマを培養し、培養液中に該モノクローナル抗体を分泌、蓄積せしめ、該培養液から該モノクローナル抗体を採取することを特徴とするヒト白血球細胞抗原に対するモノクローナル抗体の製造法。
18. 該ハイブリドーマが、A T L V 産生株または A T L V および活性化リンパ球で免疫したマウス脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させたハイブリドーマであることを特徴とする特許請求の範囲第 1 7 項記載のモノクローナル抗体の製造法。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP84/00120

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ³ C07G 7/00, C12P 21/00, A61K 39/395 // (C12P 21/00, C12R 1/19)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07G 7/00, C12P 21/00, A61K 37/395, A61K 37/02, C12N 15/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category [*]	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	JP, A, 56-95123 (Ortho Pharmaceutical Corp.) 1. August, 1981 (01. 08. 81)	1 - 2, 17
X	JP, A, 56-95122 (Ortho Pharmaceutical Corp.) 1. August, 1981 (01. 08. 81)	1 - 2, 17
A	JP, A, 55-145617 (Ortho Pharmaceutical Corp.) 13. November, 1980 (13. 11. 80)	1 - 18
A	JP, A, 55-145616 (Ortho Pharmaceutical Corp.) 13. November, 1980 (13. 11. 80)	1 - 18
A	JP, A, 55-127321 (Ortho Pharmaceutical Corp.) 2. October, 1980 (02. 10. 80)	1 - 18
A	Rinsho Kensa, Vol. 27, No. 13, December, 1983 (Tokyo) Ishihara Toshiki and one other "Monoclonal Kotai no Sakuseiho", Hayashi Tomoko and one other "Lymph-kyu Hyomen Keishitsu no Monoclonal Kotai" P.1584 - 1598	1 - 18
[*] Special categories of cited documents: ¹⁸ "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 "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 "G" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ²	Date of Mailing of this International Search Report ²	
June 14, 1984 (14.06.84)	July 2, 1984 (02.07.84)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ²⁰	
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int.Cl ³ C07G 7/00, C12P 21/00, A61K 39/395 / (C12P 21/00, C12R 1/91)		
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	
I P C	C07G 7/00, C12P 21/00, A61K 37/395, A61K 37/02, C12N 15/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
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	JP, A, 56-95123 (オ-ゾ-ファ-マシユ-チカル-コ-ホレ-シヨ-ン) 1.8月.1981(01.08.81)	1-2, 17
X	JP, A, 56-95122 (オ-ゾ-ファ-マシユ-チカル-コ-ホレ-シヨ-ン) 1.8月.1981(01.08.81)	1-2, 17
A	JP, A, 55-145617 (オ-ゾ-ファ-マシユ-チカル-コ-ホレ-シヨ-ン) 13.11月.1980(13.11.80)	1-18
A	JP, A, 55-145616 (オ-ゾ-ファ-マシユ-チカル-コ-ホレ-シヨ-ン) 13.11月.1980(13.11.80)	1-18
A	JP, A, 55-127321 (オ-ゾ-ファ-マシユ-チカル-コ-ホレ-シヨ-ン) 2.10月.1980(02.10.80)	1-18
A	臨床検査、第27巻、第13号、12月.1983(東京) 石原俊樹 外1名「モノクローナル抗体の作製法」、 林朋子 外1名「リンパ球表面形質のモノクローナル抗体」 P.1584~1598	1-18
※引用文献のカテゴリー 「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 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「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 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリーの文献		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
14.06.84	02.07.84	
国際調査機関	権限のある職員	4, B 7, 2, 3, 5
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 橋 矢 書	