世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

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6
C07K 16/18, C12N 5/20, G01N 33/53, 33/577 // C12P 21/08, C12N 15/06, (C12P 21/08, C12R 1:91)

A1

(11) 国際公開番号 WO97/43315

(43) 国際公開日 1997年11月20日(20.11.97)

(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01639

(22) 国際出願日 1997年5月15日(15.05.97)

(30) 優先権データ
特願平8/145139 1996年5月15日(15.05.96) JP

(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)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
河野 功(KOHNO, Isao)[JP/JP]
犬塚貴美子(INUZUKA, Kimiko)[JP/JP]
伊藤由美子(ITO, Yumiko)[JP/JP]
福士 顕(FUKUSHI, Ken)[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)
(74) 代理人
弁理士 森田憲一(MORITA, Kenichi)
〒173 東京都板橋区板橋二丁目67番8号
板橋中央ビル5階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD OF IMMUNOLOGICAL ANALYSIS OF e-D DIMER AND e-DD/E COMPLEX**

(54)発明の名称 新規なモノクローナル抗体並びにe-Dダイマー及びe-DD/E複合体の免疫学的分析方法

**(57) Abstract**

A monoclonal antibody characterized by reacting specifically with the D-monomer formed by digesting a human fibrinogen with a granulocyte elastase and a D-domain-containing digest formed by digesting the human stabilized fibrin with a granulocyte elastase, but not with fibrinogens and the fragments X, Y and E each formed by digesting fibrinogens with a granulocyte elastase. By using this monoclonal antibody, the D dimer or a DD/E complex in a biological sample can be analyzed without being interfered by fibrinogens, the plasmin-digest of fibrinogens or the plasmin-digest of stabilized fibrins.

（５７）要約

ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントＸ、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントＹ、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントＥと反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体を記載する。前記モノクローナル抗体を用いて、フィブリノーゲン、フィブリノーゲンのプラスミン分解物、安定化フィブリンのプラスミン分解物の干渉を受けることなく、生体試料中の顆粒球エラスターゼ分解Ｄダイマー又はＤＤ／Ｅ複合体を分析することができる。

**参考情報**

ＰＣＴに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AL | アルバニア | ES | スペイン | LR | リベリア | SG | シンガポール |
| AM | アルメニア | FI | フィンランド | LS | レソト | SI | スロヴェニア |
| AT | オーストリア | FR | フランス | LT | リトアニア | SK | スロヴァキア共和国 |
| AU | オーストラリア | GA | ガボン | LU | ルクセンブルグ | SL | シエラレオネ |
| AZ | アゼルバイジャン | GB | 英国 | LV | ラトヴィア | SN | セネガル |
| BA | ボズニア・エルツェゴビナ | GE | グルジア | MC | モナコ | SZ | スワジランド |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MD | モルドヴァ共和国 | TD | チャード |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MG | マダガスカル | TG | トーゴ |
| BF | ブルギナ・ファソ | GN | ギニア | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TJ | タジキスタン |
| BG | ブルガリア | GR | ギリシャ | | | TM | トルクメニスタン |
| BJ | ベナン | HU | ハンガリー | ML | マリ | TR | トルコ |
| BR | ブラジル | ID | インドネシア | MN | モンゴル | TT | トリニダード・トバゴ |
| BY | ベラルーシ | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | UA | ウクライナ |
| CA | カナダ | IL | イスラエル | MW | マラウイ | UG | ウガンダ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド | MX | メキシコ | US | 米国 |
| CG | コンゴー | IT | イタリア | NE | ニジェール | UZ | ウズベキスタン |
| CH | スイス | JP | 日本 | NL | オランダ | VN | ヴィェトナム |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア | NO | ノルウェー | YU | ユーゴスラビア |
| CM | カメルーン | KG | キルギスタン | NZ | ニュー・ジーランド | ZW | ジンバブエ |
| CN | 中国 | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | PL | ポーランド | | |
| CU | キューバ | KR | 大韓民国 | PT | ポルトガル | | |
| CZ | チェッコ共和国 | KZ | カザフスタン | RO | ルーマニア | | |
| DE | ドイツ | LC | セントルシア | RU | ロシア連邦 | | |
| DK | デンマーク | LI | リヒテンシュタイン | SD | スーダン | | |
| EE | エストニア | LK | スリランカ | SE | スウェーデン | | |

# 明 細 書

## 新規なモノクローナル抗体並びにｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の免疫学的分析方法

### 技術分野

本発明は、新規なモノクローナル抗体、並びにヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄダイマー（以下、ｅ－Ｄダイマーと称することがある）及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解ＤＤ／Ｅ複合体（以下、ｅ－ＤＤ／Ｅ複合体と称することがある）の免疫学的分析方法に関する。

本発明による前記モノクローナル抗体は、顆粒球エラスターゼがヒト安定化フィブリンを分解することによって、血漿中又は血清中に生じたｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の免疫学的分析方法のための試薬として有用である。また、前記ｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体は、外科手術後の多臓器障害及び肺気腫の予知マーカーとして有用である。

### 背景技術

ヒト安定化フィブリンの各種プロテアーゼによる分解物は、臨床的診断法における診断マーカーとして有用である。

例えば、ヒト安定化フィブリンのプラスミン分解Ｄダイマー（以下、ｐ－Ｄダイマーと称することがある）及びプラスミン分解ＤＤ／Ｅ複合体（以下、ｐ－ＤＤ／Ｅ複合体と称することがある）は、汎発性血管内凝固症候群（ＤＩＣ）の診断マーカーとして広汎に使用されている。生体試料中のｐ－Ｄダイマー及びｐ－ＤＤ／Ｅ複合体の測定においては、ｐ－Ｄダイマーに特異的なモノクローナル抗体を用いた感作ラテックスによる凝集反応が一般的に使用されている。

また、ヒト安定化フィブリンのｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体は、外科手術後の多臓器障害及び肺気腫の予知マーカーとして有用である。しかし、前記のｐ－Ｄダイマーに特異的なモノクローナル抗体を用いた感作ラテックスによる凝集反応では、プラスミンの作用によって生成したｐ－Ｄダイマー及びｐ－Ｄ

D／E複合体を測定することはできるが、顆粒球エラスターゼの作用によって生成したe－Dダイマー及びe－DD／E複合体を測定することは不可能である。このため、既にヒト安定化フィブリンのe－Dダイマー及びe－DD／E複合体を測定しようとする試みがいくつかなされている。

顆粒球エラスターゼがフィブリノーゲンに作用した際にフィブリノーゲンのAα鎖上に新たに生ずるN末端部位（Aα22～）に反応するモノクローナル抗体が報告されている（Blood Coagulation and Fibrinolysis，第6巻，259頁，1995年）。このモノクローナル抗体の抗原結合部位は、Eドメインにあり、本発明のモノクローナル抗体とは異なる。更に、弱いながらもフィブリノーゲンと反応するので、この抗体を使用したEIA法では、血漿中のフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解物又はフィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物を測定することはできない。

また、フィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼD分画を免疫して得たポリクローナル抗体より、プラスミン分解Dモノマー、プラスミン分解Dダイマー、及びプラスミン分解DD／E複合体、並びにフィブリノーゲンに反応する抗体を吸収除去したポリクローナル抗体（J．Lab．Clin．Med．，第102巻，858頁，1983年）も使用される場合があるが、操作が煩雑である。

発明の開示

本発明の目的は、血漿などの生体試料中のe－Dダイマー及びe－DD／E複合体の量を、その生体試料中に同時に含まれると考えられるフィブリノーゲン、フィブリノーゲンのプラスミン分解物、又はヒト安定化フィブリンのプラスミン分解物（特にはp－Dダイマー又はp－DD／E複合体）の量に影響を受けることなく、分析する方法を提供することにある。

その他の目的及び効果は、以下の記載から明らかになろう。

本発明によれば、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒

球エラスターゼ分解フラグメントＥと反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体が提供される。

また、本発明によれば、配列表の配列番号１の配列

Ｓｅｒ　Ｇｌｕ　Ａｓｐ　Ｌｅｕ　Ａｒｇ　Ｓｅｒ

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと反応することを特徴とする、モノクローナル抗体が提供される。

更には、本発明によれば、生体試料において、ヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄダイマー及び顆粒球エラスターゼ分解ＤＤ／Ｅ複合体を分析する方法であって、前記モノクローナル抗体又はその抗体フラグメントを感作した支持体を前記試料と接触させ、前記Ｄダイマー又はＤＤ／Ｅ複合体と前記感作支持体との凝集物の形成を検出することを特徴とする、免疫学的分析方法が提供される。

図面の簡単な説明

図１は、本発明のモノクローナル抗体ＩＦ－１０１を感作したラテックスと、各種抗原とを接触させた場合に生じる凝集反応における、抗原の濃度と凝集反応速度との相関を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「顆粒球エラスターゼ」とは、顆粒球のアズール顆粒に含まれ、局所の炎症などで活性化された顆粒球より放出されるエラスターゼであって、その生理的な基質である、細胞マトリックスに含まれるエラスチン、コラーゲン、フィブロネクチン、若しくはプロテオグリカン、又は血液中タンパク質のフィブリノーゲン、フィブリン、プラスミノーゲン、若しくはアンチトロンビンＩＩＩなどを、疎水的アミノ酸であるバリン又はアラニンのカルボキシル基側で加水分解するエステラーゼを意味する。

本明細書において、顆粒球エラスターゼに分解されることによって生成する分解物を、その分解物名の前に「ｅ－」を付与することによって表すことがある。例えば、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄモノマー、顆粒球エ

ラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントEを、ヒトフィブリノーゲンのe－Dモノマー、e－フラグメントX、e－フラグメントY、及びe－フラグメントEとそれぞれ表すことがある。

同様に、本明細書において、プラスミンに分解されることによって生成する分解物を、その分解物の名称の前に「p－」を付与することによって表すことがある。

本発明のモノクローナル抗体は、近年各方面で行われている細胞融合法により作製されたハイブリドーマによるモノクローナル抗体産生法で得られたモノクローナル抗体である。

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー（e－Dモノマー）、及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントEとは反応しない。ヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物とは、ヒト安定化フィブリンを顆粒球エラスターゼで処理することにより生成する分解物の内、ヒト安定化フィブリンのe－Dドメインを有する分解物を意味し、例えば、e－DD／Eを基本単位としたe－DD／Eのポリマー様物質、e－Dダイマー、又はe－DD／E複合体などを挙げることができ、特にはe－Dダイマー及びe－DD／E複合体を意味する。

本発明の好ましいモノクローナル抗体は、更に、ヒトフィブリノーゲンのプラスミン分解物及びヒト安定化フィブリンのプラスミン分解物とも反応しない。

本発明は、配列表の配列番号１の配列：

Ser Glu Asp Leu Arg Ser

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと反応するモノクローナル抗体にも関する。

配列表の配列番号１の配列で表されるアミノ酸配列は、ヒトフィブリノーゲンを構成する３種類のポリペプチド（Aα鎖、Bβ鎖、及びγ鎖）の１つであるA

α鎖のN末端から第１１２番目～第１１７番目のアミノ酸配列と一致し、しかもヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマーを構成するポリペプチドの１つであるＡα鎖の部分断片（前記Ａα鎖から、第１番目～第１１１番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドを除いた、残りのポリペプチド：以下、「／α鎖」と称する）のアミノ基末端から第１番目～第６番目のアミノ酸配列と一致する。

本発明の好ましいモノクローナル抗体は、配列表の配列番号１の配列で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと反応し、ヒトフィブリノーゲンのｅ－Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントEとは反応しない。更に、より好ましいモノクローナル抗体は、ヒトフィブリノーゲンのプラスミン分解物及びヒト安定化フィブリンのプラスミン分解物とも反応しない。

本発明のモノクローナル抗体は、そのモノクローナル抗体を産生することのできるハイブリドーマ（例えば、マウスハイブリドーマ）を、例えば、適当な培地又は哺乳動物（例えば、マウス）の腹腔内で培養することによって製造することができる。前記ハイブリドーマは、一般的には、例えば、抗原としてｅ－Dダイマーを使用して免疫した哺乳動物又は鳥類（例えば、マウス）の脾臓細胞と哺乳動物（例えば、マウス）骨髄腫細胞とを、Köhler及びMilsteillの細胞融合の基本方法〔ｎａｔｕｒｅ第２５６巻４９５頁（１９７５年）参照〕により細胞融合して製造することが可能である。詳細には、下記実施例の記載の方法によって製造することができる。

また、前記のハイブリドーマを培養することのできる培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、好適にはダルベツコ氏変法イーグル氏最小必須培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏｓ ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅｅａｇｌ’ｓ ｍｉｎｉｍｕｍ ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｍｅｄｉｕｍ：以下、DMEと称する）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、培地中で行う場合には、例えば、５％$CO_2$濃度、３７℃で約３日間行う。あるいは、マウスの腹腔内で培養する場合には、例えば、約１４日間行う。

このようにして製造された培養液又は哺乳動物の腹水から、例えば、タンパク質の単離・精製に一般的に用いられる方法により、本発明のモノクローナル抗体を分離・精製することが可能である。

そのような方法としては、例えば、硫安塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラム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、又は凍結乾燥等を挙げることができる。

本発明の抗体フラグメント、すなわち、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントであって、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄドメイン含有分解物と特異的に反応する抗原結合部位を含む抗体フラグメントには、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、又はＦｖ等が含まれる。これらのフラグメントは、例えば、本発明のモノクローナル抗体を定法によりタンパク質分解酵素によって消化し、続いてタンパク質の分離・精製の定法に従って得ることができる。

本発明の分析方法は、本発明のモノクローナル抗体及び／又は抗体フラグメントを用いることを除けば、それ以外の点では従来公知の凝集法、例えば、ラテックス凝集法などに適用することができる。本発明の分析方法は、スライドグラス上での肉眼による凝集検査だけでなく、自動分析機による分光学的自動分析にも適用することができる。すなわち、本発明の分析方法により、ヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Ｄダイマー及び顆粒球エラスターゼ分解ＤＤ／Ｅ複合体の存在の検出、半定量的測定、又は定量的測定を行うことができる。

本発明の分析方法に用いることのできる、モノクローナル抗体及び／又は抗体フラグメント感作支持体は、従来公知の方法を用いて調製することができる。例えば、支持体（例えば、水不溶性担体、特にポリスチレンラテックス）と抗体含有緩衝液とを、撹拌下に混合し、遠心分離して得られる沈渣を適当な緩衝液に懸濁する。

前記感作支持体は、ｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体、並びにｅ－Ｄモノマーとそれぞれ反応することができ、それ以外の成分とは反応しない。前記感作支持体とｅ－Ｄダイマー又はｅ－ＤＤ／Ｅ複合体とを接触させると、ｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体は複数の抗原決定基を有するので、前記感作支持体の凝集反応が生じる。それに対して、ｅ－Ｄモノマーは抗原決定基を１つしかもたないので、前記感作支持体とｅ－Ｄモノマーとを接触させても、前記感作支持体の凝集反応は生じない。従って、ｅ－Ｄダイマー、ｅ－ＤＤ／Ｅ複合体、及びｅ－Ｄモノマーを含む生体試料と、前記感作支持体とを接触させた場合に生じる前記感作支持体の凝集反応は、ｅ－Ｄダイマー及び／又はｅ－ＤＤ／Ｅ複合体との反応によるものであり、このような凝集反応における差異に基づいて、ｅ－Ｄモノマーの影響を受けることなく、生体試料中のｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の量を測定することができる。

例えば、前記感作ラテックスの一定量と生体試料の一定量とをスライド板又はマイクロタイタープレート上で一定時間混和した後、凝集像の有無又は強弱を観察して生体試料中のｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の立体構造を保持する分画の量を判定することができる。あるいは、感作ラテックスの一定量と生体試料の一定量とを混合し、一定時間後の吸光度の増大を適当な波長で分光学的に測定することによって生体試料中のｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の立体構造を保持する分画の量を判定することができる。

また、本発明の分析方法では、生体試料中にヒトフィブリノーゲン、ヒトフィブリノーゲンのプラスミン分解物、又はヒト安定化フィブリンのプラスミン分解物が存在した場合であっても、それらの化合物と前記感作支持体とは反応しないので、それらの化合物の影響を受けることなく、前記生体試料中のｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の量を測定することができる。

なお、本発明により分析することのできる生体試料としては、例えば、血漿、血清、又は尿などを挙げることができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を

限定するものではない。

実施例１：ｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の調製

ｅ－Ｄダイマーの調製は、主にＳｔｅｐｈａｎｉｅ Ａ．ＯｌｅｘａとＡｎｄｒｅｉ Ｚ．Ｂｕｄｚｙｎｓｋｉの方法（１９７８）、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ，Ｓｕｐｐｌ．５８，１１９，Ｏｌｅｘａ ｅｔ ａｌ．の方法（１９７９）、及びＢｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ５７６，３９～５０に準じて行った。フィブリノーゲン（カビ社、スウェーデン）２０ｍｇ（１０ｍｇ／ｍｌ）に、ヒトトロンビン及び塩化カルシウムをそれぞれ終濃度１０単位／ｍｌ及び１０ｍＭとなるよう加え、３７℃で２時間反応させ、フィブリノーゲンをフィブリンに変換させた。１８０００×ｇで３０分間遠心し、フィブリンを非凝固性物質から分離した。フィブリンを、０．１５Ｍトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．８）－５ｍＭ塩化カルシウム－０．０２％$NaN_3$液２０ｍｌに浮遊させた。浮遊液にヒト顆粒球エラスターゼ（２５単位／ｍｌ、エラスチンプロダクト社、米国）０．５ｍｌを添加した。撹拌しながら３７℃で８時間反応させた後、ジイソプロピルフルオロリン酸（ＤＦＰ）（Ｍｏｂａｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．）を最終濃渡２ｍＭになるように加えて分解反応を停止させた。ＤＦＰを添加してから１時間処理後の分解物をＤＤ／Ｅ複合体－安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物と称する。この分画は、ＤＤ／Ｅを基本単位としたＤＤ／Ｅのポリマー様物質と、ＤＤ／Ｅとの混合物である。

次に、前もって５０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）－０．１５Ｍ塩化ナトリウム－５ｍＭ塩化カルシウム溶液（以下、溶液Ａと称する）で平衡化したセファロースＣＬ６Ｂ（ファルマシア社、スウェーデン）のカラム（直径２．６ｃｍ，長さ９０ｃｍ）に、先に得られたＤＤ／Ｅ複合体－安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物を充填し、溶液Ａで展開する分子ふるいクロマトグラフィーを行った。分子量マーカー、並びに抗Ｄ抗血清及び抗Ｅ抗血清（ヘキスト社、ドイツ）を用いるオクテロニー法によりｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の分画を同定、分離した。このようにして得られたｅ－ＤＤ／Ｅ複合体を３Ｍ尿素－５０ｍＭクエン酸（ｐＨ５．５）の溶液中にて３７℃で４時間保温した。次に、５０ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）－２８ｍＭクエン酸ナトリウム－０．１Ｍ塩化ナト

リウム（以下、溶液Ｂと称する）で平衡化したセファロースＣＬ－６Ｂのカラム（直径２．６ｃｍ、長さ９０ｃｍ）に、上記の尿素処理したｅ－ＤＤ／Ｅ複合体を充填し、溶液Ｂで展開した。分子量マーカー並びに抗Ｄ抗血清及び抗Ｅ抗血清を用いたオクテロニー法により、ｅ－Ｄダイマー（ＤＤ）分画とｅ－Ｅ（Ｅ）分画を同定、分離した。特定の吸光度（Ａ２８０ｎｍ＝２．０）を示すｅ－Ｄダイマー１０ｍｌを得た。このようにして調製したｅ－Ｄダイマーを、ｅ－Ｄダイマーに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生することのできるハイブリドーマを製造するための免疫原として、またそのハイブリドーマを選別するためのエンザイムイムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）用抗原として使用した。

実施例２：ハイブリドーマの作製

（ａ）免疫化した脾臓細胞の調製

前記実施例１で得たｅ－Ｄダイマー免疫原溶液（Ａ２８０ｎｍ＝２．０）を等量のフロインド氏完全アジュバントと乳化するまで混合し、その混合液１００μｌをマウス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、そのマウスに前記と同様の方法で腹腔内に投与した（第２回免疫）。第２回免疫から２１日経過後、ｅ－Ｄダイマー免疫原溶液（Ａ２８０ｎｍ＝２．０）を等量の生理食塩水で希釈し、その希釈液１００μｌを、その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、マウスから脾臓を無菌的に摘出し、以下の工程に使用した。

（ｂ）細胞融合

無菌的に摘出した前記の脾臓を、１０～１５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ培地５ｍｌを入れたシャーレーに入れた。次に、脾臓を１０～１５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ培地約１５ｍｌで還流して脾細胞を流出させた後、この脾細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した。この脾細胞を５０ｍｌ遠心チューブに集めて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－$NH_4Cl$，１０ｍＭ－$KHCO_3$，１ｍＭ－$Na_2EDTA$，ｐＨ７．０）３～５ｍｌを加え、懸濁した。０℃で５～１０分間放置し、懸濁液中の赤血球を破壊した。１０～１５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ培地１０～２０ｍｌを加えてから遠心分離した。このようにして得た細胞ペレットをＤＭＥ培地で遠心法

によって洗浄し、生きている脾細胞数を測定した。

一方、予め培養しておいたマウス骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）ＳＰ２／０－Ａｇ１４約$2\times10^{7}$個に$1\times10^{8}$個の前記脾臓細胞を加え、ＤＭＥ培地中でよく混合し、遠心分離を行った（５００×ｇ、１０分間）。その上清を吸引し、ペレットをよく解きほぐし、３７℃に保温しておいた４０％ポリエチレングリコール４０００溶液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を混合させた。次に、３７℃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、１０～１５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ培地２０～３０ｍｌを加えて、遠心分離（５００×ｇ、１０分間）を行った。上清を除去した後、細胞ペレットを１０～１５％ウシ胎児血清を含むＨＡＴ培地（ＤＭＥ培地にアミノプリテン$4\times10^{-7}$、チミジン１．６×$10^{-5}$Ｍ、ヒポキサンチン$1\times10^{-4}$Ｍになるように添加したもの）で、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。その細胞懸濁液を９６ウェル細胞培養プレートの各ウェルに２００μｌずつ分注し、３７℃にて５％炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器で培養を開始した。培養中、２～３日間隔で各ウェルの培地を約１００μｌ除き、新たに前記のＨＡＴ培地を１００μｌ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日目頃から１０～１５％ウシ胎児血清を含むＨＴ培地（ＣＭＥ培地にチミジン１．６×$10^{-5}$Ｍ、ヒポキサンチン$1\times10^{-4}$Ｍになるように添加したもの）に交換し、ハイブリドーマの増殖を観察するとともに、約１０日目に、以下に示すＥＬＩＳＡ法により、ｅ－Ｄモノマーと反応し、しかもｅ－Ｄダイマーとも反応する抗体（以下、抗ｅ－Ｄモノマー／ｅ－Ｄダイマー抗体と称する）を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。

（ｃ）ハイブリドーマの樹立

ハイブリドーマ培養上清中の産生抗体の有無は、ＥＬＩＳＡ法により測定した。９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレート（Ｉｍｍｕｌｏｎ　II、日本ダイナテック株式会社）の各ウェルに、前記実施例１で得た精製ｅ－Ｄダイマー溶液（Ａ２８０ｎｍ＝０．０５、生理食塩水で希釈した）を５０μｌずつ分注し、２５℃で２時間

放置した。次に、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－生理食塩水で３回洗浄した後、各ウェルにハイブリドーマ培養上清５０μｌを加え、２５℃で１時間反応させた。

次に、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－生理食塩水で２００倍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）５０μｌを各ウェルに加えた。反応終了後、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０－生理食塩水で各ウェルを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２５０μｌを各ウェルに加え、２５℃で３０分間反応させ、各ウェルの４９０ｎｍにおける吸光度を測定した。その結果、１９２ウェル中１２ウェルに抗体産生が認められた。

前記のＥＬＩＳＡ法によって認められた培養上清中の抗ｅ－Ｄダイマー抗体が、ｅ－Ｄモノマー、ｅ－フラグメントＸ、ｅ－フラグメントＹ、ｅ－フラグメントＥ、及びフィブリノーゲンと反応するか否かを前記の各抗原を感作した９６ウェルＥＬＩＳＡ用プレートを用いて前記と同様の方法で測定した。その結果、ｅ－Ｄダイマーと反応した１２ウェルの培養上清中、１ウェルの培養上清がｅ－Ｄモノマーと反応し、ｅ－フラグメントＸ、ｅ－フラグメントＹ、ｅ－フラグメントＥ、及びフィブリノーゲンとは反応しなかった。他の１１ウェルの培養上清は、ｅ－フラグメントＥとは反応しなかったが、ｅ－Ｄモノマー、ｅ－フラグメントＸ、ｅ－フラグメントＹ、及びフィブリノーゲンのすべてと反応した。

ｅ－Ｄダイマー及びｅ－Ｄモノマーに特異的に反応するウェル中のハイブリドーマを２４ウェルプレートに移し、１０～１５％ウシ胎児血清を含むＨＴ培地で４～５日間培養した。その後、ＥＬＩＳＡ法によってフィブリノーゲンのプフスミン分解物（ｐ－フラグメントＸ、ｐ－フラグメントＹ、ｐ－フラグメントＤ、及びｐ－フラグメントＥの混合物）及び安定化フィブリンのプラスミン分解物（ｐ－ＤＤ／Ｅ複合体）との交差反応性を確認した。前記のプラスミン分解物のいずれとも全く反応しなかった。更に、ＥＬＩＳＡ法によって抗ｅ－Ｄモノマー／ｅ－Ｄダイマー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ェルあたり$2\times10^4$個分注してある９６ウェルプレートの各ウェルに１００μｌずつ分注

した。約１０日後、ＥＬＩＳＡ法によって抗ｅ－Ｄダイマー及び抗ｅ－Ｄモノマー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、２０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、増殖が良好で、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、抗ｅ－Ｄモノマー／ｅ－Ｄダイマー抗体産生ハイブリドーマＩＦ－１０１を樹立した。このハイブリドーマは、工業技術院生命工学工業技術研究所（宛名：〒３０５日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号）に１９９６年４月２４日から国内寄託（微工研菌寄第Ｐ－１５５９９号）され、１９９７年３月３１日から国際寄託に移管されており、国際受託番号はＦＥＲＭ　ＢＰ－５８９０である。

実施例３：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ＩＦ－１０１を１５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥ培地にて３７℃で５％二酸化炭素雰囲気中、７２～９６時間培養した。培養物を遠心分離（１０，０００×ｇ，１０分間）した後、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分間撹拌した後、６０分間放置し、遠心分離（１０，０００×ｇ，１０分間）した後、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リン酸緩衝液に対して透析した。得られた透析内液を、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含有１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）と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、０．１Ｍ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４Ｂのカラムに通した。次に、通過液を、０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ０．８）で平衡化したプロテインＡ－セファロース４Ｂのカラムに充填した。カラムをｐＨ３．５の緩衝液で溶出して、精製した本発明の抗ｅ－Ｄモノマー／ｅ－Ｄダイマーモノクローナル抗体ＩＦ－１０１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）0．5mlを10～12週齢のBALB／C系マウスの腹腔内に投与してから14～20日目のマウス腹腔内に、イン・ビトロで増殖させたハイブリドーマIF－101をマウス一匹あたり$2\times10^6$細胞となるように接種した。

一匹のマウスから約10～15mlの腹水が得られた。その抗体濃度は、5～10mg／mlであった。腹水中のモノクローナル抗体の精製（但し、ヤギ抗ウシ血清IgG－セファロース4Bのカラムを通す操作を除く）は、前記のイン・ビトロ精製法と同様の方法で行った。

実施例4：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

本発明の抗e－Dモノマー／e－Dダイマーモノクローナル抗体IF－101の免疫グロブリンクラスを、オクテロニー免疫拡散法により同定した。モノクローナル抗体IF－101の免疫グロブリンクラスは$IgG_1\ \kappa$であった。

実施例5：モノクローナル抗体の認識部位の同定

モノクローナル抗体IF－101の認識部位の同定はウエスターンブロッティング法によって行った。実験操作は主に、Zeta－Probe Blotting Mewbranes Instruction Mannual（バイオ・ラッド社、アメリカ）により行った。実験操作の概要は次のようである。

フィブリノーゲンを顆粒球エラスターゼで処理し、30分間、60分間、及び24時間反応後のフィブリノーゲンの分解物を、ジチオスレイトール（DTT）の存在下及び非存在下でSDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。前記の方法でブロッティング及びエンザイムイムノアッセイを行い、この結果とSDSポリアクリルアミドゲルのクマジー・ブリリアント・ブルーG－250によるタンパク質染色の結果から、モノクローナル抗体IF－101の認識部位の同定を行った。フィブリノーゲン、精製e－Dダイマー、及びe－DD／E複合体（安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物）に対しても前記と同様の方法で行った。本発明のモノクローナル抗体IF－101の各抗原に対する結合反応性を表1に示す。表中、＋は結合反応性が有ることを示し、－は結合反応性がないことを示す。

表1

| 抗原 | 結合反応性 |
|---|---|
| フィブリノーゲン | − |
| e−X | − |
| e−Y | − |
| e−D | + |
| e−E1 | − |
| e−E2 | − |
| e−E3 | − |
| e−Dダイマー | + |
| e−DD／E複合体 | + |
| Aα | − |
| Bβ | − |
| γ | − |
| e−Dモノマー／α | + |
| e−Dモノマー／β | − |
| e−Dモノマー／γ | − |

更に、フィブリノーゲンのプラスミン分解フラグメントX、Y、D、及びE、p−Dダイマー、並びにp−DD／E複合体（安定化フィブリンのプラスミン分解物）に対しても前記と同様の方法で行った。結果を表2に示す。

表2

| 抗原 | 結合反応性 |
|---|---|
| フィブリノーゲン | − |
| p−X | − |
| p−Y | − |
| p−D | − |
| p−E1 | − |
| p−E2 | − |

| | |
|---|---|
| p－E３ | － |
| p－Dダイマー | － |
| p－DD／E複合体 | － |
| Aα | － |
| Bβ | － |
| γ | － |
| p－Dモノマー／α | － |
| p－Dモノマー／β | － |
| p－Dモノマー／γ | － |

以上、表１及び表２の結果から、本発明のモノクローナル抗体ＩＦ－１０１は、ｅ－Dモノマーの／α鎖を認識することが明らかになった。

実施例６：モノクローナル抗体ＩＦ－１０１のエピトープの同定

実施例５の結果からモノクローナル抗体ＩＦ－１０１はｅ－Dモノマーの／α鎖を認識することが明らかとなった。そこで、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１のエピトープをより詳細に解析するため、ｅ－Dモノマーの／α鎖のアミノ酸配列を決定し、それと同じアミノ酸配列をもつペプチドを合成し、それを用いて、ｅ－Dモノマー、ｅ－Dモノマー／α鎖、ｅ－Dダイマー、又はｅ－DD／E複合体と、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１との結合阻害実験を行うことによって、エピトープのアミノ酸配列を決定した。具体的な実験操作を以下に示す。

ｅ－Dモノマーの／α鎖のN末端側のアミノ酸配列をプロテインシーケンサ〔アプライドシステムズジャパン（株）〕で解析したところ、配列表の配列番号２の配列：

Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile

で表されることが明らかになった。

このアミノ酸配列と、ヒトフィブリノーゲンのAα鎖の配列とを比較することにより、ｅ－Dモノマーの／α鎖は、Aα鎖の第１１２番目のアミノ酸残基から始まることが明らかになった。すなわち、ｅ－Dモノマーの／α鎖のN末端アミノ酸を含むN末端側のアミノ酸配列は、ヒトフィブリノーゲンのAα鎖の

$Ser_{112}-Glu_{113}-Asp_{114}-Leu_{115}-Arg_{116}$
$-Ser_{117}-Arg_{118}-Ile_{119}-\cdots$

に対応することが判明した。

ヒトフィブリノーゲンのAα鎖の第１１２番目のアミノ酸残基以降のアミノ酸配列を有するペプチド３種類を合成し、それらのペプチドによる、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１と、ｅ－Ｄモノマー、ｅ－Ｄモノマー／α鎖、ｅ－Ｄダイマー、又はｅ－ＤＤ／Ｅ複合体（安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物）との結合阻害実験を行った。

前記結合阻害実験は、実施例５の「モノクローナル抗体の認識部位の同定」と同様にウエスターンブロッティング法によって行った。すなわち、フィブリノーゲンを顆粒球エラスターゼで２４時間反応させた後に得られるフィブリノーゲンの分解物（ｅ－Ｄモノマーを含む）と、精製ｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体（安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物）とを、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）の存在下及び非存在下でＳＤＳポリアクリルアミド電気泳動を行った。次にＺｅｔａ－Ｐｒｏｂｅ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｍａｎｎｕａｌ（バイオ・ラッド社、アメリカ）に従い、ブロッティングを行った。このブロッティング操作の中で、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１を反応させるときに、各ペプチドの存在下（１００μＭ）及び非存在下で実験を行い、ＩＦ－１０１の反応に対する各ペプチドの阻害の有無を調べた。

結果を表３に示す。ペプチドＡは、ヒトフィブリノーゲンのＡα鎖の第１１２番目～第１１７番目のアミノ酸配列：

Ｓｅｒ Ｇｌｕ Ａｓｐ Ｌｅｕ Ａｒｇ Ｓｅｒ

（配列表の配列番号１の配列）で表されるペプチドであり、ペプチドＢは、ヒトフィブリノーゲンのＡα鎖の第１１７番目～第１２２番目のアミノ酸配列：

Ｓｅｒ Ａｒｇ Ｉｌｅ Ｇｌｕ Ｖａｌ Ｌｅｕ

（配列表の配列番号３の配列）で表されるペプチドであり、そして、ペプチドＣは、ヒトフィブリノーゲンのＡα鎖の第１２２番目～第１２７番目のアミノ酸配列：

Ｌｅｕ Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｌｙｓ Ｖａｌ Ｉｌｅ

（配列表の配列番号４の配列）で表されるペプチドである。＋は、加えたペプチドが、顆粒球エラスターゼ分解物とモノクローナル抗体ＩＦ－１０１との結合を阻害したことを示し、－は、加えたペプチドが、前記結合を阻害しないことを示す。

表３に示す結果から、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１のエピトープは、ヒトフィブリノーゲンのＡα鎖の

$Ser_{112}-Glu_{113}-Asp_{114}-Leu_{115}-Arg_{116}-Ser_{117}$

に相当する、ｅ－Ｄモノマーの／α鎖のＮ末端アミノ酸を含むＮ末端側のアミノ酸配列

Ｓｅｒ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｌｅｕ－Ａｒｇ－Ｓｅｒ

を含む部位であることがわかった。

表３

| | ｅ－Ｄモノマー | ｅ－Ｄモノマー／α | ｅ－Ｄダイマー | ｅ－ＤＤ／Ｅ複合体 |
|---|---|---|---|---|
| ペプチドＡ | ＋ | ＋ | ＋ | ＋ |
| ペプチドＢ | － | － | － | － |
| ペプチドＣ | － | － | － | － |

実施例７：モノクローナル抗体ＩＦ－１０１結合ラテックスの調製とそのラテックスによるｅ－Ｄダイマー及びｅ－ＤＤ／Ｅ複合体（安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解物）の測定

ポリスチレンラテックス〔セラダイン社製，米国，１０％（ｗ／ｖ）懸濁液，粒径＝０．４８９μｍ〕０．２ｍｌを、実施例３で作製した本発明の抗ｅ－Ｄモノマー／ｅ－ＤＤ／Ｅ複合体モノクローナル抗体ＩＦ－１０１を含む５０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）１．８ｍｌ（抗体濃度０．９ｍｇ／ｍｌ）に混合し、マグネチックスターラーで撹拌した。

混合液を遠心分離（２０，０００ｇ×１０分間）し、０．０５％$NaN_3$ を含む蒸留水で４回洗浄し、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを含む０．１Ｍトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）に懸濁させ（１ｗ／ｖ％）、保存した。この感作ラテックスと、種々の濃度のｅ－Ｄダイマー、ｅ－ＤＤ／Ｅ複合体、フィブリノーゲンの顆粒球

エラスターゼ分解物、フィブリノーゲンのプラスミン分解物、又は安定化フィブリンのプラスミン分解物とを混合し、全自動免疫血清検査システム（三菱化学株式会社製ＬＰＩＡ－２００）を用いて、凝集の反応速度を測定することにより定量した。

結果を図１に示す。直線ａは、ｅ－Ｄダイマーを抗原として使用した場合の結果を示し、以下同様に、直線ｂはｅ－ＤＤ／Ｅ複合体を、直線ｃはｅ－ＤＤ／Ｅ複合体及びｐ－ＤＤ／Ｅ複合体の等量混合物を、直線ｄはフィブリノーゲンのプラスミン分解物を、直線ｅはｐ－ＤＤ／Ｅ複合体を、そして直線ｆはフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解物を、抗原として使用した場合の結果を示す。Ｖ値とは、凝集反応速度である。

図１から明らかなように、モノクローナル抗体ＩＦ－１０１感作ラテックスにより、ｅ－Ｄダイマー、又はｅ－ＤＤ／Ｅ複合体を定量的に測定できることが判明した。

産業上の利用可能性

以上から明らかなように、本発明のモノクローナル抗体によれば、生体試料中のｅ－Ｄダイマー又はｅ－ＤＤ／Ｅ複合体の量を、前記生体試料中に存在すると考えられるフィブリノーゲン、フィブリノーゲンのプラスミン分解物、安定化フィブリンのプラスミン分解物（特にはｐ－Ｄダイマー、ｐ－ＤＤ／Ｅ複合体）の干渉を受けることなく、特異的に定量することのできる免疫学的分析方法を提供することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

配列表

配列番号：1
配列の長さ：6
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列

Ser Glu Asp Leu Arg Ser
1 5

配列番号：2
配列の長さ：8
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列

Ser Glu Asp Leu Arg Ser Arg Ile
1 5

配列番号：3
配列の長さ：6
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列

Ser Arg Ile Glu Val Leu
1 5

配列番号：4

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Lys Arg Lys Val Ile
1 5

# 請 求 の 範 囲

1．ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応するが、フィブリノーゲン、並びにフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解フラグメントX、顆粒球エラスターゼ分解フラグメントY、及び顆粒球エラスターゼ分解フラグメントEと反応しないことを特徴とする、モノクローナル抗体。

2．ヒトフィブリノーゲンのプラスミン分解物及び安定化フィブリンのプラスミン分解物とは反応しない、請求項1に記載のモノクローナル抗体。

3．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体のフラグメントであって、ヒトフィブリノーゲンの顆粒球エラスターゼ分解Dモノマー及びヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dドメイン含有分解物と特異的に反応する抗原結合部位を含むことを特徴とする、抗体フラグメント。

4．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、ハイブリドーマ。

5．配列表の配列番号1の配列：

Ser Glu Asp Leu Arg Ser

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと反応することを特徴とする、モノクローナル抗体。

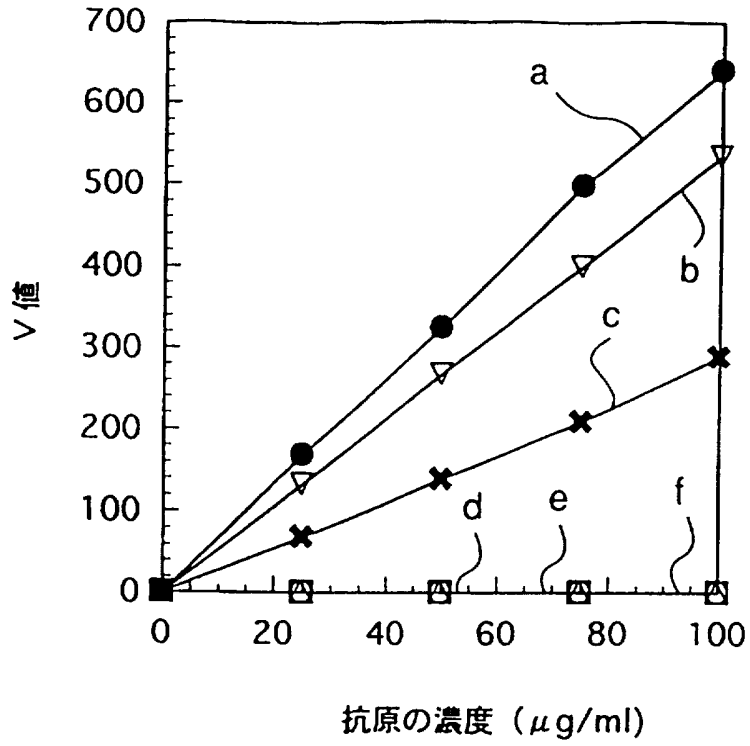
6．請求項5に記載のモノクローナル抗体のフラグメントであって、配列表の配列番号1の配列で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと反応する抗原結合部位を含むことを特徴とする、抗体フラグメント。

7．請求項5に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、ハイブリドーマ。

8．生体試料において、ヒト安定化フィブリンの顆粒球エラスターゼ分解Dダイマー及び顆粒球エラスターゼ分解DD／E複合体を分析する方法であって、請求項1若しくは2に記載のモノクローナル抗体、請求項3に記載の抗体フラグメント、請求項5に記載のモノクローナル抗体、又は請求項6に記載の抗体フラグメントを感作した支持体を前記試料と接触させ、前記Dダイマー又はDD／E複合

体と前記感作支持体との凝集物の形成を検出することを特徴とする、免疫学的分析方法。

FIG. 1


700
600
500
400
300
200
100
0
V値
0
20
40
60
80
100
抗原の濃度（μg/ml）
a
b
c
d
e
f

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/01639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl$^6$ C07K16/18, C12N5/20, G01N33/53, G01N33/577 // C12P21/08, C12N15/06, (C12P21/08, C12R1:91)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl$^6$ C12N15/02-15/90, C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP, 2-117699, A (Merck & Co., Inc.), May 2, 1990 (02. 05. 90) & EP, 345906, A | 1 - 8 |
| A | JP, 5-48119, B (Iatron Laboratories, Inc.), July 20, 1993 (20. 07. 93)(Family: none) | 1 - 8 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| August 21, 1997 (21. 08. 97) | September 2, 1997 (02. 09. 97) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office<br>Facsimile No. | Authorized officer<br>Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

| 国際調査報告 | 国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９７／０１６３９ |
|---|---|

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl$^{6}$　C07K 16/18, C12N 5/20, G01N 33/53, G01N 33/577 //
C12P 21/08, C12N 15/06, (C12P 21/08, C12R 1:91)

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl$^{6}$　C12N 15/02 - 15/90, C12P 21/00, C12P 21/02, C12P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＢＩＯＳＩＳ ＰＲＥＶＩＥＷＳ，　ＷＰＩ，　ＣＡＳ ＯＮＬＩＮＥ

C.　関連すると認められる文献

| 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 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| A | JP,2-117699,A（メルク エンド カムパニー インコーポレーテツド）<br>2.5月.1990 (02.05.90)<br>&EP,345906,A | 1－8 |
| A | JP,5-48119,B（株式会社 ヤトロン）<br>20.7月.1993 (20.07.93)<br>ファミリー無し | 1－8 |

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　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文献

| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 |
|---|---|
| ２１．０８．９７ | 02.09.97 |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）<br>郵便番号１００<br>東京都千代田区霞が関三丁目４番３号 | 特許庁審査官（権限のある職員）<br>小暮　道明　　４Ｂ　９３５８<br>電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９ |

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９２年７月）