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5		(11) 国際公開番号	WO 91/06857
G01N 33/53, 33/577, 33/543	A1	(43) 国際公開日	1991年5月16日(16. 05. 1991)

(21) 国際出願番号 PCT/JP90/01412
(22) 国際出願日 1990年11月2日(02. 11. 90)

(30) 優先権データ
特願平1/284919 1989年11月2日(02. 11. 89) JP
特願平1/284920 1989年11月2日(02. 11. 89) JP

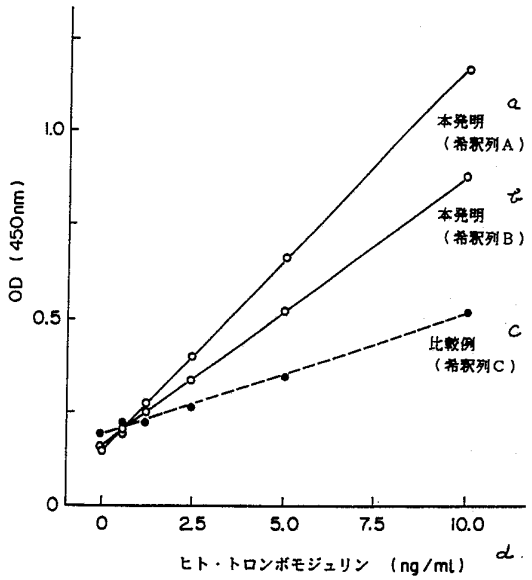
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED)〔JP/JP〕
〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
松沢公彦 (MATSUZAWA, Kimihiko)〔JP/JP〕
〒733 広島県広島市西区井口1-4-24-204 Hiroshima, (JP)
長谷川了一 (HASEGAWA, Ryoichi)〔JP/JP〕
〒740 山口県岩国市尾津町1-28-5-302 Yamaguchi, (JP)
(74) 代理人
小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.)
〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館
小田島特許事務所 Tokyo, (JP)

(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), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許),
IT(欧州特許), JP, NL(欧州特許), SE(欧州特許), US.

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : IMMUNOASSAY OF HUMAN THROMBOMODULIN, AND REAGENT AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称 ヒト・トロンボモジュリンの免疫学的測定方法、そのための試薬及びそのためのキット



a...this invention (dilution series A)
b...this invention (dilution series B)
c...comparative (dilution series C)
d...human thrombomodulin

(57) Abstract

A method of immunoassaying human thrombomodulin in a specimen by the sandwich technique, wherein one of an antibody (first antibody) immobilized on an insoluble carrier and a labeled antibody (second antibody) is a polyclonal antibody which recognizes human thrombomodulin while the other of them is a monoclonal antibody which recognizes human thrombomodulin.

(57) 要約

試料中のヒト・トロンボモジユリンをサンドイッチ法により免疫学的に測定する方法において、不溶性担体に固定化した抗体（第１抗体）と標識化した抗体（第２抗体）は、いずれか一方がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である。ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法。

そのための試薬及びそのためのキット。

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

明　　細　　書

1　[発明の名称]

ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法、そのための試薬及びそのためのキツト

2　[特許請求の範囲]

a．産業上の利用

本発明は、試料、殊にヒト検体中のヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定に関する。更に詳しくは試料中に微量存在するヒト・トロンボジユリンを免疫学的に高感度で、正確に且つ容易に測定する方法、そのための試薬及びそのためのキツトに関する。

b．従来技術

トロンボモジユリンは、１９８１年にシー・テイー・エスモンらによつて、ウサギ肺の血管内皮細胞からトロンビンによるプロテインＣの活性化を著しく促進するコフアクター蛋白質として発見され[C. T. Esmon, W. G. Owen : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, ２２４９～２２５２（１９８１）]、翌年精製された[N. L. Esmon, W. G. Owen, C. T. Esmon: J. Biol. Chem., 257, ８５９～８６４（１９８２）]。その後ヒト・トロンボモジユリンも肺および胎盤から精製され [S. Kurosawa, et al. : Thromb. Res. 37, ３５３～３６４（１９８５）など]、ヒト胎盤からのトロンボモジユリンは、分子量が還元剤の存在下１０５，０００、非存在下７５，０００である糖蛋白質であることが報告された。トロンボモジユリンは、動脈、静脈、毛細血管、リンパ管の内皮細胞の細胞膜上にある膜蛋白質で、脳をのぞいたほとんどの臓器中に存在するが、特に肺と胎盤に多く存在することが知られている。またその生理作

用は、脈管の内皮細胞上でトロンビンの血液凝固促進作用を凝固阻害作用へと転換する生理活性物質であることが知られている。すなわちトロンボモジユリンは細胞膜上でトロンビンと１：１の複合体を形成することによりトロンビンはその凝固因子としての性質を失うとともにプロテインＣ活性促進作用を発現し、この活性化プロテインＣを介して血液凝固因子中の活性型第Ｖ因子、活性型第Ⅷ因子を不活性化することにより、凝固阻害作用を示すことが知られている。更にトロンボモジユリンは活性型第Ｘ因子に直接結合してその活性を阻害することによりプロトロンビンからのトロンビン生成を抑制することも知られている。

以上述べた如き生理作用を有するトロンボモジユリンは、血液凝固・線溶系の新たな調節因子として注目されている。したがつて、溶液中の微量なトロンボモジユリンを容易かつ正確に測定することは、循環器系の基礎医学、臨床医学の研究において果たす役割は非常に大きい。

殊にヒト検体中に微量存在するヒト・トロンボモジユリンを高感度で測定することは、血管壁の障害を伴なう各種の疾患の病態をモニターできる可能性を有している。

近時、試料中、殊にヒト検体中の微量成分を測定する方法として抗原抗体反応を利用する免疫学的測定方法が用いられている。この測定方法を診断薬として医療現場での多数検体の測定などに用いる場合、主な必要条件として次の点が挙げられる。すなわち検体中の微量成分を測定しえる感度があること、測定対象のみを測定する特異性があること、再現性よく測定値が得られること、かつ測定操作が容易、簡便などである。

上記した観点から従来知られているヒト・トロンボモジユリンの測定手段を見る時必ずしも充分満足しえないのが現状である。すなわち、エ

ツチ・イシイらの放射免疫測定法(radiommunoassay、以下ＲＩＡと略)の報告(H. Ishii et al. : J. Clin. Invest., 76, 2178（1985）, H. Ishii et al., Blood 67, 362（1986））がなされているが、この報告では、ヒト・トロンボモジユリンに対するポリクローナル抗体と^{125}Ｉ－トロンボモジユリンを用いた競争法が記載されているが、その感度は１～２.５ng／mℓ程度であり、また測定時間は１９時間以上必要とされることから、この測定方法は微量のトロンボモジユリンを正確にかつ簡便に測定するには不満足な方法であつた。また抗体としてポリクローナル抗体のみを用いるため特異性の点でも危険性が考えられる。

その後、サンドイツチ法による免疫学的測定方法が報告された。西岡らは、ヒト肺から精製したトロンボモジユリンを抗原として得たポリクローナル抗体を用いた方法を報告している［西岡淳二ら、第１０回日本血栓止血学会要旨集、５１頁、（１９８７）］。この方法では抗体としてポリクローナル抗体のみを用いていることから前記方法と同様、ポリクローナル抗体の特異性の点で問題が予想される。更に特開昭６４－４５３９８及び特開昭６４－４７３９１号広報が開示されている。ここでは２種のモノクローナル抗体のみを用いたサンドイツト法が示されているが、本発明者らの検討によれば、必ずしもモノクローナル抗体のみを使ったサンドイツチ法によるヒト・トロンボモジユリンの測定は実際の医療現場で使用する測定方法としては充分満足すべきものではなかつた。すなわち、試料中の微量なヒト・トロンボモジユリンを測定するに必要な感度を短時間にえることが出来なかった。

c．発明が解決使用とする課題

そこで本発明者らは、前述した従来技術の問題点を解決し、診断薬として必要条件を備えた免疫学的測定方法、試薬及びキツトを提供するため研究を進めた。

本発明の第１の目的は、試料中、殊にヒト検体中の微量のヒト・トロンボモジユリンを高感度で測定することができる免疫測定方法、試薬及びキツトを提供することにある。

本発明の第２の目的は、試料中のヒト・トロンボモジユリンを実際の医療、殊に臨床の場において、使用しうる簡便で且つ短時間で測定することができる免疫学的測定方法、試薬及びキツトを提供することにある。

本発明の他の目的は試料中のヒト・トロンボモジユリンを、測定する人や測定条件（時間、温度）の影響を受けるので、また使用する抗体の特異性に出来る限り影響されることなく、安定して高感度で測定することができる免疫学的測定方法、試薬及びキツトを提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、以下の説明から一層明らかとなるであろう。

ｄ．課題を解決するための手段

かくして本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的及び利点は、下記ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法、免疫学的測定試薬及び免疫学的測定キツトによつて達成されることが見出された。

[Ｉ]ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法；

試料中のヒト・トロンボモジユリンをサンドイツチ法により免疫学的に測定する方法において、不溶性担体に固定化した抗体（第１抗体）と標識化した抗体（第２抗体）は、いずれか一方がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジ

ユリンを認識するモノクローナル抗体であるヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法。

[Ⅱ]ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定試薬；

試料中のヒト・トロンボモジユリンを、不溶性担体に固定化した第1抗体及び標識化した第2抗体を使用して免疫学的に測定するための試薬であつて、一方の抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方の抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする免疫学的測定試薬。

[Ⅲ]ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定キツト；

試料中のヒト・トロンボモジユリンを免疫学的に測定するためのキツトであつて、

(i) 不溶性固体担体に固定化したヒト・トロンボモジユリンを認識する抗体（第1抗体）、

(ii) 標識化したヒト・トロンボモジユリンを認識する抗体(第2抗体)、但し、上記第1抗体及び第2抗体は、いずれか一方がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である。

(iii) 酵素で標識化した場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤、

(iv) 希釈剤、

(v) 洗浄剤及び

(vi) 標準物質

よりなる免疫学的測定キツト。

以下本発明について更に詳細に説明する。

［Ａ－１］抗原の調製及び精製

本発明に使用されるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を得るための抗原としてのヒト・トロンボモジユリンは、原則としては天然の材料から抽出した天然型のものが用いられるが、天然型のヒト・トロンボモジユリンと同等の免疫学的性質をもつものであれば蛋白工学的又は遺伝子工学的手法によつて得られるものでもよい。その例として、ハプテンすなわち天然型のヒト・トロンボモジユリンの抗原決定部位を含むペプチドであつてもよい。更に、ヒト・トロンボモジユリンを蛋白分解酵素、例えばエラスターゼ、トリプシンなどによつて得られるフラグメントであつてもよい。

天然型のヒト・トロンボモジユリンを得るための材料としては、例えばヒト肺、ヒト血管あるいは培養ヒト・血管内皮細胞とその培養上清などが挙げられるが入手が比較的容易な点から好ましくはヒト胎盤である。分離・精製は、通常用いられる蛋白分離技術、例えば塩析、抽出、遠心分離、限外濾過、各種のクロマトグラフイー等を組み合せて行うことができるが、前記したエス・クロサワらの文献記載の方法は、その１例である。

かくして得られた精製ヒト・トロンボモジユリンを抗原として使用し、以下に説明する方法によりポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を調製することができる。

［Ａ－２］ヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体の調製；

本発明において使用されるヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体は、前記の如くして得られたヒト・トロンボモジユリン

或いはそのフラグメントを抗原として、それ自体知られた方法に従つて得ることができる。

例えば「日本生化学会編、続生化学実験講座、５巻、１－１０頁、東京化学同人、１９８６」記載の方法によつて得られる。

免疫動物としては、哺乳動物であれば特に限定されるものではないが、例えばヒト・トロンボモジユリンを抗原とする場合、山羊、ウサギ、モルモツテ、ラツトあるいはマウスなどが好んで挙げられる。

免疫した後、採血し、抗血清を得る。得られた抗血清を通常使用される方法、例えば塩析、抽出、遠心分離、限外濾過、種々のクロマトグラフイーなどを組合せて精製されたポリクローナル抗体を得ることができる。

［Ａ－３］ヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体の調製；

本発明において使用されるヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体は、前記ヒト・トロンボモジユリン或いはそのフラグメントを抗原として使用し、それ自体知られたケーラーとミルシユタインによる細胞融合法（G. Kökler and Milstein, Nature(London), ２５６, ４９５－４９７（１９７５））により作製されたハイブリドーマを培養して分泌させ、その培養液から分離することにより調製される。すなわち、ヒト・トロンボモジユリンでマウスを免疫した後、このマウスのリンパ球をマウス・ミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを作製する。このようにして得たハイブリドーマは、融合された種々のリンパ球のそれぞれに応じて種々のモノクローナル抗体を産生するので、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングによつて

クローン化されたハイブリドーマとして単離する。このクローン化ハイブリドーマをイン・ビトロで培養してモノクローナル抗体を分泌させる。この培養上清から抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体を分離する。

本発明において、モノクローナル抗体としては、ヒト・トロンボモジユリンとトロンビンとの複合体形成に対する阻害作用を有し且つヒト・プロテインCの活性化に阻害作用を有するものを使用するのが好ましい。このようなモノクローナル抗体は公知であり、例えば、I.Maruyama et al.:J. Biol. Chem., 260, 15432（1985）記載のモノクローナル抗体特開昭64－45398号公報記載のTM－A73と表示されたモノクローナル抗体がある。

前記した阻害作用を有するモノクローナル抗体を使用することが好ましい理由は、試料中のヒト・トロンボモジユリンとトロンビンとの複合体又はそのフラグメントを認識せず、遊離のヒト・トロンボモジユリン又はそのフラグメントを直接認識し測定できるからである。

［B］第1抗体及び第2抗体の調製；

本発明においては、上記ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を不溶性担体に固定化した抗体（第1抗体）或いは標識化した抗体（第2抗体）に用いるが、その組合せは一方をポリクローナル抗体とし、他方をモノクローナル抗体として用いる。この組合せにより、ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法においてポリクローナル抗体の持つ高い親和性とモノクローナル抗体の持つ高い特異性を同時にに発現させることが可能である。その結果、感度、特異性、再現性に優れた簡便な免疫学的測定方法を得ることができる。

しかしながら、本発明者らの研究によれば、固定化した抗体（第１抗体）が、ヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、標識化した抗体（第２抗体）がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である組合せが、特に好ましい結果が得られることがわかつた。

［Ｂ－１］固定化した抗体の調製

不溶性（固体）担体に固定化された抗ヒト・トロンボモジユリン抗体（第１抗体）は以下のようにして得ることができる。

不溶性固体担体としては、天然から得られる重合体とその誘導体、合成重合体とその誘導体を挙げることが出来る。前者には、多糖類とその誘導体、例えばセルロース、セフアデツクス、セフアロース、カルボキシメチルセルロース、ニトロセルロース、酢酸セルロース、デキストランなど、あるいはガラス、シリカゲルなどの無機重合体などがある。また後者にはビニル系重合体、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ＡＢＳ、ポリフツ化ビニル、ポリアミン－メチルビニルエーテル－マレイン酸共重合体、エチレン－マレイン酸共重合体など；縮合系重合体、例えば６－ナイロン、６，６－ナイロンなどのポリアミド、ポリエチレン・テレフタレートなどのポリエステル、アミノ酸重合体などがある。また、その形状は試験管、マイクロタイタープレート、ビーズあるいはメンブレンなど特に限定されない。かくなる不溶性固体担体に固定される抗体としては、前述の如き抗ヒト・トロンボモジユリン抗体の抗体分子、抗原結合能が失われないそのフラグメント例えば$F(ab')_2$、Ｆab′、Ｆab或いはＦacbなど；あるいは抗原結合能が失われない抗体分子またそのフラグメントの誘導体である。これらの抗体を不

溶性固体担体へ固定する方法は、物理的吸着法、例えばポリスチレンの固体担体を抗ヒト・トロンボモジユリン抗体の溶液に浸漬する方法など；イオン結合法、例えばイオン交換樹脂あるいはアミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、リン酸基などのイオン化する官能基を有する固体担体を用いる方法など；あるいは化学反応による共有結合法、例えばカルボキシ・クロライド法、カルボジイミド法、無水マレイン酸誘導体法、イソシアネート誘導体法、臭化シアン活性化多糖法、ジアゾ法、活性エステル法、架橋試薬による担体結合法（架橋試薬としてグルタールアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアネート、コハク酸イミド、マレイミド化合物など）など；更には、ヒト・トロンボモジユリンに対しては結合能はないが抗ヒト・トロンボモジユリン抗体に対し生物学的反応により結合し得る物質を介して結合する方法、例えばプロテインA結合固体担体を用いる方法などである。

さらに本発明者らの研究によれば、不溶性固体担体としてその表面が鏡面化されたもの、すなわち表面が極めて平滑なものを使用することにより、非特異的吸着が低くなり、ヒト・トロンボモジユリンの測定感度が向上することがわかつた。

従来、高感度な測定のための不溶性固体担体としては、むしろその表面を研磨して粗くし、表面積を大きくしたものが用いられてきた。確かに表面積を大きくすると、抗体の固定量を増加させるというメリツトがあるが、しかしながら非特異的吸着も大きくなるというデメリツトがあつた。本発明者らの研究したところによれば、ヒト・トロンボモジユリンの測定においては、中心線平均粗さ（Ｒａ）が１．５μｍ以下である鏡面化された固体担体は、抗体の固定量は粗面化された固体担体とほぼ

同等であるが、非特異的吸着は飛躍的に減少し、ヒト・トロンボモジユリンの高感度測定に遊離であることを見出した。かかる鏡面化された不溶性固体としては、その材質形状は特に制限されているが例えばポリスチレンビーズ、ガラスビーズがあげられる。

中心線平均粗さ（Ｒａ）は、粗さ曲線からその中心線の方向に測定長さℓの部分を抜取り部分の中心線をＸ軸、縦倍率の方向をＹ軸とし、あらさ曲線をｙ＝ｆ（ｘ）で表わしたとき、次式で与えられるＲａの値をミクロン単位で表わした値を意味する。

$$Ra = \frac{1}{\ell} \int_0^{\ell} / f(x) / dx$$

この中心線粗さ（Ｒａ）については、ＪＩＳ　Ｂ　０６０１－１９８２（日本）＜ＡＮＳＩ　Ｂ４６.１－１９７９（ＵＳＡ）及びＲ４６８－１９６６（ＩＳＯ）に説明されている。

なお以下の本発明の実施例では、不溶性担体は東京精密（株）製の表面粗さ計サーフコム®(Surfcom５７０Ａ）を用いて表面粗さを測定した。

［Ｂ－２］標識化した抗体の調製；

本発明において標識化した抗ヒト・トロンボモジユリン抗体（第２抗体）は、以下のようにして得ることができる。

標識化すべき抗体としては、抗体全分子のみならず、抗原結合能が失われないそのフラグメント例えばＦab′、Ｆ(ab′)$_2$又はＦacbフラグメントなどを使用することができる。

かかるフラグメントは、Ｆ(ab′)$_2$やＦab′の場合には、上述のようにして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を公知の方法、たとえば該抗体をペプシンで分解して

$F(ab')_2$フラグメントとなすか、更に
$F(ab')_2$フラグメントを還元処理することによつてFab'フラグメントとなすことにより得られる(II. Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89, 230 (1960) : P. Parham., J. Immunol., 131, 2895 (1983) など)。

標識化に使用される標識物質としては、ラジオアイソトープが良く知られているが、工業的な生産を考えると、公害に結びつく可能性がある点、使用期限がある点、また使用者の特殊訓練が必要な点で、これらの欠点がなくかつ増巾作用のある酵素が適している。

またかかる抗ヒト・トロンボモジユリン抗体と結合させる酵素としては、例えばリゾチーム、マレート・デヒドロゲナーゼ、グルコース－6－フオスフエート・デヒドロゲナーゼ、パーオキシダーゼ、グルコース・オキシダーゼ、アルカリフオスフアターゼ、ルシフエラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、アルコール・デヒドロゲナーゼ、インベルターゼなどを例示することが出来る。これら酵素と前記抗ヒト・トロンボモジユリン抗体との結合抗体の結合方法は、グルタルアルデヒド法、過ヨーソ酸法、マレイミド法など通常の方法に従うことが出来る。例えばマレイミド化された抗体又は抗体のフラグメントとSH化された酵素を溶液中で反応することにより行うことができる。抗体又は抗体のフラグメントのマレイミド化は、例えばサクシンイミジル4－(N－マレイミドメチル)シクロヘキサンカーボネート(SMCC)、スルホサクシンイミジル4－(N－マレイミドメチル)シクロヘキサンカーボネート(スルホSMCC)、サクシンイミジルーメタマレイミドベンゾエート(MBS)、サクシンイミジル6－マレイミドヘキサノエート(EMCS)などにより

マレイミド化することができる。酵素へのＳＨ基の導入は公知の方法(例えば石川編「酵素免疫測定法」医学書院参照）に従うことができる。例えば酵素とＳ－アセチルメルカプト無水コハク酸（ＡＭＳＡ）又はＮ－サクシンイミジル－３－（２－ピリジルチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）などと反応することにより得られる。

かくして得られた酵素と抗ヒト・トロンボモジユリン抗体との結合抗体（第２抗体）、すなわち酵素標識化抗体における酵素の標識数は、分子量の測定や吸光度、酵素活性などの測定などにより求めることができる。たとえば、酵素がペルオキシダーゼの場合には、抗体とペルオキシダーゼに由来する２８０nmの吸光度と、ペルオキシダーゼに由来する４０３nmの吸光度を測定することにより標識数を求めることができる(E. Ishikawa et al., J. Immunoassay., 4, ２０９－３２７,（１９８３)、ｐ２４３参照）。

すなわち４０３nmでは抗体の吸光度はなく、ペルオキシダーゼのみ由来の吸光どである故に、該吸光度からペルオキシダーゼの濃度を算出する。２８０nmでは抗体、ペルオキシダーゼ両者由来の吸光度であることから、抗体の濃度は測定された２８０nmの吸光度から、４０３nmの吸光度によつて算出されたペルオキシダーゼの濃度と２８０nmでのペルオキシダーゼの分子吸光係数から算出されるペルオキシダーゼの２８０nmの吸光度の寄与分を引いた値と、２８０nでの抗体の分子吸光係数から算出する。かくして得られたペルオキシダーゼと抗体の濃度から抗体へのペルオキシダーゼの標識数を求めることが出来る。

かくして本発明の標識した抗ヒト・トロンボモジユリン抗体の標識数を求め、測定感度との相関を研究した結果、抗体全分子、Ｆab′、

$F(ab')_2$又はFacbフラグメントに酵素が、抗体1分子当り平均1.0分子以上結合のものであればよいが、かなでも1.5分子以上結合したもの（多標識化抗体）がより好ましい結果を生ずることが明らかとなつた。試料中のヒト・トロンボモジユリンを測定するに充分な測定感度を得るためには、該多標識化抗体は酵素が抗体全分子、Fab'、$F(ab')_2$又はFacbフラグメント1分子当り平均1.5分子以上結合したものがよく、より好ましくは2分子以上である。

かかる多標識化抗体は、たとえば前記マレイミド化抗体又は抗体フラグメントとSH化された酵素とを反応させることによつて製造される。該反応条件としては、たとえば該抗体と該酵素とのモル比1：1以上、好ましくは1：3以上、反応温度4～40℃、好ましくは4～30℃、反応pH5.5～7.5、反応時間5～48時間の条件に従うことができるが、本発明の多標識化抗体がえられれば前記反応条件に限定されるものではない。この様にして得られた多標識化抗体は例えば、ゲルクロマトグラフイーを用いて反応液より分離精製することができる。

かくして得られた本発明の酵素で標識した抗体は、試料中の微量のヒト・トロンボモジユリンを測定するに必要な測定感度で正しく測定することが出来る。

［C］　免疫学的測定方法：

本発明の測定方法における試料、殊にヒト検体としては、通常の臨床サンプル、例えば血清あるいは血漿形態の血液、関節液、リンパ液、胸腺水、腹水、羊水、細胞組織液、骨髄液、尿などのヒト・トロンボモジユリンを含有する液体であればいずれであってもよい。好ましいのは血清または血漿形態の血液である。

本発明の免疫学的測定方法においては、前記第１抗体及び第２抗体を組合せて使用し、いわゆるサンドイツチ法により、試料中のヒト・トロンボモジユリンを測定する。

サンドイツチ法としては大きく１ステツプサンドイツチ法と２ステツプサンドイツチ法とがある。１ステツプサンドイツチ法は、測定しようとするヒト・トロンボモジユリンを含む試料、不溶性担体に固定化した抗体（第１抗体）及び標識化した抗体（第２抗体）を同一反応系で抗原・抗体反応を行なわせ、固定化抗体・抗原・標識化抗体の複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、標識物質の量を測定する方法である。この場合、試料（検体）と固定化抗体と標識化抗体とを同時に存在させて反応させてもよいし、先ず試料と固定化抗体とを反応させてから標識化抗体を添加して反応させてもよい。また、試料と標識化抗体とを予め反応させてから固定化抗体を添加してもよい。いずれにしても洗浄操作前に固定化抗体・抗原・標識化抗体の複合体を形成しさえすればよい。一方、２ステツプサンドイツチ法は、試料と固定化抗体とを先ず反応して固定化抗体・抗原の複合体を形成せしめ、しかる後試料を除去、洗浄してから標識化抗体を添加して固定化抗体・抗原・標識化抗体の複合体を形成せしめる。次いで洗浄操作の後、標識物質の量を測定する方法である。　ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いる本発明によれば、１ステツプサンドイツチ法あるいは２ステツプサンドイツチ法により試料中における微量なヒト・トロンボモジユリンを高い感度、特異性をもって再現性よく簡便に測定することが出来る。

上記における免疫反応に用いられる溶媒としては、反応に悪影響を与えない通常の各種のものいずれであってもよい。例えばリン酸緩衝液、

トリス・塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などのｐＨが６．０から８．０程度のものを用いるのが好ましい。

測定に際しての免疫反応温度条件は、構成要素である蛋白質の性質を変性させず、かつ免疫反応を著しく抑制しない限り特に制限はないが、一般には５０℃以下、好ましくは約４℃～４５℃程度の温度条件下に約５分から５時間程度、好ましくは約３０分から３時間、を要して反応を行えばよい。

［Ｄ］　免疫学的測定キツト：

本発明においては、不溶性固体担体に固定化した抗ヒト・トロンボモジユリン抗体（第１抗体）、標識化した抗ヒト・トロンボモジユリン抗体（第２抗体）に、免疫学的測定に際し必要なその他のものを組み合せて、ヒト・トロンボモジユリンの量を測定するためのキツトを構成することができる。

本発明の免疫学的測定キツトにおいて、（ｉ）前記第１抗体及び（ii）第２抗体と共に組合される他の試剤としては、下記の（iii）～（vi）のものが挙げられる。

（iii）　酵素で標識化した場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤

（iv）　希釈剤

（ｖ）　洗浄剤及び

（vi）　標準物質

以下これらについて説明するが、これらは通常免疫学的測定に使用されるものであればよい。

酵素活性を測定するための基質および反応停止剤：

本発明の測定キットおよび測定方法において、標識物質として酵素を使用した場合に使用される前記基質および反応停止剤は、標識物質としての酵素の種類に対応して、免疫学的測定において通常知られているものを使用することができる。その例としては、ペルオキシダーゼの基質として2，2′－アジノ－ジ－［3エチルベンツチアゾリンスルフオン酸］ジアンモニウム塩（ＡＢＴＳ）、オルトフエニレンジアミン（ＯＰＤ）、3，3′，5，5′－テトラメチルベンヂジン（ＴＭＢ）等があり、停止剤としてはH_2SO_4、ＨＣｌ、酢酸、グリシン緩衝液（ｐＨ１０．３）、フツ化ナトリウム溶液等がある。

アルカリフオスフアターゼの基質としては４－ニトロフエニルフオスフエート、４－メチルウンベリフエリルフオスフエート、ＮＡＤＰ等がある。

β－ガラストシダーゼの基質としては２－ニトロフエニル－β－Ｄ－ガラクトシド、４－メチルウンベリフエリル－β－Ｄ－ガラクトシド等がある。停止剤としては、０．１Ｍ　Na_2CO_3などがある。

希釈剤：

本発明の測定キットおよび測定方法に使用される希釈剤としては、免疫学的測定において通常使用されるものであればよい。該希釈剤として免疫反応に悪影響を与えないものであればよく、例えば、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などのｐＨが６．０～８．０の範囲のものが主として使用される。

洗浄剤

本発明においては、免疫反応測定において一般に使用される洗浄剤をそのまま使用することができる。しかしながら本発明者らによれば、前

記の如く第１抗体及び第２抗体を組合せると共に特定の界面活性剤がヒト・トロンボモジュリンの測定における免疫反応を抑制せず、免疫反応に関与しない物質や標識抗体の非特異的吸着のみを抑制する効果があることがわかった。

本発明においては、このような界面活性剤を免疫活性剤を免疫反応液中に存在させたり、洗浄液中に存在させると高感度測定に有利である。免疫反応が２段反応の場合には、いずれに存在させることもできるが、２段目の反応に存在させるのが好ましい。

本発明に用いられる界面活性剤は両面界面活性剤及び／又はＨＬＢ値（Hydraphile Lipophile Balance）が１６以上の非イオン界面活性剤である。

ＨＬＢが１６未満の界面活性剤は、非特異的吸着を抑制すると同時に免疫反応を抑制してしまい、好ましくない。

ＨＬＢ値が１６以上の非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシアルキレンアルキルアリールエーテル系、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル系、ポリオキシアルキレン多価アルコール脂肪酸エステル系、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンポリオール系などのＨＬＢ値が１６以上のものであればよく、例えばトリトンＸ－３０５（ＨＬＢ17.3）、トリトンＸ－４０５（ＨＬＢ１７.９）、エマルゲン９５０（ＨＬＢ１８.２）、エマルゲン９８５（ＨＬＢ１８.９）、Tween２０（ＨＬＢ１６.７）、ブルロニツクＦ６８（ＨＬＢ２９）、テトラニツク７０７（ＨＬＢ＞２０）などが挙げられる。

両性界面活性剤としては、例えば、カルボン酸塩型（ベタイン型）、スルホン酸塩型（スルホベタイン型）およびリン酸塩型のものなどが挙

げられる。スルホベタイン型は発癌性が問題になることもあり、その使用は工業的には必ずしも好ましいとは言えない。好ましくはベタイン型両性界面活性剤であり、一般式$R_1R_2R_3NR_4$［式中、R_1はC_5～C_{22}アルキル基、R_2およびR_3はC_1～C_5アルキル基、R_4は$COO^{\ominus}$置換基を有するC_1～C_5アルキル基を表わす］で示されるベタイン型である。更に好ましくは、R_2、R_3がそれぞれメチル基であり、R_4が$CH_2COO^{\ominus}$である。この種の好適な界面活性剤としては、R_1がラウリル基である「アンヒトール２４Ｂ」（商品名）が花王株式会社より販売されている。

これらの界面活性剤は単独で使用することもできるし、二種以上の界面活性剤を併用することもできる。

洗浄液等における界面活性剤の濃度は１重量％以下であり、好ましくは０．００２５～１重量％である。

本発明においては、０．１重量％以下の界面活性剤量でも洗浄効果に優れ、更に洗浄時の泡立ちが少くなり、その結果泡立ちが激しくて、泡の除去が煩雑となったり、その除去が不十分になって逆に洗浄としては不十分になったりするといった問題も少なくなるので、好ましい。

これら界面活性剤の溶媒としては水、生理食塩水、あるいはリン酸緩衝液のような緩衝液など、測定に悪影響を及ぼさないものならいずれであってもよい。

標準物質

本発明の測定キツトおよび測定方法において使用される標準物質は第１抗体及び第２抗体のそれぞれが認識する抗原決定部位をいずれも少なくとも１つ以上有する蛋白質またはポリペプチドが用いられる。

その代表的なものの１つは、天然の材料から抽出した天然型のヒト・トロンボモジユリンまたはそのフラグメントである。

天然型のヒト・トロンボモジユリンを得るための材料としては、例えばヒト胎盤、ヒト肺、ヒト血管あるいは培養ヒト・血管内皮細胞とその培養上清などが挙げられるが入手が比較的容易な点から好ましくはヒト胎盤である。分離・精製は、通常用いられる蛋白分離技術、例えば塩析、抽出、遠心分離、限外濾過、各種のクロマトグラフイー等を組み合せて行うことができるが、前記したエス・クロサワらの文献記載の方法は、その１例である。

また、ヒト・トロンボモジユリンのフラグメントは、前記の如くして得られた天然型のヒト・トロンボモジユリンを蛋白分解酵素、例えばエステラーゼ、トリプシンなど或いは蛋白分解試薬、例えば臭化シアンなどを用いて、それ自体知られた方法によって得ることができる［例えばS.Kurosawa et al., J.Biol.Chem., 262, 2206（1987）参照］。

さらに上記天然型のみならず、蛋白工学的または遺伝子工学的手法によって得られた前記性質を有するポリペプチドであってもよい。

蛋白質の使用

本発明者らの研究によれば、ヒト・トロンボモジユリンの測定においては、免疫反応溶液に分子量１.６万～５.０万及び等電点１.０～５.０である蛋白質又はそれを含む混合物を存在せしめ、これらの免疫反応溶液における最終濃度が０.００５～０.８重量％となるように調整すると、非特異的吸着が抑制され、したがってバツクグランドが著しく低くなり高い測定感度が得られることがわかった。かかる蛋白質又はそれを含む

混合物は、本発明の免疫測定試薬或いはキツトに免疫反応溶液中に前記所定の量となるように含有せしめることもできる。かかる蛋白質としては、例えばカゼイン、ペプシン、オボグリコプロテイン、オロソムコイドなどがあげられる。分子量１．６万以下の蛋白質を用いた場合特異的吸着が上昇する結果を得ており、また５．０万以上の分子量では免疫非特異的反応の低減が不充分かつ特異的免疫反応の低下が見られることにより、分子量を１．６万～５．０万と定めた。また等電点に関しても５．０以上の蛋白質を添加した場合非特異的吸着が上昇し、また等電点が１．０より低い場合特異的反応が抑制されるために等電点を１．０～５．０と定めた。

また種々の濃度の該蛋白質溶液たとえばスキム・ミルクを用いて免疫測定方法を行なったところ、０．００５重量％未満で抗原が０であるにもかかわらず非特異的反応が著しく増加し、また、１ケ月間、該蛋白質たとえばスキムミルク溶液の冷蔵庫における保存試験を行なった結果、０．８重量％より大ではスキムミルク溶液が再溶解不能の沈澱を生じたため、その保存安定性の面から０．８重量％以下と定めた。以上２つの事実を考慮し、試薬の安定性を満足し、かつ非特異的反応を効果的に減ずるか該蛋白濃度は０．００５～０．８重量％の範囲が適当である。このような混合物としては、例えば主成分として前記タンパク質１０～６０重量％、好ましくは２０～５０重量％、糖（例えば乳糖）３０～８０重量％、好ましくは４０～６０重量％、その他脂肪（例えば０．５～２重量％）、灰分（例えば５～１２重量％）、水分（例えば２～８重量％）などを含むことができる。このような混合物として典型的なのはスキムミルクである。スキムミルクはタンパク質としてカゼインを含むもので

あるが、カゼインを単独で使用した場合に比べて、スキムミルクは、免疫反応溶液中における分散性が良く、非特異的反応を抑制する効果が高く、温度４℃における保存性が良い（沈澱が生じにくい）という特徴を有する。なお、本発明に用いるスキムミルクとしては、脱脂したミルクであれば、何の由来の乳であっても良い。一番典型的なもののひとつとしては、市販されているＤifco社製のスキムミルクである。

なお本発明において、タンパク質の「分子量」は浸透圧法によって測定した分子量を意味し、具体的には高分子溶液と純溶媒と溶媒分子は自由に透すが、溶出高分子は透さない半透膜を境として接した際に両液の浸透圧差が高分子の分子量のパラメータとなることを利用してタンパク質の分子量を測定するもので、本発明では６．６６Ｍ尿素溶液を用いて４℃で測定した値である。また「等電点」はタンパク質をその等電点に従って分離するクロマトフオーカシング法によって測定した値をいい、具体的にはＰＢＥ９４（フアルマシア製）ゲルを充填したカラム（０．５ｃｍφ×４５ｃｍ）を用い溶出液０．０２５Ｍイミダゾール塩酸（ｐＨ７．４）で測定した値をいう。

前記蛋白質は、免疫反応溶液中において、前記濃度となるように使用されるが、キツトの場合、蛋白質は、標準物質、第２抗体又は希釈剤のいずれかに少なくとも含有せしめておくのが好ましい。含有量は免疫反応溶液中において前記濃度となるようにして適宜決められるべきである。

本発明方法でのヒト・トロンボモジユリンの測定における、免疫反応溶液中に、前記した分子量１６，０００～５０，０００及び等電点１．０～５．０である蛋白質又はそれを含む混合物とともにγ－グロブリンまたはγ－グロブリン誘導体を免疫反応溶液における最終濃度が０．００

２５～０．１重量％の濃度で存在せしめる時、非特異的吸着の抑制すなわちバツクグランドの低下が更に得られ、該蛋白質単独で用いられる場合に比較して更に高い測定感度が得られるので好ましい。γ－グロブリンとしては、ヒトまたは哺乳動物、例えば牛、ウサギ、ヤギ、などの血清から分離されたものが挙げられるが、特にヒト・γ－グロブリンが好ましい。またγ－グロブリン誘導体としては、化学的に修飾された前記γ－グロブリン、例えばＳ－アルキル化γ－グロブリン、Ｓ－スルホ化γ－グロブリンなどが挙げられる。次にその添加量は、０．００２５重量％未満ではγ－グロブリン又はその誘導体の添加によるバツクグランドの低下は小さく、実質的に十分なその添加効果は得られない。また０．１重量％より多く添加しても０．１重量％添加した時以上の効果は認め難いことと、γ－グロブリンが比較的高価であるため製造コストの観点から添加量の上限を０．１重量％が適当である。以上の理由によって添加量は前記の範囲が適当である。

ｅ　発明の効果

かくして、本発明によれば、試料、例えば臨床サンプルなどの極く微量のヒト・トロンボモジユリンを高感度で精度よく、しかも簡便な操作で測定することができる。しかも測定の操作は比較的短かい時間で実施することができる。

殊に本発明によれば、試料検体中にヒト・トロンボモジユリンとトロンビンの複合体が存在していても、その存在によって遊離のヒト・トロンボモジユリンの測定の精度は、何等の影響を受けない。

図面の説明

第１図は、本発明におけるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗

体を組合せてヒト・トロンボモジユリンを測定した場合の検量線を示すものであり、参考のため本発明以外の抗体を組合せた場合の検量線も併せて示した。

第２図は、ヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定において、蛋白質の添加濃度と吸光度との関係を示すものである。

第３図は、ヒト・トロンボモジユリンの濃度と吸光度との関係（検量線）を示すものである。

ｆ　実施例

以下実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例１

家兎の皮下に、前記エス・クロサワらの文献記載の方法に従ってヒト胎盤から精製したヒト・トロンボモジユリン５００μgとフロイント完全アジユバンドとのエマルジヨンを投与した。１４日後にヒト・トロンボモジユリン２５０μgを同様にして皮下投与した。更に１４日間隔で２回同様に皮下投与し、１０日目に採血し、血清とした後、酵素免疫定量法、すなわちヒト・トロンボモジユリンを抗原とし第２抗体にホースラデイツシユパーオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体で、ヒト・トロンボモジユリンに対する抗体価を測定し３００万倍であることを認識した。その後、全血を採取、血清とし、それをプロテインＡ-セファローズ-４Ｂカラムで精製してヒト・トロンボモジユリンに対するポリクローナル抗体を取得した。

実施例２

１．抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体のマレイミド化

ヒト・トロンボモジュリンのトロンビンとの複合体形成に対する阻害活性を有し、かつプロテインCの活性化を阻害するモノクローナル抗体（特開昭６４－４５３９８号公報記載のTM-A７３）８３０μgのＰＢＳ溶液に、サクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサンカーボネート（ＳＭＣＣ）のＤＭＦ溶液（１０mg／mℓ）１３.９μℓを２５℃で滴下した。３０分間撹拌した後、セファデックスG-２５のカラム（1cm×４５cm）で溶離液として０.１Mリン酸緩衝液を用いて、ゲル濾過しマレイミド化されたモノクローナル抗体を得た。

２．ペルオキシダーゼのチオール基導入

ペルオキシダーゼ（東洋紡）１４３mgの０.１Mリン酸緩衝液（pH６.０）溶液１４.３mℓにS-アセチルメルカプト無水コハク酸のＤＭＦ溶液（６０mg／mℓ）１７６.４μℓを２５℃で撹拌下徐々に滴下し、６０分間反応させた。この溶液に０.１Mトリス塩酸緩衝液（pH７.０）５.７２mℓと０.１M　ＥＤＴＡ溶液（pH７.０）１.１４mℓ、１Mヒドロキシルアミン溶液（pH７.０）１１.４４mℓを加え３０℃で５分間撹拌した。溶液を透析チューブに入れ、０.１Mリン酸緩衝液（pH６.０）－５mM ＥＤＴＡを外液として４℃で二夜透析し、ＳＨ基の導入されたペルオキシダーゼ溶液を得た。

３．マレイミド化モノクローナル抗体とチオール基を導入したペルオキシダーゼの結合

マレイミド化モノクローナル抗体８３０μgとチオール基導入ペルオキシダーゼ溶液（４.０５mg／mℓ）１.０２mℓとを混合し、該混合液を限外濾過によって約６００μℓに濃縮、２５℃で２４時間反応させた。反応液をＨＰＬＣ（カラムＴＳＫ　Gel３０００ＳW）、溶離液ＰＢＳ

（pH７．２）で分離しペルオキシダーゼ結合モノクローナル抗体を得た。

得られたペルオキシダーゼ結合モノクローナル抗体の抗体とペルオキシダーゼのモル比は１：４．６であった。

実施例３

実施例１に記載の抗ヒト・トロンボモジユリン・ポリクローナル抗体を、０．１M炭酸緩衝液（pH９．５）で５μg／mℓの濃度に調整し、鏡面化されたポリスチレンビーズ（イムノケミカル：イムノビーズ、Surfcom　５７０Ａ（東京精密社製）で測定した表面中心線平均粗さ（Ra）：１．３μm）を浸し４℃で１７時間静置した。ビーズを１％ＢＳＡ-ＴＢＳ（pH７．４）で室温で２時間静置した。ＴＢＳ（pH７．４）で再度３回洗浄し、抗体固定ビーズＡを得た。ＴＢＳ（pH７．４）中に使用するまで４℃で保存した。

上記抗体固定ビーズＡと同様の方法によって実施例２に記載の抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体（ＴＭ-Ａ７３）を固定した抗体固定ビーズＢを得た。

一方、０．５％ＢＳＡ-０．０５％Tween２０-５mMCaCℓ$_2$-ＴＢＳ（pH７．４）の希釈緩衝液でヒト・トロンボモジユリンの０、０．６２５、１．２５、２．５、５．０、１０．０ng／mℓ溶液を作成した。この０．４mℓづつをポリプロピレン製プラスチック小試験管に入れ、ヒト・トロンボモジユリン濃度０～１０ng／mℓの希釈列ＡとＢを作成した。この希釈列Ａの各試験管に抗体固定ビーズＡを１づつ加え、また希釈列Ｂに抗体固体ビーズＢを１つづつ加え、それぞれを３７℃で９０分間インキユーベーションした。

ＴＢＳ（pH７．４）にTween２０を０．０５％溶解した液（ＴＢＳ-Ｔ

と略）で3回洗浄した後、希釈列Aの各試験管には実施例2で調製したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジュリン・モノクローナル抗体を抗体濃度1μg／mℓに0.5%BSA-0.05%Tween20-5mM $CaCl_2$-TBS（pH7.4）で溶解した液を0.4mℓづつ加え、また希釈列Bの各試験管には、実施例2と同様の方法で、実施例1に記載の抗ヒト・トロンボモジュリン・ポリクローナル抗体から調製したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジュリン・ポリクローナル抗体を前記と同様にして調製した抗体濃度4μg／mℓの液を0.4mℓづつ加え、それぞれ37℃で30分間インキユーベーションした。

TBS-Tで5回洗浄した後、発色剤として、2.5mM H_2O_2-0.025% 3,3′,5,5′テトラメチルベンジジンの溶液を0.4mℓづつ加え、37℃で30分間インキユーベーションし、1規定硫酸1mℓを加え発色反応を停止し、450nmの吸光度を測定した。

その結果得た検量線を第1図に示した。

比較として、実施例2の抗体ヒト・トロンボモジュリン・モノクローナル抗体とエピトープを異にするモノクローナル抗体を、前記抗体固定ビーズA、Bと同様にして鏡面化されたポリスチレンビーズに固定し抗体固体ビーズCを得た。該固定ビーズの外は前記抗体固定ビーズAを用いた時と同様にして（希釈列C）ヒト・トロンボモジュリンに対する検量線を得た。その結果を比較例として第1図に示した。

第1図から明らかな如く、2種のモノクローナル抗体の組み合せ（希釈列C）にくらべて、本発明のポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合せ（希釈列A及びB）においては、高感度の検量線が得られることが明らかである。

実施例４

実施例１に記載の抗ヒト・トロンボモジユリン・ポリクローナル抗体を、０．１M炭酸緩衝液（pH９．５）で２０μg／mℓの濃度に調整し、下記第１表に示した各種中心線平均粗さのＥＩＡ用のポリスチレンビーズを浸し、４℃で１７時間静置した。ビーズを１％ＢＳＡ-ＴＢＳ（pH７．４）で室温に２時間静置した。ＴＢＳで３回洗浄し、各種抗体固定ビーズを得た。

一方、０．５％ＢＳＡ-０．２％スキム・ミルク-０．０１５％ヒト-γグロブリン-１５mM　$CaCl_2$-ＴＢＳ（pH７．４）の希釈緩衝液でヒト・トロンボモジユリンの０、１７ng／mℓ溶液を作成し、この０．２mℓづつをポリプロピレン製プラスチック小試験管に入れた。更に、各試験管に実施例２で調製したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジユリン・・モノクローナル抗体の抗体濃度３μg／mℓの０．５％ＢＳＡ-５mM　$CaCl_2$-ＴＢＳ（pH７．４）溶液を加え、上記抗体固定ビーズを１ケづつ入れて、３７℃で９０分間インキユーベーシヨンした。ＴＢＳ-Ｔで３回洗浄した後、発色剤として２．５mM　H_2O_2-０．０２５％３，３′，３，５′-テトラメチルベンジジンの溶液を０．４mℓづつ加え３７℃で３０分間インキユーベーシヨンし、１規定硫酸１mℓづつ加えて発色反応を停止した。

この溶液の４５０nmの吸光度を測定し、各種抗体固体ビーズのＳ／Ｎ比（ここでＮはヒト・トロンボモジユリン０ng／mℓにおける吸光度であり、Ｓはヒト・トロンボモジユリン１７ng／mℓにおける吸光度である）及び測定感度（ヒト・トロンボモジユリン０ng／mℓの変動係数を１０％とし、これから求めた０点における［吸光度＋３×標準偏差］値がヒト・

トロンボモジユリン濃度が0ng／mℓと17ng／mℓとを結ぶ直線と交わる点におけるヒト・トロンボモジユリン濃度を測定感度と定義する）を算出した。その結果を第1表に示す。

第1表で明らかなごとく、本発明のRaが1.5μm以下の鏡面化された不溶性担体の使用により優れた感度でヒト・トロンボモジユリン測定が可能となった。

第1表

ポリスチレンビーズ		Ra	450nmでの吸光度		S／N比（測定感度）
			0ng/mℓ(N)	17ng/mℓ(S)	
		μm			
本発明	A	0.8	0.015	0.600	40.0 (131pg/mℓ)
	B	1.3	0.016	0.637	39.8 (131pg/mℓ)

実施例5

実施例1に記載の抗ヒト・トロンボモジユリン・ポリクローナル抗体を、0.1M炭酸緩衝液（pH9.5）に5μg／mℓの濃度に調整し、鏡面化されたポリスチレンビーズ（イムノケミカル：イムノビーズ、Surfcom 570A（東京精密社製）で測定した表面中心線平均粗さ（Ra）：1.3μm）を浸し4℃で17時間静置した。ビーズをTBS（pH7.4）にて3回洗浄後、1%BSA-TBS（pH7.4）で室温で2時間静置した。TBSで再度3回洗浄し、TBS中に使用するまで4℃で保存した。

ヒト・トロンボモジユリンの0、10ng／mℓ溶液を、0.5%BSA-5mM $CaCl_2$-TBS（pH7.4）にスキム・ミルクを最終濃度0、

0.005、0.012、0.025、0.05、0.1、0.2%含有させた溶液で調製し、その0.4mℓづつをポリプロピレン製プラスチック小試験管に入れた。各チューブに前記抗ヒト・トロンボモジュリン固定ビーズを1ケづつ加え、37℃で90分間インキューベーションした。

TBSにTween20を0.05%溶解した液（TBS-Tと略）で2回洗浄した後、実施例2で作成したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジュリン・モノクローナル抗体の抗体濃度1μg/mℓに0.5%BSA-5mM $CaCl_2$-TBS（pH7.4）にスキムミルクを最終濃度0、0.005、0.012、0.025、0.05、0.1、0.2%含有させた溶液で調製し、前記スキム・ミルク濃度と同じチューブにそれぞれ0.4mℓづつ加え、37℃で30分間インキューベーションした。

TBS-Tで3回洗浄した後、発色剤として、2.5mM H_2O_2-0.025% 3,3′, 5,5′テトラメチルベンジジンの溶液を0.4mℓづつ加え、37℃で30分間インキューベーションし、1規定硫酸1mℓを加え発色反応を停止し、450nmの吸光度を測定した。

その結果得た免疫反応溶液中のスキム・ミルク濃度と、ヒト・トロンボモジュリン0、10ng/mℓでの吸光度との関係を第2図に示した。図から明らかな如く、スキム・ミルクの添加は特異的反応に影響しないで非特異的吸着を抑制することが明らかである。

実施例6

実施例5に記載と同様にして抗ヒト・トロンボモジュリン・ポリクローナル抗体固定ビーズを調製した。

一方、0.5%BSA-0.015%スキム・ミルク-5mM CaCℓ-TBS（pH7.4）でヒト-γグロブリンの下記第2表に記載の濃度の溶

液を調製し、これらを希釈緩衝液としてヒト・トロンボモジユリンの０ng／mℓ及び１４ng／mℓ溶液を調製した。各々０．２mℓづつをポリプロピレン製小試験管に加えた。実施例２で調製したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体の抗体濃度３μg／mℓの溶液を上記希釈緩衝液で調製し、ヒト・γグロブリン濃度を対応させて上記小試験管に０．２mℓづつ加えた。

その後、おのおのの試験管に上記抗体固体ビーズを１ケづつ入れ、３７℃で９０分間インキユーベーシヨンした。

ＴＢＳ-Ｔで３回洗浄した後、発色剤として２．５mM H_2O_2-０．０２５％ 3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン溶液を０．４mℓづつ加え、３７℃で３０分間インキユーベーシヨンし、１規定硫酸１mℓを加え発色反応を停止して４５０nmの吸光度を測定した。

測定した吸光度から、各ヒト・γグロブリン濃度でのＳ／Ｎ比及び測定感度を実施例４と同様にして算出した。その結果を第２表に示す。

第２表の結果から、スキム・ミルクを含有する免疫反応溶液中に更にγグロブリンを０．００２５％以上添加することによってヒト・トロンボモジユリンの測定感度を高めることが出来ることがわかる。

第２表

ヒト・γグロブリン濃　度	450nmでの吸光度		S／N比（測定感度）
	0ng/mℓ(N)	14ng/mℓ(S)	
0.0025	0.040	0.643	16.1 (278pg/mℓ)
0.01	0.032	0.619	19.3 (229pg/mℓ)
0.04	0.033	0.620	18.8 (236pg/mℓ)
0.10	0.034	0.631	18.6 (239pg/mℓ)

実施例７

ヒト・トロンボモジユリンの０ng／mℓおよび１７ng／mℓ濃度の０．５％ＢＳＡ-０．２％スキム・ミルク-０．０１５％ヒト・γグロブリン-５mM　$CaCl_2$-５０mM　Tris／HCℓ-０．１M　NaCℓ（pH７．４）溶液０．２mℓと、実施例２で得られたペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体の抗体濃度が３μg／mℓである０．５％ＢＳＡ-５mM　$CaCl_2$５０mM　Tris／HCℓ-０．１M　NaCℓ（pH７．４）溶液０．２mℓをポリプロピレン製小試験管にとり、次に実施例５に記載と同様にして調製した抗ヒト・トロンボモジユリン・ポリクローナル抗体固定ビーズを１ケづつ上記各小試験管に入れ、３７℃で９０分間インキユーベーションした。

各小試験管内の溶液を吸引除去した後、第３表に示した書類の界面活性剤の０．０５％を含有する生理食塩液３mℓで３回洗浄した。洗浄後、発色剤として２．５mM

H_2O_2-０．０２５％　３，３′，５，５′-テトラメチルベンジジン溶液を０．

4mℓづつ加え、37℃で30分間インキユーベーションし、1規定硫酸1mℓを加え発色反応を停止して450nmの吸光度を測定した。この吸光度から実施例4と同様にしてS／N比を算出した。その結果を第3表に示す。

第3表から明らかにように、両性界面活性剤、HLB値が16以上の界面活性剤を含有する洗浄剤を用いる時、ヒト・トロンボモジユリンを感度よく測定出来る。

第3表

界面活性剤		HLB値	450nmでの吸光度		S／N比
			0ng/mℓ(N)	17ng/mℓ(S)	
本発明	ラウリルジメチルアミノ酢酸	—	0.020	0.595	29.8
	テトロニック702	>20	0.021	0.712	33.9
	プルロニックF68	29	0.063	0.821	13.0
	ポリオキシエチレン・ソルビタン・モノラウレート(Tween20)	16.7	0.046	0.737	16.0

実施例8

洗浄液として第4表に示した各濃度のテトロニック702の生理食塩液を用い、実施例7と同様に操作して使用濃度の効果を調べた。その結果を第4表に示す。

第 4 表

テトロニック702濃度	450nmでの吸光度		S／N比
	0 ng/mℓ(N)	17ng/mℓ(S)	
0.0025	0.062	0.710	11.5
0.005	0.020	0.600	30.0
0.010	0.024	0.609	25.4
0.050	0.018	0.542	30.1
0.1	0.016	0.514	32.1
0.5	0.018	0.500	27.8
1.0	0.015	0.472	31.5

上記結果から明らかなように０．００２５～１．０％の範囲でＳ／Ｎ比は大きく、すなわち高感度にヒト・トロンボモジユリンを測定できる。２％では泡立ちが激しく、かつヒト・トロンボモジユリン濃度１７ng／mℓの吸光度が著るしく低下した。

実施例９

実施例５に記載と同様にて抗ヒト・トロンボモジユリン・ポリクローナル抗体固体ビーズを調製した。

一方、０．５％ＢＳＡ-０．２％スキム・ミルク０．０１５％ヒト・γ－グロブリン－５mM CaCℓ－５０mM Tris／HCℓ－０．１M Cℓ NaCℓ（pH７．４）で段階希釈したヒト・トロンボモジユリン溶液（０～３３．３ng／mℓ）を調製し、各０．２mℓづつをポリプロピレン製小試験管に加えた。次に実施例２で作成したペルオキシダーゼ標識抗ヒト・トロンボモジユリン・モノクローナル抗体の抗体濃度３μg／mℓの液を０．５

%ＢＳＡ－５mM $CaCl_2$－５０mM Tris／ＨＣℓ－０．１M ＮａＣℓ（ｐＨ７．４）で調製し、上記小試験管の各々に０．２mℓづつ加えた。さらにこれらの小試験管に上記抗体固定ビーズを１ケづつ入れ、３７℃で９０分間インキユーベーシヨンした。

０．００５%テトロニック７０２－５mM $CaCl_2$－生理食塩液で３回洗浄した後、発色剤として２．５mM H_2O_2－０．０２５%３，３′，５，５′-テトラメチルベンジジン溶液を０．４mℓづつ加え、３７℃で３０分間インキユーベーシヨンした後、１規定硫酸１mℓを加え発色反応を停止して４５０nmの吸光度を測定した。その結果得た検量線を第３図に示した。

第３図から明らかな如く、バックグランドが低く高感度（実施例４の方法により算出した測定感度：６３pg／mℓ）の検量線が得られることが明らかである。

請 求 の 範 囲

1．試料中のヒト・トロンボモジユリンをサンドイッチ法により免疫学的に測定する方法において、不溶性担体に固定化した抗体（第１抗体）と標識化した抗体（第２抗体）は、いずれか一方がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体であるヒト・トロンボモジユリンの免疫学的測定方法。

2．該第１抗体ヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、且つ該第２抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である請求項１記載の免疫学的測定方法。

3．該モノクローナル抗体が、ヒト・トロンボモジユリンとヒト・トロンボビンとの複合体形成に対する阻害作用を有し且つヒト・プロテインＣの活性化に阻害作用を有するものである請求項１または２記載の免疫学的測定方法。

4．該不溶性担体が鏡面化された表面を有するものである請求項１～３のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

5．免疫学的測定方法における免疫反応溶液中に分子量約１６０００～約５０，０００および等電点１．０～５．０である蛋白質を存在せしめ、免疫反応溶液における該蛋白質の最終濃度が０．００５～０．８重量％となるように調製する請求項１～４のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

6．免疫反応溶液中にさらに、γ－グロブリンまたはγ－グロブリン誘導体を０．００２５～０．１重量％の濃度を存在せしめる請求項５記載の免疫学的測定方法。

7．免疫学的測定方法における洗浄剤として、両性界面活性剤および

／またはＨＬＢ値が１６以上の非イオン界面活性剤を０．００２５～１重量％の濃度で含有する洗浄剤を使用する請求項１～６のいずれかに記載の免疫学的測定方法。

８．試料中のヒト・トロンボモジユリンを不溶性担体に固定化した第１抗体及び標識化した第２抗体を使用して免疫学的に測定方するための試薬であって、一方の抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする免疫学的測定試薬。

９．該第１抗体ヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、且つ該第２抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である請求項８記載の免疫学的測定試薬。

１０．該モノクローナル抗体が、ヒト・トロンボモジユリンとヒト・トロンビンとの複合体形成に対する阻害作用を有し且つヒト・プロテインＣの活性化に阻害作用を有するものである請求項８または９記載の免疫学的測定試薬。

１１．該不溶性担体が鏡面化された表面を有するものである請求項８～１０のいずれかに記載の免疫学的測定試薬。

１２．試料中のヒト・トロンボモジユリンを免疫学的に測定するためのキットであって、

(i) 不溶性固体担体に固定化したヒト・トロンボモジユリンを認識する抗体（第１抗体）、

(ii) 標識化したヒト・トロンボモジユリンを認識する抗体（第２抗体）、

但し、上記第１抗体及び第２抗体は、いずれか一方がヒト・トロ

ンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、他方がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である。

(iii) 酵素で標識化した場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤

(iv) 希釈剤

(v) 洗浄剤、及び

(vi) 標準物質

よりなる免疫学的測定キット。

１３．該第１抗体ヒト・トロンボモジユリンを認識するポリクローナル抗体であり、且つ該第２抗体がヒト・トロンボモジユリンを認識するモノクローナル抗体である請求項１２記載の免疫学的測定キット。

１４．該モノクローナル抗体が、ヒト・トロンボモジユリンとヒト・トロンボビンとの複合体形成に対する阻害作用を有し且つヒト・プロテインCの活性化に阻害作用を有するものである請求項１２または１３記載の免疫学的測定キット。

１５．該不溶性担体が鏡面化された表面を有するものである請求項１２～１４のいずれかに記載の免疫学的測定キット。

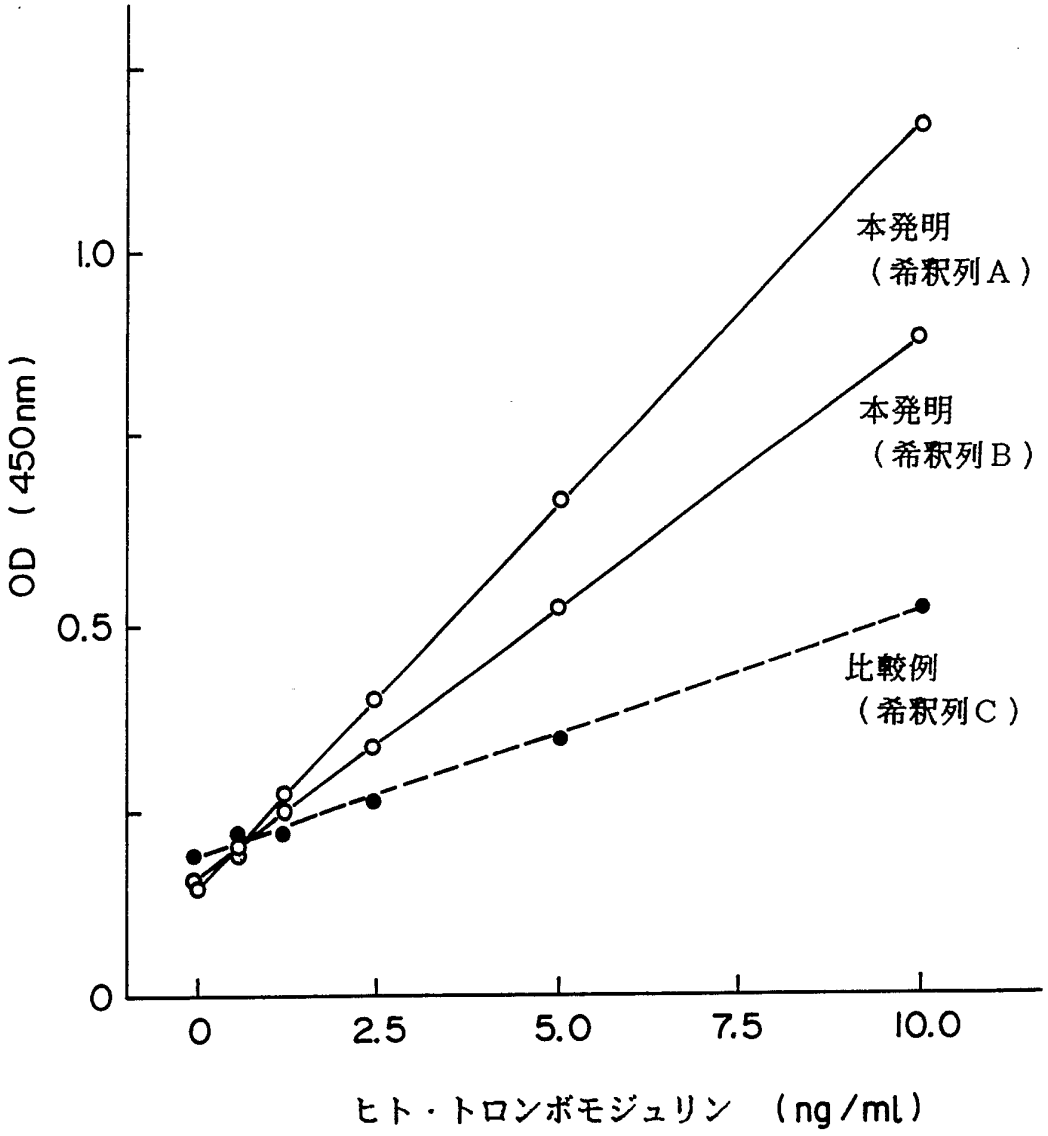
１６．該洗浄剤が、両面界面活性剤及び／又はＨＬＢ値が１６以上の非イオン界面活性剤を０．００２５～１重量%含有している請求項１２～１５項のいずれかに記載の免疫学的測定キット。

１７．該第２抗体、該希釈剤または該標準物質に、分子量約１６，０００～約５０，０００及び等電点１．０～５．０である蛋白質を含有せしめた請求項１２～１６のいずれかに記載の免疫学的測定キット。

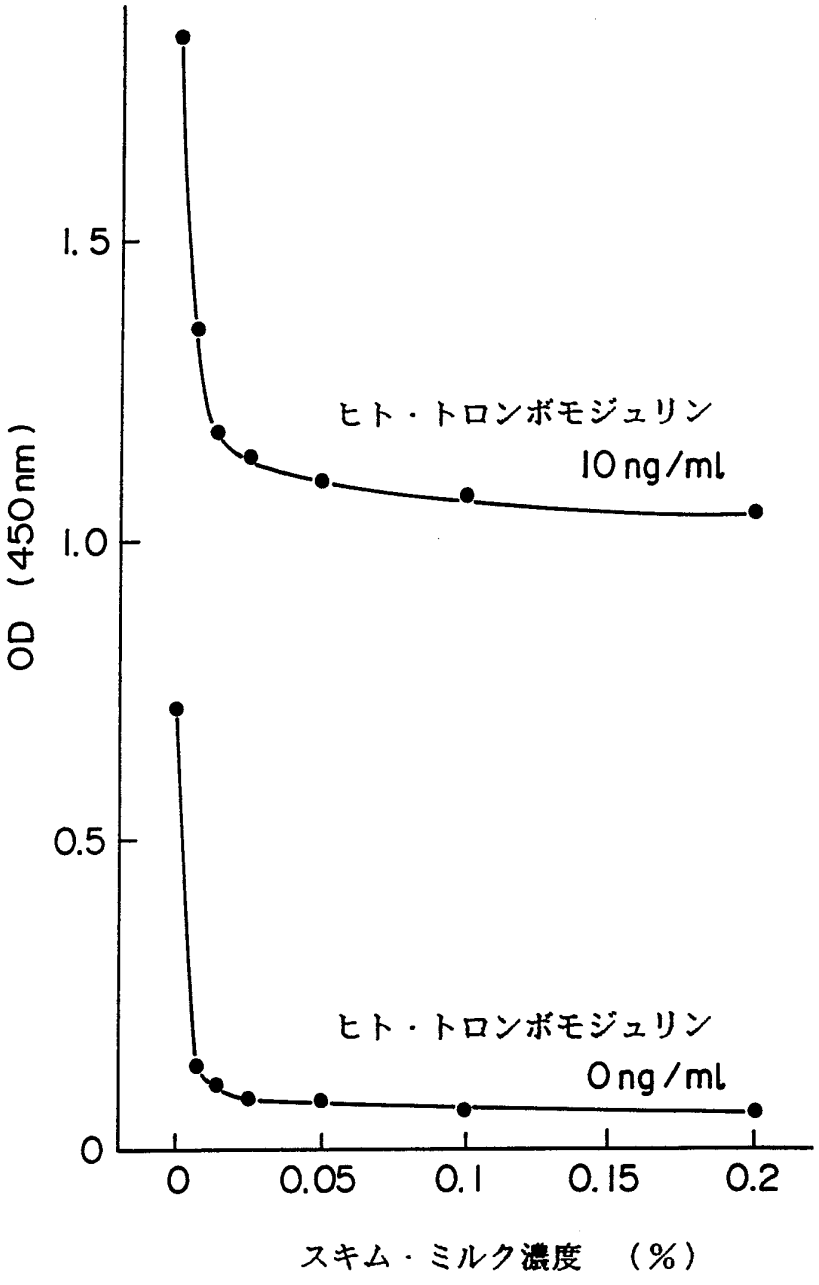
１８．該第２抗体、該希釈剤または該標準物質に、γ－グロブリンま

たはγ－グロブリン誘導体を含有せしめた請求項１２～１７項のいずれかに記載の免疫学的測定キット。

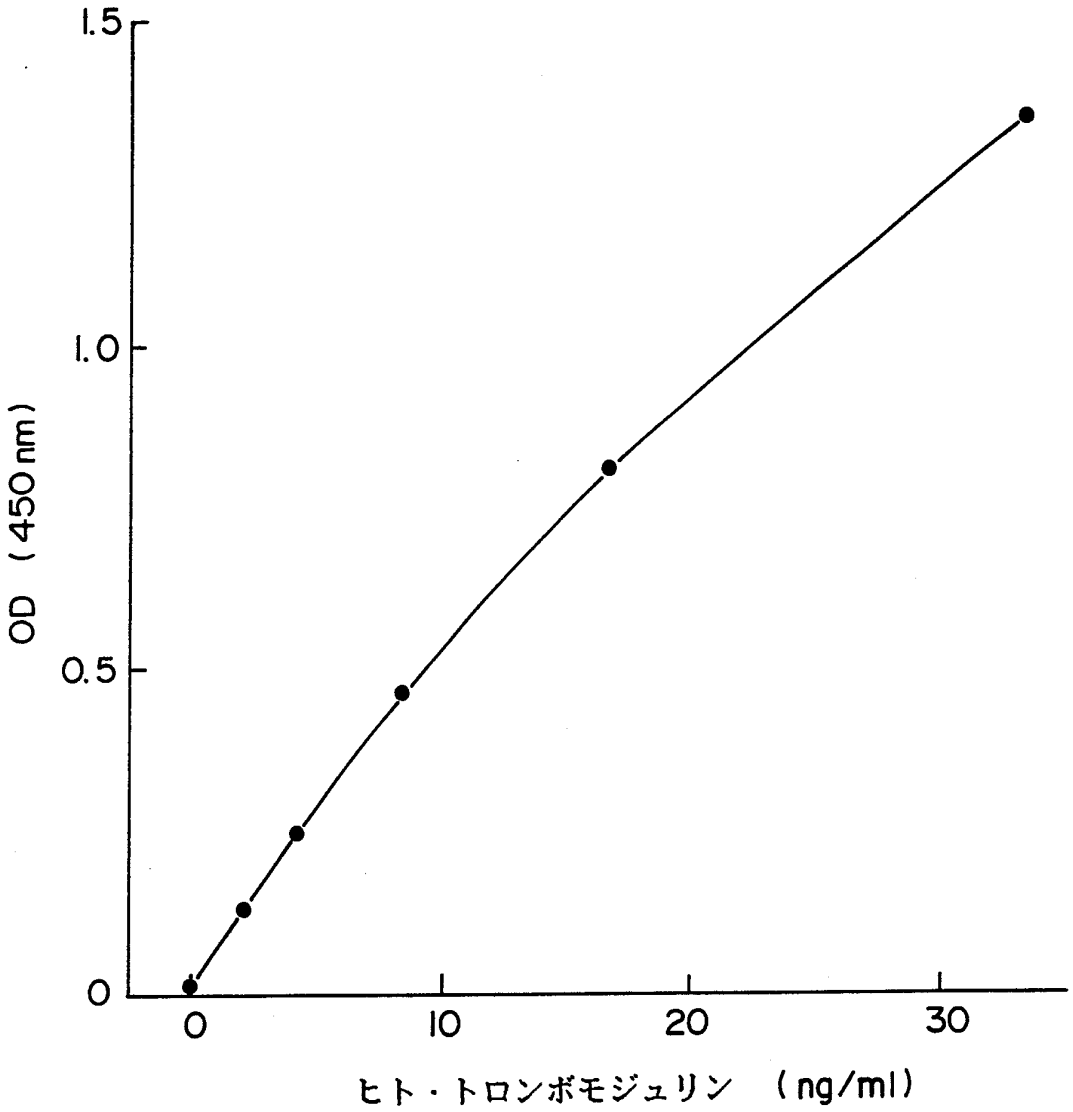
第1図


OD (450nm)
1.0
0.5
0
0
2.5
5.0
7.5
10.0
ヒト・トロンボモジュリン (ng/ml)
本発明
(希釈列A)
本発明
(希釈列B)
比較例
(希釈列C)

第2図


1.5
1.0
0.5
0
OD (450nm)
ヒト・トロンボモジュリン
10 ng/ml
ヒト・トロンボモジュリン
0 ng/ml
0
0.05
0.1
0.15
0.2
スキム・ミルク濃度 (%)

第3図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP90/01412

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl[5] G01N33/53, G01N33/577, G01N33/543

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
IPC	G01N33/53, G01N33/577, G01N33/543

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category *	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
Y	JP, A, 64-45398 (Kowa Co., Ltd.), February 17, 1989 (17. 02. 89), (Family: none)	1-18
Y	JP, A, 64-47391 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), February 21, 1989 (21. 02. 89), (Family: none)	1-18
Y	JP, A, 57-16355 (F. Hoffmann-La Roche & Co., AG), January 27, 1982 (27. 01. 82), & BE, A, 888534 & DE, A, 3115115 & GB, A, 2074727	1-18
Y	JP, A, 57-500845 (Unilever N.V.), May 13, 1982 (13. 05. 82), & WO, A, 8200058	1-18
Y	WO, A, 8901624 (Teijin Ltd.), February 23, 1989 (23. 02. 89), & EP, A, 328679	5, 17

* Special categories of cited documents: [10]

"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

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
January 7, 1991 (07. 01. 91)	January 21, 1991 (21. 01. 91)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
Japanese Patent Office	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	JP, A, 61-275654 (Teijin Ltd.), December 5, 1986 (05. 12. 86), & WO, A, 8607154 & EP, A, 224590	5, 17
Y	JP, A, 63-127161 (Coulter Corp.), May 31, 1988 (31. 05. 88), & EP, A, 260903 & US, A, 4818686	5, 17
Y	JP, A, 60-36964 (IQ (BIO) Ltd.), February 26, 1985 (26. 02. 85), & EP, A, 132948 & US, A, 4668639	7, 16
Y	JP, A, 60-53846 (Beringer Mannheim GmbH), March 27, 1985 (27. 03. 85),	7, 16

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE [1]

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 [2]

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

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

	& EP, A, 133272 & US, A, 4639425	
Y	JP, A, 62-71861 (Beringer Mannheim GmbH), April 2, 1987 (02. 04. 87), & EP, A, 215457	7, 16

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE [1]

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 [2]

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

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.

国　際　調　査　報　告

国際出願番号PCT/JP 90/ 01412

Ⅰ．発明の属する分野の分類

国際特許分類（IPC）　Int. Cℓ[5]
G01N33/53，G01N33/577，G01N33/543

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	G01N33/53，G01N33/577，G01N33/543

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
Y	JP，A，64－45398（興和株式会社），17．2月．1989（17．02．89），（ファミリーなし）	1－18
Y	JP，A，64－47391（三菱瓦斯化学株式会社），21．2月．1989（21．02．89），（ファミリーなし）	1－18
Y	JP，A，57－16355（エフ・ホフマン－ラ・ロシュ・ウント・コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト），27．1月．1982（27．01．82），&BE，A，888534&DE，A，3115115&GB，A，2074727	1－18
Y	JP，A，57－500845（ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノートシャープ），13．5月．1982（13．05．82），&WO，A，8200058	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
07．01．91	21.01.91
国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁（ISA/JP）	特許庁審査官　秋　月　美紀子　㊞　2G 7906

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1981年10月）

第2ページから続く情報

	（Ⅲ欄の続き）	
Y	WO，A，8901624（帝人株式会社）， 23. 2月. 1989（23. 02. 89）， &EP，A，328679	5，17
Y	JP，A，61-275654（帝人株式会社）， 5. 12月. 1986（05. 12. 86）， &WO，A，8607154&EP，A，224590	5，17
Y	JP，A，63-127161（クールター・コーポレーション）， 31. 5月. 1988（31. 05. 88），	5，17

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。

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分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。

Ⅲ. 関連する技術に関する文献（第2ページからの続き）

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
	&EP,A,260903&US,A,4818686	
Y	JP,A,60-36964(アイキュー・(バイオ)・リミテッド)26. 2月. 1985(26. 02. 85), &EP,A,132948&US,A,4668639	7,16
Y	JP,A,60-53846(ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 27. 3月. 1985(27. 03. 85), &EP,A,133272&US,A,4639425	7,16
Y	JP,A,62-71861(ベーリンガーマンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング), 2. 4月. 1987(02. 04. 87), &EP,A,215457	7,16