

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/125762

発行日 平成24年10月25日(2012.10.25)

(43) 国際公開日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	U 4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

出願番号	特願2011-511287 (P2011-511287)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/002825	(74) 代理人	110001427 特許業務法人前田特許事務所
(22) 国際出願日	平成22年4月19日(2010.4.19)	(74) 代理人	100077931 弁理士 前田 弘
(31) 優先権主張番号	特願2009-110887 (P2009-110887)	(74) 代理人	100110939 弁理士 竹内 宏
(32) 優先日	平成21年4月30日(2009.4.30)	(74) 代理人	100110940 弁理士 嶋田 高久
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100113262 弁理士 竹内 祐二
		(74) 代理人	100115059 弁理士 今江 克実

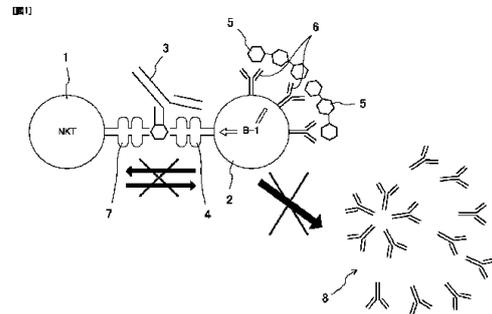
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体性拒絶反応抑制剤

## (57) 【要約】

生体防御機能を大きく損なうことなく、A B O式血液型が不適合なドナーからの移植や自己免疫疾患の発生抑制などを可能にする。

N K T細胞1とB細胞2との間のシグナル伝達を阻害して抗体の産生を抑制する抗体性拒絶反応抑制剤である。この抗体性拒絶反応抑制剤には、抗C D 1 d抗体3が含まれている。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

N K T 細胞と B 細胞との間のシグナル伝達を阻害して抗体の産生を抑制する抗体性拒絶反応抑制剤であって、

抗 C D 1 d 抗体を含む抗体性拒絶反応抑制剤。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記 B 細胞が B - 1 細胞を含む抗体性拒絶反応抑制剤。

**【請求項 3】**

請求項 1 又は請求項 2 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

産生が抑制される前記抗体に糖鎖抗原に対する抗体が含まれる抗体性拒絶反応抑制剤。

10

**【請求項 4】**

請求項 3 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記糖鎖抗原が血液型糖鎖抗原を含む抗体性拒絶反応抑制剤。

**【請求項 5】**

請求項 4 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

産生が抑制される前記抗体にペプチド抗原に対する抗体が含まれない抗体性拒絶反応抑制剤。

**【請求項 6】**

請求項 1 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記抗 C D 1 d 抗体がモノクローナル抗体である抗体性拒絶反応抑制剤。

20

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記抗 C D 1 d 抗体がヒト型抗体である抗体性拒絶反応抑制剤。

**【請求項 8】**

抗体性拒絶反応抑制剤のスクリーニング方法であって、

マウスの腹腔内に対象成分を投与してテストマウスを得るとともに、他のマウスの腹腔内に抑制すべき抗体成分を投与して対照マウスを得る工程と、

前記テストマウス及び前記対照マウスのそれぞれを赤血球で免疫し、抗血液型抗体の産生を測定する工程と、

30

を含む抗体性拒絶反応抑制剤のスクリーニング方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗体性拒絶反応抑制剤に関する。

**【背景技術】****【0002】**

近年、医療技術の進歩から臓器移植が一般治療化されつつある。しかし、臓器提供者（ドナー）が圧倒的に不足しており、A B O 式血液型の異なるドナーからの移植が安全に施行可能となればドナー不足解決の一助となりえる。

40

**【0003】**

しかしながら、このような A B O 式血液型不適合ドナーから臓器移植を行う場合、抗体性拒絶反応という大きな問題がある。すなわち、A 型や B 型の血液型糖鎖を有する抗原が標的となり抗原抗体反応により移植臓器が廃絶されるのである（これら血液型糖鎖を有する抗原を血液型糖鎖抗原ともいう）。

**【0004】**

そのため、多剤併用の免疫抑制法が提案されてはいるが、いずれも治療効果は不確実、一時的なものであるうえ、非特異的であるため免疫機能全般が一様に抑制されてしまい、免疫機能の低下を招くという問題がある。

**【0005】**

50

このような状況の下、抗原抗体反応では各種リンパ球細胞が重要な役割を果たしていることから、これらに着目した検討が行われている。例えば、抗HM1.24抗体がB細胞やT細胞の活性化を抑制するという知見に基づき、T細胞の幼若化やB細胞の抗体産生の抑制を可能にした、リンパ球の活性化抑制剤などが提案されている（特許文献1）。

【0006】

本発明者らもまた、上述した血液型糖鎖に反応性を示すB細胞について研究を行っており、これまでに血液型糖鎖に反応するレセプター（受容体）はB細胞の中でもB-1細胞に帰属していることや、このB-1細胞の分化がカルシニューリン阻害剤で抑制されること、カルシニューリン阻害剤はペプチド抗原（微生物やウイルス等の一般的な外敵由来の抗原に相当する）に反応するB-2細胞の分化には影響しないことなどを確認している（非特許文献1～4）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第3552898号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Irei T, Ohdan H, Ishiyama K, Tanaka Y, et al The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation. Blood. 110(13):4567-4575.2007.

20

【非特許文献2】Ohdan H, Zhou W, Tanaka Y, Irei T, et al Evidence of immune tolerance to blood group antigens in a case of ABO-incompatible pediatric liver transplantation. Am J Transplant. 7(9):2190-4.2007

【非特許文献3】Zhou W, Ohdan H, Tanaka Y, Hara H, et al NOD/SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes can be a model for investigating B cells responding to blood group A carbohydrate determinant. Transpl Immunol. 12(1):9-18.2003

【非特許文献4】Ohdan H, Swenson KG, Huw S. Gray K, et al Mac-1-Negative B-1b Phenotype of Natural Antibody-Producing Cells, Including Those Responding to Gal 1,3Gal Epitopes in 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Mice. The Journal of Immunology. 165:5518-5529.2000

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記研究結果に基づき、本発明者らは、B細胞を特異的に抑制する抗CD20抗体製剤を用いて既にB-1細胞に分化してしまった細胞を抑制し、B-1細胞の分化をカルシニューリン阻害剤で抑制するという、抗CD20抗体製剤とカルシニューリン阻害剤との併用について検討を進めている。

40

【0010】

しかしながら、抗CD20抗体製剤は全てのB細胞に作用し、血液型糖鎖に反応性を示すB-1細胞だけでなく、ペプチド抗原に反応性を示すB-2細胞まで抑制してしまうことから、免疫機能の低下により感染症の増加は避けられないという問題があった。

【0011】

かかる点に鑑み、本発明では、抗CD20抗体製剤等よりも効果的で、細胞性免疫機能の低下を軽減することのできる、抗体性拒絶反応抑制剤の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、natural killer T (NK T)細胞に着目して鋭意研究を行った結果、N

50

K T細胞とB細胞との間のシグナル伝達を阻害することで有効な効果が得られることを見出した。

【0013】

すなわち、本発明は、NK T細胞とB細胞との間のシグナル伝達を阻害して抗体の産生を抑制する抗体性拒絶反応抑制剤であって、抗CD1d抗体を含む抗体性拒絶反応抑制剤である。具体的には、前記B細胞にはB-1細胞が含まれており、産生が抑制される前記抗体には糖鎖抗原に対する抗体が含まれている。より詳しくは血液型糖鎖抗原が含まれている。

【0014】

従って、少なくともA型やB型の血液型糖鎖抗原に対する抗体の産生を抑制することができるので、臓器移植等の際に生じる抗体性拒絶反応を効果的に防ぐことができる。

【0015】

その一方で、産生が抑制される前記抗体には、ペプチド抗原に対する抗体は含まれない。従って、一般的な外敵由来の抗原に対する抗体の産生は抑制されないので、免疫機能の過剰な低下を軽減できる。

【0016】

更に、前記抗CD1d抗体がモノクローナル抗体であれば、より効率よく抗体性拒絶反応を抑制することができ、前記抗CD1d抗体がヒト型抗体であれば、ABO式血液型が不適合なドナーからの移植等であっても支障なく移植できるようになり、ドナー不足を大幅に解消できるようになる。

【0017】

尚、「NK T細胞」とは、NK（ナチュラルキラー）細胞とT細胞の両方のマーカーを有し、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ細胞として注目されているリンパ球細胞である。NK T細胞は、その抗原レセプター（invariant T cell antigen receptor: iTCR、ヒトではV<sub>24</sub>TCR、マウスではV<sub>14</sub>TCR）により、MHCクラスI様分子のCD1dに提示された抗原を認識するとされており、例えばその抗原として糖鎖抗原である - ガラクトシルセラミド（galactosylceramide）が発見されている。NK T細胞は、活性化されるとIFN- $\gamma$ （interferon-gamma）やIL-4（interleukin-4）を多量に産生し、各免疫系に影響を与えると考えられている。

【0018】

「B細胞」とは、骨髄で分化成熟するリンパ球細胞であり、所定の刺激により抗体を産生するようになる抗体産生前駆細胞である。表面マーカーとしてCD19, 20, 21を持つ。B細胞は蛋白抗原に対する抗体産生にかかわる通常のB細胞（B-2細胞）と糖鎖抗原の抗体産生にかかわるB-1細胞に分類される。「B-1細胞」とは、主に腹腔内に存在し、IgM<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>の表面マーカーを有し、T細胞に依存することなく糖鎖抗原に対する抗体の産生を司る細胞である。「抗CD1d抗体」とは、CD1d分子に対する抗体である。

【0019】

「糖鎖抗原」とは、糖鎖抗原、蛋白抗原、脂質抗原のうちの糖鎖抗原である。糖鎖抗原に対する抗体産生は主にB-1細胞が担うと考えられ、その産生はT細胞非依存性である。「血液型糖鎖抗原」とは、赤血球上の同種抗原として発見された糖鎖抗原である。A、B、O型に分類され、A型はO型抗原にNアセチルガラクトサミンがB型は - ガラクトースが結合したものである。血液型糖鎖抗原は赤血球以外の臓器内血管内皮にも発現し、臓器移植の際、血液型糖鎖抗原に対する自然抗体や活性化されたB細胞、形質細胞からの産生抗体により急性抗体性拒絶反応が惹起される。

【0020】

「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原に対する抗体のことである。ひとつのB細胞は、唯一の抗原に対するB細胞レセプターを持ち、抗原刺激後形質細胞に分化し、一種類のみの免疫グロブリンを産生する。抗原刺激により異種形質細胞腫に抗体を産生させた後精製し、モノクローナル抗体を得ることができる。「ヒト型（キメラ）抗体」とは、異種

10

20

30

40

50

形質細胞腫に産生させたモノクローナル抗体の定常部をヒトの免疫グロブリンの定常部と置き換え、ヒトに投与する際の副作用を大幅に軽減させたものである。

【0021】

このような抗体性拒絶反応抑制剤は、例えば、マウスの腹腔内に対象成分を投与してテストマウスを得るとともに、他のマウスの腹腔内に抑制すべき抗体成分を投与して対照マウスを得る工程と、前記テストマウス及び前記対照マウスのそれぞれを赤血球で免疫し、抗血液型抗体の産生を測定する工程と、を含むスクリーニング方法によって得ることができる。

【発明の効果】

【0022】

以上説明したように、本発明の抗体性拒絶反応抑制剤であれば、例えば、移植時に生じる抗体性拒絶反応のみを特異的に抑制することが可能となるため、生体防御機能を大きく損なうことなく、A B O式血液型が不適合なドナーからの移植や自己免疫疾患の発生抑制などが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、本実施形態における作用を説明するための概念図である。

【図2】図2は、実施例1における試験結果を示すグラフである。(a)は免疫前を、(b)は免疫2週間後を表している。

【図3】図3は、実施例1における試験結果を示すグラフである。(a)は免疫前を、(b)は免疫6週間後を表している。

【図4】図4は、実施例2における試験結果を示すグラフである。

【図5】図5は、実施例3における試験結果を示すグラフである。(a)は免疫前を、(b)は免疫6週間後を表している。

【図6】図6は、実施例3における試験結果を示すグラフである。(a)は免疫前を、(b)は免疫6週間後を表している。

【図7】図7は、実施例4における試験結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、実施形態を図面に基づいて詳細に説明する。尚、以下の好ましい実施形態の説明は、本質的に例示に過ぎず、本発明、その適用物或いはその用途を制限することを意図するものではない。

【0025】

本発明者らは、まず、NK T細胞が血液型糖鎖抗原に対する抗体(抗血液型抗体ともいう)の産生に対しても何らかの形で関与している可能性があると考え、その解析を行った。その詳細については実施例1で説明するが、CD1d分子が欠損しているマウス(ノックアウトマウスともいう)と正常なマウスとをヒト赤血球で免疫し、その後の抗血液型抗体の産生を比較した。

【0026】

その結果、免疫後にはノックアウトマウスの抗血液型抗体の産生が正常なマウスに比べて低下することが確認された。また、正常なマウスでは抗体のクラススイッチ、すなわち免疫グロブリンM(IgM)の出現後にIgGなどの他のアイソタイプの抗体の産生が認められたが、ノックアウトマウスでは全く認められなかった(図2、図3参照)。

【0027】

従って、NK T細胞は抗血液型抗体の産生に関与しており、抗体のクラススイッチに必須であることが確認された。

【0028】

次に、このNK T細胞の抗血液型抗体の産生への関与が特異的なものであるか否かを確認するために、NK T細胞の通常のペプチド抗原に対する抗体産生への影響について解析を行った(詳細は実施例2に示す)。具体的には、ノックアウトマウスと正常なマウスと

10

20

30

40

50

を同種マウス細胞で免疫し、抗アロ抗体産生を比較した。

【0029】

その結果、ノックアウトマウス及び正常なマウスともに免疫後の抗アロ抗体の産生が認められ、また、抗体のクラススイッチも双方ともに確認された(図4参照)。

【0030】

従って、NK T細胞のペプチド抗原に対する影響は少ないことが確認された。

【0031】

以上の結果より、NK T細胞の活性を制御することによって抗血液型抗体の産生を特異的に抑制できる可能性が示唆されたことから、更に本発明者らは、NK T細胞とB細胞との間の最初のシグナル伝達はCD1d分子を介した抗原提示によりなされる点に着目し、NK T細胞とB細胞との間のシグナル伝達を抗CD1d抗体により阻害することによって抗血液型抗体の産生を抑制できるのではないかと考えた。

【0032】

図1に、そのメカニズムを模式的に表す。図中、符号1はNK T細胞、符号2はB-1細胞、符号3は抗CD1d抗体である。

【0033】

同図に示すように、B-1細胞2は、CD1d分子4や血液型糖鎖抗原5に反応して結合する抗原レセプター6をその表面に持っており、一方、NK T細胞1は、B-1細胞2のCD1d分子4と反応して結合する抗原レセプター(iTCR)7をその表面に持っている。NK T細胞1とB-1細胞2との間のシグナル伝達は、このiTCR7とCD1d分子4とを介して行われる。尚、CD1d分子4はB-1細胞2に固有のものではなく、B-2細胞にも存在する。

【0034】

血液型糖鎖抗原5がB-1細胞2に結合すると、CD1d分子4上に抗原提示され、NK T細胞1に抗原情報が伝達され、その後、NK T細胞1とB-1細胞2との協働により抗血液型抗体8の産生が行われるものと考えられる。

【0035】

そうであれば、同図に示すように、抗CD1d抗体3を付与してCD1d分子4に結合させ、NK T細胞1とB-1細胞2との間のシグナル伝達を阻害させれば、抗血液型抗体8の産生抑制が可能になるはずである。

【0036】

そこで、本発明者らは、この仮説を検証すべく、抗CD1d抗体を投与したマウス、アイソタイプ抗体(isotype control)を投与したマウスをそれぞれヒトA型赤血球で免疫し、抗A IgM抗体や抗A IgG抗体の産生を経時的に比較した(詳細は実施例3に示す)。

【0037】

その結果、アイソタイプ抗体を投与したマウスでは通常の抗体産生が認められ、抗CD1d抗体を投与したマウスでは、ノックアウトマウスと同様に抗血液型抗体の産生を抑制する効果や抗体のクラススイッチを抑制する効果が認められた(図5、図6参照)。

【0038】

従って、抗CD1d抗体を含む抗体性拒絶反応抑制剤を用いてNK T細胞とB細胞との間のシグナル伝達を阻害し、抗体の産生を抑制すれば、通常のペプチド抗原に対する抗体産生を損なうことなく抗血液型抗体の産生を特異的に抑制することが可能になる。

【0039】

マウスの場合であれば、例えば、既に抗CD1d抗体が市販されているため、その抗CD1d抗体を入手して適宜調整することで簡単にマウス用の抗体性拒絶反応抑制剤を得ることができる。

【0040】

そして、そのマウス用の抗体性拒絶反応抑制剤を、例えば、マウス1匹当たり抗CD1d抗体が400~600µg、好ましくは450µgとなるように投与すれば、そのマウスの抗血液型抗体の産生を特異的に抑制することができ、血液型にかかわらず臓器移植す

10

20

30

40

50

ることが可能になる。

【0041】

ヒトの場合であれば、ヒト型のモノクローナル抗体を作成する一連の公知技術を使用し、モノクローナルなヒト型の抗CD1d抗体を作製すればよい。そして、作製したモノクローナルなヒト型の抗CD1d抗体と、定法に従って保存剤や栄養剤等のその他の補助薬剤等とを混合し、例えば注射薬として調整することにより、ヒト用の抗体性拒絶反応抑制剤を得ることができる。

【0042】

そしてその所定量（例えばマウス1匹を30gとして体重を基に換算すればよい）を投与すれば、A型やB型の抗血液型抗体の産生を特異的に抑制することができ、血液型にかかわらず通常の免疫反応を損なうことなく臓器移植することなどが可能になる。

10

【0043】

なおその際には、この抗CD1d抗体は、既にB-1細胞に分化してしまった細胞に対して有効なものであるため、この抗CD1d抗体の投与と併せて、B-0細胞からB-1細胞の分化を抑制するカルシニューリン阻害剤を投与すれば、いっそう効果的であると考えられる。

【0044】

また、本発明は異種移植、例えば、生理学的、解剖学的にヒトとの間で類似性が高いブタの臓器をヒトの臓器の代わりに用いる移植などにも応用できる可能性がある。

【0045】

すなわち、ブタの臓器には、Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc (Gal) 糖鎖やN-glycolylneuraminic acid (NeuGc) 糖鎖が存在し、これら糖鎖抗原が自然抗体の標的となって抗体性拒絶反応を引き起こすが、これらGal糖鎖やNeuGc糖鎖は血液型糖鎖抗原と類似していることから、本発明の抗体性拒絶反応抑制剤はヒト-ブタ間の異種移植にも有効である可能性が高い。

20

【0046】

以上説明したように、本発明の抗体性拒絶反応抑制剤であれば、比較的簡単に実用化できるうえ、その使用によりABO式血液型が不適合なドナー等からも安心して臓器移植ができるようになることが予想されるため、ドナー不足の解消に役立つと考えられる。

【0047】

(実施例1)

NKT細胞の血液型糖鎖抗原に対する抗体産生への影響を解析するため、Balb/c CD1d<sup>-/-</sup>マウス(iTCRのリガンドであるCD1dを欠き、NKT細胞が顕著に減少していることが知られているマウス;ノックアウトマウス、n=4)と、比較対照のBalb/c野生種マウス(n=5)とをヒトA型赤血球( $8 \times 10^8$ /マウス)で免疫し、抗血液型A抗体産生をELISAを用いて測定した。

30

【0048】

ヒトA型赤血球の免疫は、血液型がA型の健常人ボランティアから採血し、PBSで2回洗浄後、 $8 \times 10^8$ /mlに希釈してその1mlをマウス腹腔内に投与し1週間隔で2回免疫した。

40

【0049】

抗A抗体価のELISAを用いた検出は、ポリスチレン96wellフラットボトムプレート(costar)を $5 \mu\text{g/ml}$  A-BSA(bovin serum albumin)(Dextra)、もしくはバックグラウンドコントロールとして $5 \mu\text{g/ml}$  BSA(Roche)で4、8時間コーティングした。プレートを洗浄後、1%BSAでブロッキングし、希釈マウス血清を各wellに添加して、室温で2時間インキュベーションした。次に、 $0.25 \mu\text{g/ml}$  抗マウスIgMもしくはIgG-HRP(Southern Biotech)を二次抗体として添加し、室温で1時間インキュベーションした。プレートの洗浄の後、 $0.1 \text{mg/ml}$  O-phenylenediamine(SIGMA)を添加、発色し、マルチプレートリーダー(COLONA)で492nmでの吸光度を測定した。A-BSAコー

50

ディングプレートの吸光度より、B S Aバックグラウンドプレートの吸光度を引き、その差を抗A抗体価とした（非特許文献1参照）。

【0050】

その結果を図2、図3に示す。図2のグラフは抗A I g M抗体の抗体量の変化を表しており、(a)は免疫前、(b)は免疫2週間後である。グラフの縦軸は抗体量を、横軸は添加血清の希釈倍数を示している。

【0051】

(a)のグラフに示されるように、免疫前ではノックアウトマウスと野生種マウスとで抗A I g M自然抗体の抗体量に差は認められなかった。しかし、(b)のグラフに示されるように、野生種マウスでは、免疫後に抗A I g M抗体の抗体量の増加が認められたのに対し、ノックアウトマウスでは、免疫の前後で抗A I g M抗体の抗体量にほとんど変化は認められなかった。

10

【0052】

一方、図3のグラフは抗A I g G抗体の抗体量の変化を表しており、(a)は免疫前、(b)は免疫6週間後である。グラフの縦軸は図2と同様に抗体量を、横軸は添加血清の希釈倍数を示している。

【0053】

(a)のグラフに示されるように、抗A I g G抗体は免疫前にはいずれのマウスでも認められないが、(b)のグラフに示されるように、野生種マウスでは抗A I g G抗体の産生が認められたのに対し、ノックアウトマウスでは抗A I g G抗体の産生は認められなかった。

20

【0054】

(実施例2)

N K T細胞の通常のペプチド抗原に対する抗体産生の影響を解析するため、上記ノックアウトマウスと、B a l b / c野生種マウス(M H Cハプロタイプd)とをそれぞれC 5 7 B L / 6野生型マウス(M H Cハプロタイプb)の胸腺細胞( $20 \times 10^6$ /マウス)で免疫し、抗アロM H C抗体の産生量をフローサイトメーターを用いて測定した(n = 6、比較対照として未処理群：n = 3)。

【0055】

同種M H C抗原の免疫は、C 5 7 B L / 6野生型マウスの胸腺を摘出、ディッシュで胸腺をすりつぶし、A C K l y s i n g s o l u t i o n (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA-2Na, and PBS, pH 7.4)で赤血球を除去、胸腺細胞を単離し199 mediumで $20 \times 10^6$ /mlに希釈、1 mlをマウス腹腔内に投与し、1週間隔で2回免疫した。

30

【0056】

抗同種M H C抗体(抗M H Cハプロタイプb抗体)の検出は、上記方法によりC 5 7 B L / 6野生型マウスの胸腺細胞を単離、f l o w c y t o m e t e r y ( F C M ) m e d i u m (PBS containing 0.1% BSA and 0.1% sodium azide)で $10 \times 10^6$ /mlとした。 $1 \times 10^6$  cellに対し、被検血漿10  $\mu$  lを添加して4 で1時間インキュベートした。二次抗体としてa n t i - m o u s e I g MもしくはI g G 1 , 2 a / b , 3 - b i o t i nを10  $\mu$  l添加し、4 で30分インキュベートした。さらにs t r e p t a v i d i n - P Eを添加、4 で15分インキュベートし、F A C S C a l i b u r f l o w c y t o m e t e r ( B e c t o n D i c k i n s o n )で解析、m e a n f l u o r e s c e i n i n t e n s i t y ( M F I )を抗体量とした。

40

【0057】

その結果を図4に示す。同図中、(a)はI g G 1、(b)はI g G 2 a / b、(c)はI g G 3のそれぞれサブクラス別のI g Gの抗体量の変化を表しており、縦軸はm e a n f l u o r e s c e i n i n t e n s i t y ( M F I )で抗体量を、横軸は経過期間を示している。

【0058】

50

未処理区ではいずれも抗体量に経時的な変化は認められなかったが、抗アロ I g G 型抗体の産生はノックアウトマウス及び野生型マウスともに正常に認められた。また、各サブクラス間でのクラススイッチにも差は認められなかった。

【 0 0 5 9 】

( 実施例 3 )

N K T 細胞と B - 1 細胞との間のシグナル伝達を抗 C D 1 d 抗体で阻害することにより抗血液型抗体の産生を抑制できるか否かを解析するため、B a l b / c 野生型マウスに抗 C D 1 d 抗体 ( rat anti-mouse CD1d monoclonal antibody、clone:1B1 ) をマウス 1 匹当たり 4 5 0  $\mu$  g 腹腔内投与した ( テストマウス、n = 3 )。また、同様に rat IgG2b 抗体 ( isotype control ) をマウス 1 匹当たり 4 5 0  $\mu$  g 腹腔内投与した ( 対照マウス、n = 3 )。

10

【 0 0 6 0 】

2 4 時間後、これらマウスをそれぞれヒト A 型赤血球で 1 週間隔で 2 回免疫し、抗血液型抗体の産生を前述のごとく、E L I S A を用いて測定した。

【 0 0 6 1 】

その結果を図 5、図 6 に示す。

【 0 0 6 2 】

図 5 のグラフは抗 A I g M 抗体の抗体量の変化を表しており、( a ) は免疫前、( b ) は免疫 6 週間後である。グラフの縦軸は抗体量を、横軸は添加血清の希釈倍数を示している。

20

【 0 0 6 3 】

( a ) のグラフに示されるように、免疫前ではテストマウスと対照マウスとで抗 A I g M 自然抗体の抗体量に差は認められなかった。しかし、( b ) のグラフに示されるように、対照マウスでは、免疫後に抗 A I g M 抗体の抗体量の増加が認められたのに対し、テストマウスでは、免疫の前後で抗 A I g M 抗体の抗体量にほとんど変化は認められなかった。

【 0 0 6 4 】

一方、図 6 のグラフは抗 A I g G 抗体の抗体量の変化を表しており、( a ) は免疫前、( b ) は免疫 6 週間後である。グラフの縦軸は図 5 と同様に抗体量を、横軸は添加血清の希釈倍数を示している。

30

【 0 0 6 5 】

同図の各グラフに示されるように、対照マウスでは抗 A I g G 抗体が免疫後に増加 ( 産生 ) し、クラススイッチが認められたのに対し、テストマウスでは免疫後にも抗 A I g G 抗体は増加 ( 産生 ) せず、クラススイッチは認められなかった。

【 0 0 6 6 】

( 実施例 4 )

ヒトの場合においても上述したマウスの場合と同様の効果が得られることを確認するため、ヒトリンパ球キメラマウスを用いて試験を行った。

【 0 0 6 7 】

ヒトリンパ球キメラマウスは、重度複合免疫不全マウス ( NOD.Cg-Prkdc<sup>s c i d</sup> 112rg<sup>tm1</sup> S u g / J i c ; 財団法人 実験動物中央研究所製 ) を購入し、この重度複合免疫不全マウスに、O 型ヒト健常ボランティアから採取した末梢血リンパ球をマウス 1 匹当たり 2 0  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個腹腔内投与して作製した。

40

【 0 0 6 8 】

リンパ球投与 6 日後に、抗 C D 1 d 抗体 ( mouse anti-human CD1d monoclonal antibody、clone:CD1d42 ) をマウス 1 匹当たり 5 0 0  $\mu$  g 腹腔内投与した ( テストマウス、n = 3 )。また同様に、mouse IgG1 抗体 ( isotype control clone:107.3 ) をマウス 1 匹当たり 5 0 0  $\mu$  g 腹腔内投与した ( 対照マウス、n = 4 )。なお、本実験ではヒトを対象としているため、ヒト C D 1 d 分子に特異的なモノクローナル抗体を作製して使用した。

【 0 0 6 9 】

50

リンパ球投与7日後に、ヒトA型赤血球で免疫した(マウス1匹当たり $8 \times 10^8$ 個)。そして、リンパ球投与21日後に、各マウスから脾臓を採取し、脾臓内ヒトCD19<sup>+</sup>B細胞中の抗A型レセプター表出B細胞の存在比率をフローサイトメーターで測定した。その結果を図7に示す。

【0070】

図7は、ヒトリンパ球キメラマウスの脾臓中における、ヒトCD19<sup>+</sup>B細胞中の抗A型レセプター表出B細胞の存在比率を表している。同図中、黒丸は各固体の値、白丸はその平均値である。

【0071】

同図に示すように、抗CD1d抗体を投与したテストマウスの脾臓中におけるA型抗原を認識するヒトB細胞は、コントロール抗体を投与した対照マウスの脾臓中と比べ、有意に存在比率が低下していた。すなわち、抗CD1d抗体は、ヒトB細胞の血液型抗原に対する応答についても特異的かつ著明に抑制することが確認された。

10

【産業上の利用可能性】

【0072】

マウスやヒト等の臓器移植や異種移植の他、自己免疫疾患の発生抑制などにも利用できる。

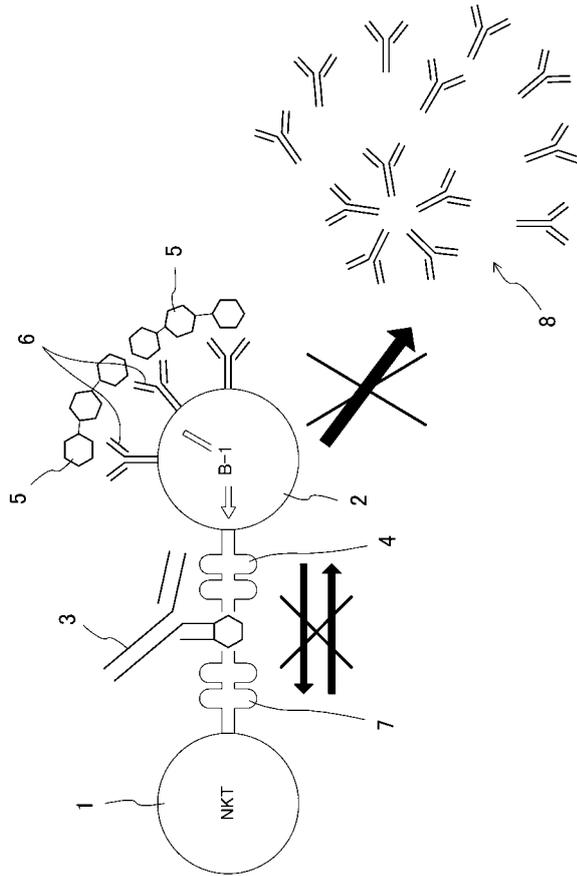
【符号の説明】

【0073】

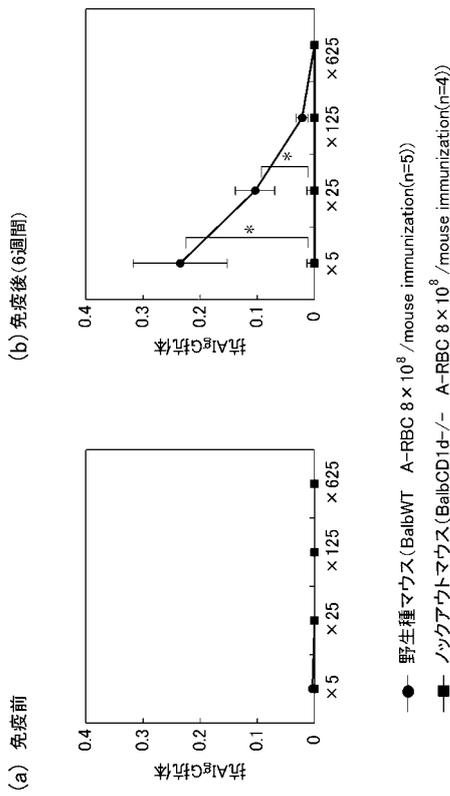
- 1 NK T細胞
- 2 B-1細胞
- 3 抗CD1d抗体
- 4 CD1d分子
- 5 糖鎖抗原
- 6 抗原レセプター
- 7 iTcR
- 8 抗体

20

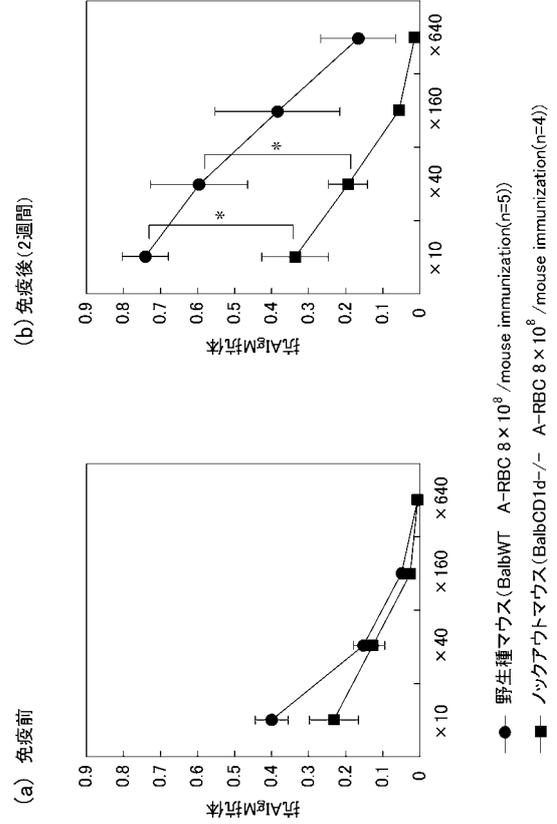
【 図 1 】



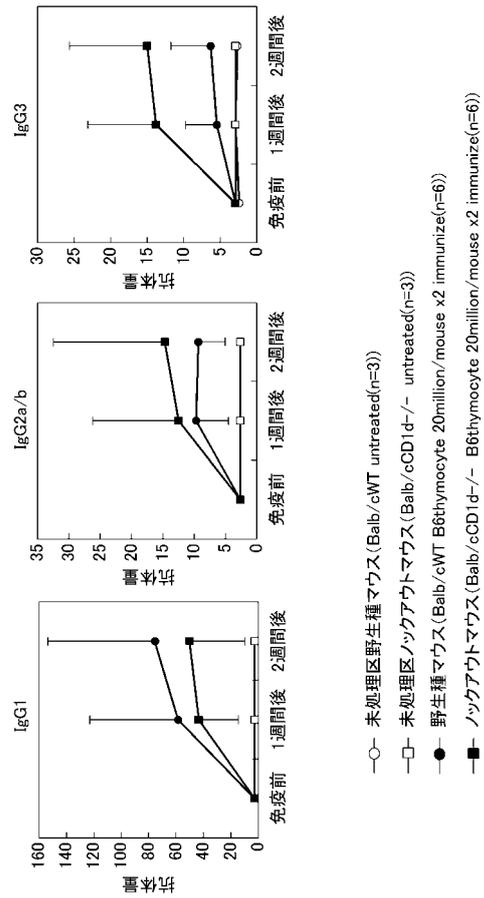
【 図 3 】



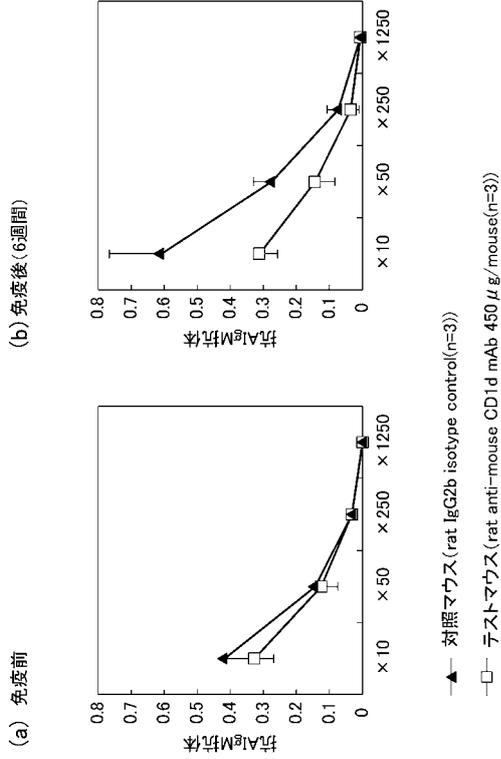
【 図 2 】



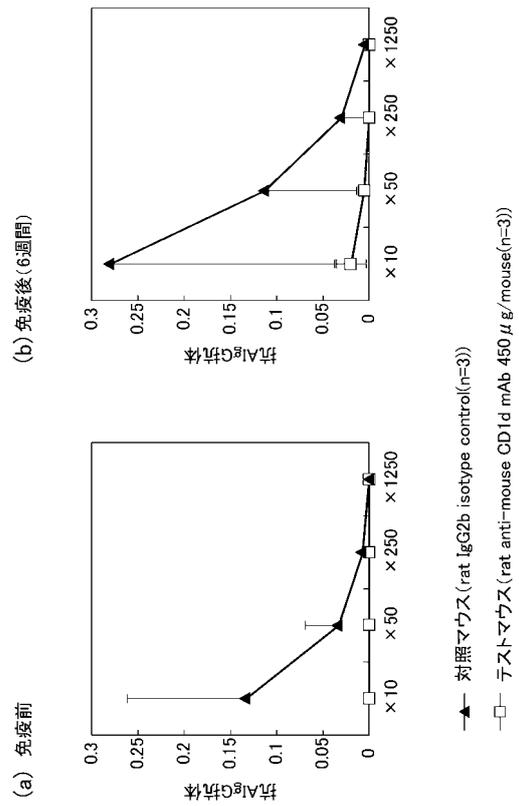
【 図 4 】



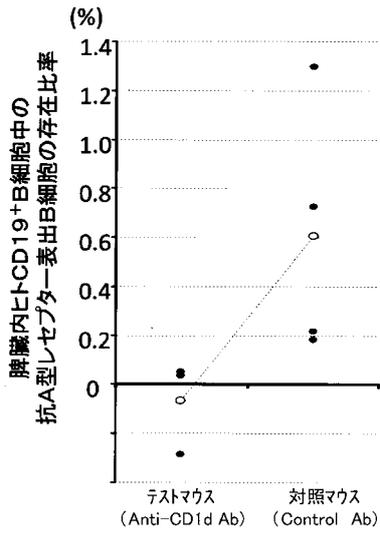
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成23年1月27日(2011.1.27)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N K T細胞とB細胞との間のシグナル伝達を阻害して抗体の産生を抑制する抗体性拒絶反応抑制剤であって、

抗C D 1 d抗体を含み、

産生が抑制される前記抗体は、ヒト由来の抗原に対する抗体であり、

産生が抑制される前記抗体にペプチド抗原に対する抗体は含まれず、当該抗体の産生が特異的に抑制されることを特徴とする抗体性拒絶反応抑制剤。

【請求項2】

請求項1に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記B細胞がB - 1細胞を含む抗体性拒絶反応抑制剤。

【請求項3】

請求項1又は請求項2に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

産生が抑制される前記抗体に糖鎖抗原に対する抗体が含まれる抗体性拒絶反応抑制剤。

【請求項4】

請求項3に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記糖鎖抗原が血液型糖鎖抗原を含む抗体性拒絶反応抑制剤。

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

請求項1に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記抗C D 1 d抗体がモノクローナル抗体である抗体性拒絶反応抑制剤。

【請求項7】

請求項6に記載の抗体性拒絶反応抑制剤であって、

前記抗C D 1 d抗体がヒト型抗体である抗体性拒絶反応抑制剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

[0039]

マウスの場合であれば、例えば、既に抗C D 1 d抗体が市販されているため、その抗C D 1 d抗体を入手して適宜調整することで簡単にマウス用の抗体性拒絶反応抑制剤を得ることができる。

[0040]

そして、そのマウス用の抗体性拒絶反応抑制剤を、例えば、マウス1匹当たり抗C D 1 d抗体が400～600 $\mu$ g、好ましくは450 $\mu$ gとなるように投与すれば、そのマウスの抗血液型抗体の産生を特異的に抑制することができ、血液型にかかわらず臓器移植することが可能になる。

[0041]

ヒトの場合であれば、ヒト型のモノクローナル抗体を作成する一連の公知技術を使用して、モノクローナルなヒト型の抗C D 1 d抗体を作製すればよい。そして、作製したモノ

クローナルなヒト型の抗CD1d抗体と、定法に従って保存剤や栄養剤等のその他の補助薬剤等とを混合し、例えば注射薬として調整することにより、ヒト用の抗体性拒絶反応抑制剤を得ることができる。

[0042]

そしてその所定量（例えばマウス1匹を30gとして体重を基に換算すればよい）を投与すれば、A型やB型の抗血液型抗体の産生を特異的に抑制することができ、血液型にかかわらず通常の免疫反応を損なうことなく臓器移植することなどが可能になる。

[0043]

なおその際には、この抗CD1d抗体は、既にB-1細胞に分化してしまった細胞に対して有効なものであるため、この抗CD1d抗体の投与と併せて、B-0細胞からB-1細胞の分化を抑制するカルシニューリン阻害剤を投与すれば、いっそう効果的であると考えられる。

[0044]

[0045]

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

[0046]

以上説明したように、本発明の抗体性拒絶反応抑制剤であれば、比較的簡単に実用化できるうえ、その使用によりABO式血液型が不適合なドナー等からも安心して臓器移植ができるようになることが予想されるため、ドナー不足の解消に役立つと考えられる。

[0047]

（実施例1）

NKT細胞の血液型糖鎖抗原に対する抗体産生への影響を解析するため、Balb/c CD1d<sup>-/-</sup>マウス（iTCRのリガンドであるCD1dを欠き、NKT細胞が顕著に減少していることが知られているマウス；ノックアウトマウス、n=4）と、比較対照のBalb/c野生種マウス（n=5）とをヒトA型赤血球（ $8 \times 10^8$ /マウス）で免疫し、抗血液型A抗体産生をELISAを用いて測定した。

[0048]

ヒトA型赤血球の免疫は、血液型がA型の健常人ボランティアから採血し、PBSで2回洗浄後、 $8 \times 10^8$ /mlに希釈してその1mlをマウス腹腔内に投与し1週間隔で2回免疫した。

[0049]

抗A抗体価のELISAを用いた検出は、ポリスチレン96wellフラットボトムプレート（costar）を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  A-BSA（bovin serum albumin）（Dextra）、もしくはバックグラウンドコントロールとして $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  BSA（Roche）で4、8時間コーティングした。プレートを洗浄後、1%BSAでブロッキングし、希釈マウス血清を各wellに添加して、室温で2時間インキュベーションした。次に、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗マウスIgMもしくはIgG-HRP（Southern Biotech）を二次抗体として添加し、室温で1時間インキュベーションした。プレートの洗浄の後、 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$  O-phenylendiamine（SIGMA）を添加、発色し、マルチプレートリーダー（COLONA）で492nmでの吸光度を測定した。A-BSAコーティングプレートの吸光度より、BSAバックグラウンドプレートの吸光度を引き、その差を抗A抗体価とした（非特許文献1参照）。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002825

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K39/395(2006.01) i, A61P37/06(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00-39/44, A61P37/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) , JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIU, S. et al, CD1d-mediated interaction between activated T cells and B cells is essential to B-cell proliferation and anti-alpha-Gal antibody production, Transplantation proceedings, 2009.02, Vol.41, No.1, p.398-402, particularly, page 398, right column, lines 4 to 7, page 399, left column, lines 8 to 10, 31 to 34, page 400, 2nd item of RESULTS, fig. 2	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	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
"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)	"X"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	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
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 08 June, 2010 (08.06.10)	Date of mailing of the international search report 22 June, 2010 (22.06.10)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002825

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IREI, T. et al, The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation, Blood, 2007, Vol.110, No.13, p.4567-75, particularly, Abstract, page 4569, item of "In vivo treatment using A-BSA, anti-BSA Abs, and/or CsA", fig. 4, 5	1-7
Y	JP 2001-512438 A (Immunomedics, Inc.), 21 August 2001 (21.08.2001), pages 24 to 26 & WO 1998/034957 A1 & EP 1007569 A1 & US 6090381 A	1-7
Y	JP 2004-500154 A (Advanced Extravascular Systems), 08 January 2004 (08.01.2004), paragraphs [0001] to [0014] & WO 2000/074824 A1 & EP 1315551 A1 & US 2004/0161736 A1	1-7
Y	JP 2008-546647 A (Duke University), 25 December 2008 (25.12.2008), paragraph [0007] & WO 2006/133450 A2 & EP 1904101 A & US 2006/0280738 A1	1-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002825

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.: 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 8 pertains to a method for treatment of the animal body by surgery and thus relates to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
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.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

For the reasons stated below, the present international application includes two inventions which do not comply with the requirement of unity of invention.

(Main invention) The inventions according to claims 1-7.

The inventions relating to an antibody-type rejection inhibitor which comprises an anti-CD1d antibody and can inhibit the production of an antibody. (2<sup>nd</sup> invention) The invention according to claim 8.

The invention relating to a method for screening an antibody-type rejection inhibitor, which comprises the steps of: administering a component of interest to a mouse interperitoneally; and immunizing the mouse with erythrocytes  
(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  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 claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/002825

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

and measuring the production of an anti-blood type antibody.

Comparison is made between the main invention and the 2<sup>nd</sup> invention, and it is found that a common matter between the two inventions is "an antibody-type rejection inhibitor". However, a prior art document JP 2008-546647A discloses an antibody-type rejection inhibitor (see [0007], [0010], and [0014]-[0017]). Therefore, it is found that the matter is not novel. Consequently, "an antibody-type rejection inhibitor" cannot be regarded as "a special technical feature" in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence. It cannot be considered that the two inventions have any same special technical feature. It cannot also be considered that the two inventions have any corresponding special technical feature corresponding special technical feature.

Thus, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features between the main invention and the 2<sup>nd</sup> invention, and the two inventions cannot be regarded as being so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2010/002825									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i											
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. A61K39/00-39/44, A61P37/06											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
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) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
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 請求項の番号									
Y	LIU, S. et al, CD1d-mediated interaction between activated T cells and B cells is essential to B-cell proliferation and anti-alpha-Gal antibody production, Transplantation proceedings, 2009.02, Vol.41, No.1, p.398-402, 特に、第398頁右欄第4行目～第7行目、第399頁左欄第8行目～第10行目、同欄第31行目～第34行目、第400頁RESULTSの2つ目の項目及びFig2参照	1-7									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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」国際出願日前の出願または特許であるが、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 08.06.2010		国際調査報告の発送日 22.06.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 岩下 直人	4 C 4764								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 0 2 8 2 5
C (続き) . 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 請求項の番号
Y	IREI, T. et al, The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation, Blood, 2007, Vol.110, No.13, p.4567-75, 特に、Abstract, 第4569頁 "In vivo treatment using A-BSA, anti-BSA Abs, and/or CsA" の項, Figure4 及び Figure5 参照	1-7
Y	JP 2001-512438 A (イムノメディクス, インコーポレイテッド) 2001.08.21, 第24頁~第26頁 & WO 1998/034957 A1 & EP 1007569 A1 & US 6090381 A	1-7
Y	JP 2004-500154 A (アドバンスト エクストラバスキュラー システムズ) 2004.01.08, 【0001】 ~ 【0014】 & WO 2000/074824 A1 & EP 1315551 A1 & US 2004/0161736 A1	1-7
Y	JP 2008-546647 A (デューク ユニバーシティ) 2008.12.25, 【0007】 & WO 2006/133450 A2 & EP 1904101 A & US 2006/0280738 A1	1-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/002825

ここで、主発明と第2発明とを対比するに、両者に共通する事項は「抗体性拒絶反応抑制剤」である。しかしながら、先行技術文献JP 2008-546647 Aには、抗体性拒絶反応抑制剤が記載されているから（【0007】、【0010】及び【0014】～【0017】参照）、当該事項は、新規ではないことが明らかとなった。結果として、「抗体性拒絶反応抑制剤」は、PCT規則13.2の第2文の意味において「特別な技術的特徴」とは認められないから、両者は同一の特別な技術的特徴をもつものとは認められない。また、両者が対応する特別な技術的特徴をもつものとも認められない。

したがって、主発明と第2発明とは、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/002825

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項8は、手術による動物の体の処置方法を包含するものであって、PCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度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。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

以下の理由で、この国際出願は、発明の単一性を満たさない2つの発明を含む。

(主発明) 請求項1～7に係る発明

抗CD1d抗体を含有し、抗体の産生を抑制する抗体性拒絶反応抑制剤の発明。

(第2発明) 請求項8に係る発明

マウス腹腔内に対象成分などを投与する工程と、該マウスを赤血球で免疫し、抗血液型抗体の産生を測定する工程とを含む抗体性拒絶反応抑制剤のスクリーニング方法の発明。

(「特別ページ」に続く。)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (74) 代理人 100117581  
弁理士 二宮 克也
- (74) 代理人 100117710  
弁理士 原田 智雄
- (74) 代理人 100124671  
弁理士 関 啓
- (74) 代理人 100131060  
弁理士 杉浦 靖也
- (74) 代理人 100131200  
弁理士 河部 大輔
- (74) 代理人 100131901  
弁理士 長谷川 雅典
- (74) 代理人 100132012  
弁理士 岩下 嗣也
- (74) 代理人 100141276  
弁理士 福本 康二
- (74) 代理人 100143409  
弁理士 前田 亮
- (74) 代理人 100157093  
弁理士 間脇 八蔵
- (74) 代理人 100163186  
弁理士 松永 裕吉
- (74) 代理人 100163197  
弁理士 川北 憲司
- (74) 代理人 100163588  
弁理士 岡澤 祥平
- (72) 発明者 大段 秀樹  
広島県広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内
- (72) 発明者 伊禮 俊充  
広島県広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 DD62 DD63 EE01

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。