

判決言渡 平成 20 年 2 月 13 日

平成 18 年 (行ケ) 第 10490 号 審決取消請求事件

口頭弁論終結日 平成 20 年 2 月 6 日

判 決

| | | |
|-----------|-----|-------------------------------------|
| 原 | 告 | ザ・レジェンツ・オブ・ザ・ユニバー シティ・オブ・カリフォルニア |
| 訴訟代理人弁理士 | 中 | 村 静 男 |
| 同 | 渋谷 | 健 |
| 同 | 森 島 | な る み |
| 被 | 告 | 特 許 庁 長 官 |
| | 肥 塚 | 雅 博 |
| 指 定 代 理 人 | 富 | 永 み ど り |
| 同 | 鵜 飼 | 健 |
| 同 | 徳 永 | 英 男 |
| 同 | 内 山 | 進 |

主 文

- 1 原告の請求を棄却する。
- 2 訴訟費用は原告の負担とする。
- 3 この判決に対する上告及び上告受理申立てのための付加期間を 30 日と定める。

事 実 及 び 理 由

第 1 請求

特許庁が不服 2001 - 9191 号事件について平成 18 年 6 月 20 日にした審決を取り消す。

第 2 事案の概要

本件は、米国法人である原告が国際特許出願の方法により名称を「クローン

化グルタミン酸デカルボキシラーゼ」(CLONED GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE)とする発明につき特許出願をしたところ、拒絶査定を受けたので、これを不服として審判請求をしたが、特許庁から請求不成立の審決を受けたので、その取消しを求めた事案である。

争点は、請求項1～11からなる本願のうちその1項及び6項である本願発明1及び6が、下記引用例1～3に記載された発明との関係で進歩性(特許法29条2項)を有しているかどうかである。

引用例1：B and C「Characterization of the Protein Purified with Monoclonal Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase」The Journal of Neuroscience, Vol.8, No.6, 1988 p.2123-2130 (以下、この発明を「引用発明1」という。)

引用例2：Dほか「Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase」Nature, Vol.347, 1990.Sep.13, p.151-156 (以下、この発明を「引用発明2」という。)

引用例3：Eほか「64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes」THE LANCET, Vol.335, 1990 Jun., p.1357-1360 (以下、この発明を「引用発明3」という。)

第3 当事者の主張

1 請求の原因

(1) 特許庁における手続の経緯

原告は、上記名称の発明(発明者：A外2名)につき、1990年(平成2年)9月21日の優先権(米国)を主張して、1991年(平成3年)9月23日に国際特許出願(PCT/US91/06872, WO92/05

446。以下「本願」という。)をし(特願平3-518259号),平成4年5月20日に特許法184条の4に基づき日本国特許庁に翻訳文を提出した(国内公表 特表平5-503220号 は平成5年6月3日。甲11はそこに記載された明細書。請求項の数38)。

その後,原告は,平成12年4月10日付けで明細書を補正した(以下「本件補正」という。請求項の数11。甲12)が,平成13年2月26日拒絶査定を受けたので,平成13年6月4日付けで不服の審判請求を行った。

特許庁は,上記請求を不服2001-9191号事件として審理した上,平成18年6月20日,「本件審判の請求は,成り立たない」との審決をし,その謄本は平成18年6月30日原告に送達された。

(2) 発明の内容

本件補正後の特許請求の範囲は,上記のとおり請求項1~11から成り,そのうち請求項1及び6は下記のとおりである(以下,請求項1の発明を「本願発明1」,請求項6の発明を「本願発明6」という。これらを総称して「本願発明」ということがある。)。

記

「【請求項1】以下の(a)-(c)のいずれかから選択されるタンパク質をコードするcDNA:

(a) 図2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質;

(b) 図3に示すアミノ酸配列からなるタンパク質;

(c) 図2又は図3に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失,置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる(a)もしくは(b)由来のタンパク質であって,かつグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項6】図2又は図3に示すアミノ酸配列からなるGAD₆₅に対す

る自己抗体のためのエピトープを少なくとも１個有する，アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするｃＤＮＡ配列から本質的になるｃＤＮＡ配列。」

なお，図２は別紙１（図２Ａ～２Ｃ）のとおりであり，図３は別紙２（図３Ａ～３Ｄ）のとおりである。

(3) 審決の内容

ア 審決の内容は，別紙審決写しのとおりである。その理由の要点は，本願発明１及び６は，引用例１～３に記載された発明に基づいて容易に発明することができたから，特許法２９条２項により特許を受けることができない，というものである。

イ なお，審決は，本願発明１に含まれる「図２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするｃＤＮＡ」と引用発明１との一致点及び相違点を次のとおり認定している。

一致点

いずれもラット由来のＧＡＤに関連するタンパク質に関する発明である点

相違点

本願発明１は，ＧＡＤ活性が確認された「図２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質」をコードするｃＤＮＡであるのに対し，引用発明１には，ラットＧＡＤ関連タンパク質については，その部分アミノ酸配列が記載されているものの，ＧＡＤ活性を有することについて示唆されるに留まり，そのようなＧＡＤ関連タンパク質をコードするｃＤＮＡについては記載されていない点

ウ また，審決は，本願発明６と引用発明１との一致点及び相違点を次のとおり認定している。

一致点

いずれもラット由来の G A D に関連するタンパク質に関する発明である点

相違点

本願発明 6 は「図 2 又は図 3 に示すアミノ酸配列からなる G A D₆₅ に対する自己抗体のためのエピトープを少なくとも 1 個有する，アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする c D N A 配列から本質的になる c D N A 配列」であるのに対し，引用発明 1 には，そのような c D N A が記載されていない点

(4) 審決の取消事由

しかしながら，審決の認定判断には，次のとおり誤りがあるから，違法として取り消されるべきである。

ア 取消事由 1（引用発明 1 は引用発明としての適格性を欠く）

引用例 1（甲 1）の表 2（Table 2）に記載のラット G A D のアミノ酸配列 97 個のうち，96 個が正しいものであったことは認める。

しかし，これらの 96 個のアミノ酸は連続していないというよりもむしろ，間に散らばった不確定のアミノ酸によって，そしてメチオニンの位置での臭化シアン開裂による配列の中断によって，より小さいストレッチに分けられていることに注意すべきである。

引用例 1 のラット G A D 部分アミノ酸配列の最も長いストレッチの中には，ネコ G A D₆₇ アミノ酸配列と同じ配列を有する長いストレッチがある。G A D₆₇ と異なる遺伝子を見つけようとするならば，これらの領域をプローブとして用いることは避けなければならない。ネコ G A D₆₇ と異なる残りのアミノ酸配列領域は非常に短く，必要になるであろうプローブにおいて必要な縮退が特に与えられた核酸プローブを設計するためには最適とはいえない。さらに，アミノ酸の違いが，種の違いのみによるものか否かは本願優先日（1990 年〔平成 2 年〕9 月 21 日）当時知られていな

かったのであり，配列の違いは単なる誤りであるかもしれなかった。ラット G A D₆₇の全アミノ酸配列の決定を報告した L ほか「Rat Brain Glutamic Acid Decarboxylase Sequence Deduced from a Cloned cDNA」Journal of Neurochemistry Vol.54, No.2, 1990, P.703-705 (甲 7) にも，ラット G A D₆₇のアミノ酸配列と引用例 1 に開示された 59 k D a ラット G A D 部分アミノ酸配列との「諸相違はタンパク質配列決定に内在する可能性が大きい」(704 頁右欄 5 行～ 6 行，訳文は原告準備書面(2)の 1 頁及び原告の平成 18 年 2 月 27 日付け上申書 8 頁による) という記載があり，配列決定におけるアーティファクトによって不一致となっているのではないかと示唆されているように，引用例 1 に開示された 59 k D a のラット G A D 部分アミノ酸配列自体が信頼できるものであるとの確証は，本願優先日当時の当業者には無かった。

したがって，引用発明 1 は引用発明としての適格性を欠いている。

イ 取消理由 2 (本願発明 1 及び 6 は引用発明 1 から容易に発明することができたものではない)

(ア) 本願発明 1 について

審決は，「ラット脳由来の c D N A ライブラリーを構築し，ラットの 59 k D タンパク質の部分アミノ酸配列とネコ G A D のアミノ酸配列間で保存された領域 (記載事項 (a 3)) を基に縮重プライマーを調製し，該 c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより，ラット脳由来の G A D をコードする c D N A をクローニングすることは，当業者が容易に想到し得ることである。また，これにより得られた c D N A が G A D の全長をコードするものでなかった場合でも，さらに，本願優先日前における周知技術であった 5 ' 末端側又は 3 ' 末端側の D N A 配列を決定する R A C E 法等の手法を適用して，全長 c D N A を得ること，及び，常法によりその配列を解析し，コードするアミノ酸配列を特

定すること及び、それがコードするGAD関連タンパク質がGAD活性を有することを確認することは、当業者にとって格別な困難性を有するものとも認められない。」と判断している（6頁5行～17行）。

しかし、この判断は、本願優先日（1990年〔平成2年〕9月21日）当時の技術水準に照らすと、次のとおり誤りであり、本願発明1は引用発明1から容易に発明することができたものではない。

a 引用例1の発表より後に、本願発明者らによって解明されたことであるが、GADにはその分子量によって区別され得るGAD₆₅及びGAD₆₇が存在し、これらはそれぞれ別の遺伝子によってコードされている（本願明細書〔甲11〕6頁17行～最終行）。引用例1に開示されたラットの59kDタンパク質がラットGAD₆₅であり、これと対比して並べられているネコGADがネコGAD₆₇であることも引用例1の発表後に明らかになった事実である。

ところが、1980年代の半ばから終わりには、GADが単一の遺伝子によってコードされているのか、又は1より多い遺伝子によってコードされているのかという問題については答えが出ないままであった。少なくとも二つの理由、すなわち、当時の文献の水準及び1より多い遺伝子の存在を支持するデータが継続して欠如していたことから、この問題に答えることは困難であった。

本願発明者らは、単一GAD遺伝子仮説を支持するか又は否定する実験データを得るために、低及び高緊縮条件を用いて多数の実験を行った。本願発明者らは、30%ミスマッチ、ハイブリダイゼーション（サザンブロット及びスクリーニング）で、高緊縮と低緊縮とを比較し、第2の遺伝子の証拠は無いことを繰り返し見出した。これらのデータから、本願発明者らは、第2のGAD遺伝子が存在するならば、それは、70%未満の同一性であり、低緊縮ハイブリダイゼーシ

ョンを用いて検出又は単離することはできないと結論付けた。

したがって、引用例１に報告されたラットペプチド配列（部分アミノ酸配列）が実際のところ何を示しているのか当時は不明だったのである。

BとCが１９８７年７月に引用例１を発表してから、１９９１年に本願発明者らが論文でGAD₆₇とGAD₆₅のクローニングを報告するまで４年が経過している。４年間は非常に長い期間である。ラットGAD₆₅ cDNAを特定することが当業者に容易であったならば、引用例１を発表したBとCが彼ら自身でGAD₆₇とGAD₆₅をクローニングする実験を行ったであろう。

本願発明者らが１９８９年に発表した論文においても、ヒト及びラットのGADは、ただ一つの遺伝子であると記載されている（甲８の１〔F, G and A「TWO FORMS OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE (GAD), WITH DIFFERENT N-TERMINAL SEQUENCES, HAVE DISTINCT INTRANEURONAL DISTRIBUTIONS」 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, VOLUME 15, 1989, P. 487〕及び甲８の２〔G, H, F and A「IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES USING A NEW ANTISERUM AGAINST BACTERIALLY PRODUCED FELINE GLUTAMATE DECARBOXYLASE」 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, VOLUME 15, 1989, P. 488〕）。

本願発明者らは、１９９０年に、二つのGAD遺伝子に関する論文を、雑誌「SCIENCE」に投稿したところ、59 kD及び63 kDのGADタンパク質は、二つの遺伝子の存在によるものではなく、異なるスプライシングによって説明されると「SCIENCE」がまだ考えていたために、最初は掲載を拒絶された（甲１３〔本願発明者の一人であるIの宣誓書〕）。

Ｊらは、マウスにおいて第２のＧＡＤ遺伝子を見い出していたが、それは偽遺伝子であった（甲６〔Ｊほか「Sequences Homologous to Glutamic Acid Decarboxylase cDNA Are Present on Mouse Chromosomes 2 and 10」GENOMICS 6, 1990, P.115-122〕）。このことは、引用例１に関して大きな疑問を投げかけるものであった。引用例１に開示されたラットＧＡＤ部分アミノ酸配列は本当に機能性遺伝子を示しているのか、又は単にＪによるマウスで見い出されたものの、ラットにおける同等物ではないかという疑問であった。

Ｌらの研究（甲７〔Ｌほか「Rat Brain Glutamic Acid Decarboxylase Sequence Deduced from a Cloned cDNA」Journal of Neurochemistry Vol.54, No.2, 1990, P.703-705〕）は、彼らの研究によって得られたラットＧＡＤクローンが、引用例１によって報告されたものとよく一致し、違いは技術的な問題であることを示唆している。しかし、当時Ｌらは理解していなかったが、ＬらがクローニングしていたのはラットＧＡＤ₆₇だったのである。甲７によってラットＧＡＤ₆₇の全アミノ酸配列が解明されたからといって、甲７の著者も述べているとおり、引用例１の部分アミノ酸配列決定に誤り（アーティファクト）があったかもしれないという認識が当業者にはあったのであるから、「５９ｋＤａのラットＧＡＤは、ネコＧＡＤのオーソログではなく、異なる型であること」が、本願優先日前に明らかであったとはいえない。

本願優先日の周辺に公表された、ＧＡＤに関する論文は、いずれもＧＡＤ₆₅には全く言及していない（甲１５～１９）。また、糖尿病関連団体（diabetes community）の研究室は、初期に研究室を解散した。

b 引用例１（甲１）には、「５９ｋＤａタンパク質は、高い程度で、

ネコ G A D (F ら , 1986 ; K ら , 1987) に対する c D N A によってコードされたタンパク質の推定されたアミノ酸配列と配列相同性を有している。従って , これらのタンパク質は , 共通の祖先からラット及びネコのへの進化の間に分岐した単一遺伝子の生成物であるか , 又は両方の種で見出される遺伝子の密接に関係するセットのメンバーであるかのいずれかである。」旨の記載がある (2 1 2 9 頁左欄 2 8 行 ~ 4 2 行 , 訳文は原告準備書面 (1) の 9 頁による) 。 このように , 引用例 1 は , G A D は 1 個又は 2 個の遺伝子によってコードされていると , 二つの選択肢があることを述べている。しかし , 引用例 1 が報告したデータからは , これら二つの可能性のいずれであるかを決定することはできなかった。引用例 1 は , 引用例 1 で報告したデータを考慮すれば , どのようにしてこれが解明できるのかについては述べていなかった。

- c その後すぐに , 本願発明者らは , 単一 G A D 遺伝子仮説を試験する別の方法がないだろうかと考え始めた。

本願発明者らが直面した問題は次のとおりであった。すなわち , 報告されているネコ c D N A とラットタンパク質の間の違いは「実在」なのか , 又はこれらの違いは , 単にラット又はネコの種の違いとペプチド配列決定における誤りの総和なのだろうか , さらに , これをどのように検証することができるだろうかということであった。

再度の第 2 の G A D 遺伝子を明らかにするための低緊縮ハイブリダイゼーション実験は , 繰り返し失敗に終わったので , 本願発明者らは , 観察された違いが第 2 の G A D 遺伝子を示しているのか否かを直接試験できる別の何かを試さなければならないことを認識した。

そこで , 本願発明者らは , 縮退プライマーを P C R に用いて同じ種の中の関連する遺伝子をクローニングすることを考えた。しかし , こ

の実験には、次のような困難があった。

第1に、この実験を成功させるためには、ポリメラーゼ鎖延長のため、cDNAにアニーリングさせられるだけの、十分な濃度の正しいオリゴヌクレオチド、又は正しいものに近いオリゴヌクレオチドが必要であった。しかし、この実験のために用いるプライマーはかなり縮退していたために、増幅された生成物を生産することができなかった。

第2に、本願発明者らは、ネコGADのラット同等物のゲノム構造又は潜在的な第2のGAD遺伝子のゲノム構造を知らなかった。

もし、いくつかの大きなイントロンがあったなら、PCR生成物の長さは効率的に増幅できないほどに大きくなるため、否定的な結果をもたらしたであろう。

また、1980年代終わりには、配列決定分析の前にPCR生成物をクローニングする必要があったので、得られた任意のPCR生成物をどうやってクローニングするかという問題もあった。設計されたプライマーに内在する制限部位が目的とするcDNAに内在していて、クローニングのために選択した酵素が、想定される第2GAD遺伝子の内部に存在する特異的な配列を切断してしまえば、想定される第2の遺伝子は排除されることになる。

第3に、一旦増幅が起きれば、縮退は非常に広範に及ぶため「キナーゼ化された(kinased)」オリゴヌクレオチドスクリーニングによる陽性シグナルを得ることはできないので、引用例1の配列を肯定的に選択する方法(GAD₆₇と異なる領域を同定し、そしてこの異なる領域を含むcDNAをクローニングするためのPCRプライマーを設計するために、引用例1に開示されたラットGAD部分アミノ酸配列を用いること)はなかった。

転写率，又はGAD₆₅及びGAD₆₇をコード化するmRNAの安定性の違いによって，タイプの異なるノイズが生じ得る。GAD₆₇とGAD₆₅の発現濃度が大きく異なっていたり，安定性が異なっている場合には，ゲル電気泳動によるノイズ除去は役に立たない。それらのノイズ集団（their prevalence）における種類の違いは簡単に100～1000倍になったであろう。1990年代の初期には，単一遺伝子の配列決定はいまだ非常に困難で費用のかかる仕事であった。そのころは，単一遺伝子の配列決定は，大学院生の卒業論文が大部分を占めており，せいぜい10～20個のクローンを配列決定したものであった。この時点で，GAD₆₅の存在が否定的であったならば，より多くのcDNAクローンの配列決定を続けるために必要な時間，費用及び努力を費やすことが正しいと判断することは難しかった。

そこで，本願発明者らは，引用例1のラットGAD部分アミノ酸配列とネコGAD₆₇アミノ酸配列の間で異なっている領域をプローブとして用いるのではなく，ネコGAD₆₇アミノ酸配列と類似の引用例1のラットGAD部分アミノ酸配列の領域に対応する，ネコGAD₆₇由来の配列をプローブとして用い，ネコオースログにハイブリダイズしないものはすべて第2GADを示すという考えを持って，「否定的選択（negative selection）」により，ネコGAD同等物をスクリーニングした。多くの「的はずれの」PCR由来の増幅産物があるので，このような否定的選択は難しいことが周知である。

しかし，上記の考え（否定的選択）の何度かの繰り返し試行の後，本願発明者らは，二つの異なる配列集団を同定することに成功した（本願明細書〔甲11〕記載の実施例1は，否定的選択そのものではないが肯定的選択も使用していない。複合的な方法を用いたものである。）。

しかし、まだ、これらの二つの同定された配列集団のうちのいずれかが発現された偽遺伝子である可能性があった。本願発明者らは、続いて、cDNAライブラリーをスクリーニングし、ネコGAD及びラットGAD（上記同定された二つの配列集団のうちのネコGADと密接に配列されたもの）とは全く異なる配列に対する全長のクローンを得た。この新たな配列は、ラットGAD（上記同定された2つの配列集団のうちのネコGADと密接に配列されたもの）に対するヌクレオチド配列と65%類似であった。

次に、本願発明者らは、第2のGAD遺伝子を確かにクローニングしたことを証明する必要がある。本願発明者らが同定した新たな配列と引用例1の間の配列アラインメントを観察しても、本願発明者らが第2のGAD遺伝子をクローニングしたか否かを検討することにはならないからである。そこで、本願発明者らは、下記の実験を行った。

上記で得られた新たなラットcDNAによるサザンブロットを行った。これは、ネコGADプローブによって認識されない、全体として異なるセットのバンドを明らかにした。これにより、新たなラットcDNAが上記同定された二つの配列集団のうちのネコGADと密接に配列されたものの遺伝子から誘導されたものでなく、異なる遺伝子から誘導されたことが証明された。

新たなラットcDNAを用いたノーザンブロットによって、ネコGADのプローブによって以前には認識されなかった別のバンドを検出した。これは、サザンブロットからの結論と辻褄の合うものであった。

新たなラットcDNAを用いた全長のタンパク質発現によって、化学量論量のグルタミン酸塩をGABAに変換するタンパク質を生

産した。したがって、本願発明者らは、ラット G A D をコードする第 2 の G A D 遺伝子をクローニングした。その分子量の計算値は、
～ 6 万 5 0 0 0 であったので、本願発明者らはそれを G A D_{6.5} と命名した。

d 以上のとおり、本願発明者らによって用いられたラット G A D (ラット G A D_{6.5}) を単離する方法は、決して自明なものではなく、創意に富んだものであった。引用例 1 の配列はこのクローンを同定するのに、用いなかったし、用いることができなかったのである。

本願発明者らは、2 0 0 7 年 (平成 1 9 年) 6 月 2 5 日に、PubMed を用いて期間を区切った文献検索を行ったところ、「low + hybridization + cloning」に関する 1 9 8 5 年から 1 9 9 0 年の時間枠での検索によって、4 1 1 件の論文がヒットした。しかし、「degenerate + primer + PCR + cloning」に関する 1 9 8 5 年から 1 9 9 0 年の時間枠での PubMed 検索では、たった 4 件の論文しかヒットせず、これは前者と比べて 1 0 0 倍少ない。また、「mixed + primer」で PubMed 検索をすると、1 9 8 5 年 1 月 1 日から 1 9 9 0 年 9 月 2 1 日の時間枠では、2 6 件の論文がヒットしたが、この中には、本願発明者らが採用した方法に関するものは 1 件もなく、「本願優先日時点での c D N A のクローニングに関する周知技術」が存在したことを示すものもなかった。このことは、本願優先日当時において、縮退プライマー P C R クローニングの「周知技術」を用いて本願発明をすることが容易であるということがいかに不合理であることを証明している。

本願発明者らが、ラット G A D_{6.5} c D N A のクローニングを完了したのは、本願の図 4 のラット G A D_{6.5} とヒト G A D_{6.5} のアミノ酸配列の比較を行った日付「1 9 9 0 年 8 月 2 2 日」(本願の図 4 A [甲 1

1]には、「1992年8月22日」と記載されているが、本願の基となっている国際出願の国際公開公報WO92/05446号[甲23]のFIG.4Aには「AUGUST 22, 1990」(1990年8月22日)と記載されているから、上記の「1992年8月22日」がタイプミスであることは明らかである。)より前であり、実際には1989年の6月～8月の時間枠で行った実験によってである。クローニングの技術は、1991年付近を境に大きく変わっており、1991年以前は、縮退PCR研究は極端に難しかった。本願発明における決定的なPCRを含む実験は1991年より十分に始められていたのである。

e 審決が、RACE法等を用いて、部分アミノ酸配列からGAD₆₅の5'末端を得ることができたと推測しているなら、正確ではない。なぜなら、RACE法では、一つの特異的なプライマーしか使用せず、それ以外のプライマーは非特異的(すなわち、Gの鎖)であるため、目的とする5'末端を検出し、続いてクローニングするためには、目的とする遺伝子に特異的なネスト化されたプライマーが必要であるところ、本願発明の場合には、多数の縮退プライマーを用いることになり、RACE法による解析は不可能であったからである。

f なお、被告は、「本願発明をすることが容易である」ということが何を意味するかを明らかにしていない。分子生物学者であれば、「容易である」とは、縮退PCRクローニングによってどうやって関連遺伝子をクローニングするかに関する詳細な標準操作手順書を書けることにあると定義するであろう。標準操作手順書とは、公開論文の単なる「材料及び方法」の項程度のものでないことは明らかである。標準操作手順書は、全ての機能性の問題、又は「バグ(bugs)」を除去するために、多くの研究者によって十分に開発され試験されたプロトコ

ール (protocol : 実験計画書) である。このようなプロトコールが作成できる段階でのみ, その操作が「容易である」と考えられる。しかるところ, 縮退プライマーPCRを用いて遺伝子をクローニングするためのそのような詳細なプロトコールは1990年又はそれ以前には無かったのである。

被告は, 縮退の「通常」の程度が何かを述べていない。「通常」という語句は, その技術が非常に頻繁に用いられており, 公表論文又は周知の事実のいずれかによって「通常」の範囲が存在することを意味する。本願発明者らは, 1990年又はその付近でPCRクローニングにおけるプライマーの縮退に関する「通常」の程度の定義を見い出すことはできなかった。

g また, 被告は, 後記3(2)ア(ア)のとおり, 乙10 (GREGORIO GILほか「Multiplal Genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.85, 1988, p.8963-8967) 及び乙11 (CHENG CHI LEEほか「Generation of cDNA Probes Directed by Amino Acid Sequence:Cloning of Urate Oxidase」Science, Vol.239, 1988, p.1288-1291) に基づく主張をするが, 次のとおり, これらの証拠によって本願発明1が容易になし得たとすることはできない。

(a) 乙10及び11は, cDNAをクローニングするRT-PCRの一般的な方法を記載している。これらの乙号証と本願発明1の異なる点は, 乙号証では曖昧でないアミノ酸配列の非常に長いストレッチを有する高度に精製されたペプチドを用いた(乙11の「Fig.1」の(B)及び乙10の「Fig.1」参照)のに対し, 本願発明1では, GAD₆₇と異なる引用例1の配列の領域は非常に短く, G

A D₆₅を直接にクローニングするのに使用することが難しかった。本願発明者らは引用例 1 のラット G A D 部分アミノ酸配列中のネコ G A D (ネコ G A D₆₇)と一致している、より長いストレッチを用いた。そして、本願発明者らは得られた G A D₆₇ではない c D N A に対するクローンをスクリーニングした。

(b) 乙 1 0 及び 1 1 における縮退のレベルは非常に低い。

乙 1 1 では、センス及びアンチセンスプライマーは、いずれも 3 2 種のプライマーの混合物であった。乙 1 0 に関しては、センスプライマーは、8 種のプライマーの混合物であり、アンチセンスは 1 2 種のプライマーの混合物であった。乙 1 0 及び 1 1 では、縮退のレベルが非常に低いので、完全に相補的な配列の有効濃度は非縮退プライマーを用いた P C R を完成させるのと実質的に同等であろう。本願発明 1 はこのようなケースではなかった。本願発明 1 では、センスプライマーが 6 1 4 4 種類のプライマーの混合物であり、アンチセンスプライマーが 4 0 9 6 種類のプライマーの混合物であった。明らかに、本願発明 1 における縮退のレベルは、実験の成功からはかけ離れている程に高かったのである。

(c) 生じる P C R 生成物の予想される長さが分かっているなら、実験の不確実性は非常に小さい。乙 1 0 及び 1 1 では、生じる P C R 生成物の長さが、塩基対のレベルまで正確に分かっていた。これに対し、本願発明 1 はこのようなケースではなかった。引用例 1 の部分アミノ酸配列は、C N B r (臭化シアン)断片であり、したがって、本願発明 1 で用いたのは、ネコ G A D (ネコ G A D₆₇)から演繹されたアミノ酸配列と一致しているアミノ酸配列の断片であった (甲 1 の Table 2 参照)。具体的に言えば、本願発明 1 において用いた二つの縮退プライマーは、隣接していないアミノ酸配列から得

られたものであり，前方のプライマーは，ヌクレオチド 7 1 1 でネコ c D N A と一致している断片から，そして他方は，ヌクレオチド 1 7 1 3 でネコ c D N A と一致している異なる断片から得た。したがって，本願発明者らは，「第 2 の」G A D の二つのプライマーの間のヌクレオチドの長さを知らなかった。本願発明者らが知っていたのは，当時存在していた G A D（後に G A D_{6.7} と呼ばれるようになった）の長さだけだった。本願発明者らは乙 1 0 及び 1 1 が享受した确实性を享受できなかった。

(d) プライマーの縮退及び配列類似性を有する他の c D N A（例えば，関連するデカルボキシラーゼ類）を原因とする大抵の場合のように，本願発明者らが複数の増幅されたバンドを得たなら，どのバンドを調べるべきだったのか。不純物である他のデカルボキシラーゼ類だけでなく，G A D_{6.5} の複数のスプライス形態が存在し（現在では，G A D_{6.5} 及び G A D_{6.7} の複数のスプライス形態が存在することが知られている），それによって多数の異なる P C R 生成物が生成されたらどうなるか。もし G A D_{6.5} の転写物の G A D_{6.7} の転写物に対する割合が 1：1 0 0 0 であつたらどうなったのか。これらの疑問があることからすると，被告の主張は，あまりにも簡単に割り切り過ぎている。

(e) 以上に，単一の G A D 遺伝子であると信じられていたという重要な事実と相まって，乙 1 0 及び 1 1 によって本願発明 1 をなすことが容易であつたということとはできない。

(イ) 本願発明 6 について

上記のとおり，引用例 1 に示されたラット部分アミノ酸配列から全長のラット G A D_{6.5} を得ることは容易ではなかった。その上，任意のそのような部分アミノ酸配列中の 6 ～ 1 0 個のアミノ酸の一続きのつながり

(stretch)を、簡単に選択しても、抗体に対するエピトープが存在することは保証されないであろう。

引用例1においては、タンパク質を精製するためにGAD-1抗体が使用されているが、GAD-1抗体はPEVKEK領域の外側のエピトープを認識する。また、GAD-1抗体が、GAD₆₅及びGAD₆₇からなるヘテロ二量体のうちの一方向の形態に完全に特異的であるのか、又はGADの複合形態又は関連するタンパク質(例えば、GADと配列が類似している、DOPAデカルボキシラーゼ及び芳香族酸デカルボキシラーゼ等の他のデカルボキシラーゼ類)をも認識するのかについては本願優先日当時知られていなかった。

したがって、本願発明6は、当業者が引用発明1から容易に発明をすることができたものではない。

ウ 取消事由3(本願発明1及び6の格別の効果の看過)

(ア) GAD₆₇とGAD₆₅は、異なる酵素的動力学、細胞内分布を有しており、特にGAD₆₅はI型糖尿病における自己免疫応答の主たる標的である点でGAD₆₇とは異なっている。現在、組換えGAD₆₅は、I型糖尿病の前糖尿病状態である自己抗体を検出するため及び(GAD₆₅を発現する)インスリン生産性細胞に対する免疫学的耐性を誘導するために設計された免疫治療のために用いられている。これに対し、GAD₆₇は自己免疫応答の主たる標的ではなく、それ故、免疫学的耐性を誘導したり、I型糖尿病を導く自己免疫を予防することに関しては有用ではない。

(イ) GAD₆₅cDNAの格別の効果は、次のとおり、本願明細書(甲11)に記載されている。

実施例2の「B」は、GAD₆₇とGAD₆₅が二つの別個の遺伝子によってコード化されていることを示している。実施例2の「E」は、GA

D₆₅のmRNA及びGAD₆₇のmRNAの発現がニューロンのクラスによって異なることを示している。実施例2の「C」では、GAD₆₅cDNAが酵素的に活性なGADをコード化しており、そしてその酵素的に活性なGAD₆₅が、グルタミン酸塩をGABA及びCO₂に変換する効果を示し、外因性のピリドキサルリン酸(PLP)に対してGAD₆₇とは異なった反応を示している。実施例の「F」では、GAD₆₇とは異なる無細胞系分布を有することを示している。

実施例3は、GAD₆₅とGAD₆₇との免疫学的挙動の違いを明らかにしている点で特に重要である。実施例3のBには、「更に別の実験(結果を示さず)では、IDDMの危険がある患者2人(DA, DC)からの血清は、組み換え法で生産された³⁵S-GAD₆₅を免疫沈降させるが、一方組み換え法で生産された³⁵S-GAD₆₇は、患者DAの血清のみによって認識された(そしてこれは³⁵S-GAD₆₅よりも弱い)ことを示した。」(本願明細書[甲11]31頁6行~9行)と記載されている。このGAD₆₅とGAD₆₇の間の違いは、実施例3の最後に強調されており、GAD₆₅がIDDMを予測するための診断ツールとしてどれだけ有用性が高いかが述べられている。すなわち、「実際に症状がでる前に医師がIDDMを診断できるということは、疑いもなくインシュリン治療が必要となるまでの時間がおおいに伸びる結果となる。このような免疫アッセイの感度は、膵臓のβ細胞に存在するGAD形を表すヒト由来の組み換えGAD₆₅を用いて改良されるであろう。」(本願明細書[甲11]33頁20行~23行)ということである。

(ウ) 本願明細書中には示されていないが、その後の検討によって、I型糖尿病患者の自己免疫応答は、主にGAD₆₅に向けられていることが確認されている。

(エ) したがって、GAD₆₇ではなく、GAD₆₅に対する自己抗体に関す

る検査はⅠ型糖尿病の前診断（prediagnosing）及びⅠ型糖尿病とⅡ型糖尿病とを区別するのに有用である。GAD₆₅に対する自己抗体を検出するキットについては、本願明細書（甲１１）８頁末行～１０頁下２行に記載されており、そのようなキットは現在欧州及び米国で商業的に販売されている。

さらに、本願明細書（甲１１）１０頁末行～１３頁１０行には、GAD₆₅がどのように治療的に与えられ、自己反応性免疫応答を刺激又はブロックできるかが記載されている。GAD₆₇ではなく、GAD₆₅が自己免疫の標的であるため、臨床試験は、GAD₆₇ではなくGAD₆₅を用いている。

(オ) 審決は、引用例２（甲２）における相対分子量６４０００（６４Ｋ）の膵島細胞自己抗原、及び引用例３（甲３）における６４０００Mr（６４ＫA）の膵島細胞タンパク質（以下、これらをまとめて「６４Ｋ自己抗原」と呼ぶ）がGAD₆₅であることを当然の前提として本願発明の効果を判断している。しかし、本願優先日前においては６４Ｋ自己抗原が２種類存在することが知られているGADのうちのいずれであるのかは明らかではなかった。本願発明によってGAD₆₅の全アミノ酸配列が明らかになって初めてGAD₆₅と同じものであることが確認でき、さらに、２種類存在することが知られていたGADのうち、GAD₆₇ではなくGAD₆₅こそがIDDM診断の指標として有用であることが明らかになったのである。

(カ) 審決は、後知恵によって本願発明の効果を認定したものであり、以上のような本願発明１及び６の格別の効果を看過している違法がある。

２ 請求原因に対する認否

請求原因(1)ないし(3)の各事実は認めるが、(4)は争う。

３ 被告の反論

(1) 取消事由 1 に対し

ア 引用例 1 に記載される三つの断片ごとに分けて、引用例 1 のラット GAD のアミノ酸配列と、それに対応する本願発明 1 のラット GAD₆₅ のアミノ酸配列を相同な領域が対応するように並べて比較してみると、下記の (i) ~ (iii) のとおりである。ここでは、引用例 1 において空白になっている位置は、1 アミノ酸分の空白「_」をあけて記載する。

(i) 断片 1

引用例 1 のラット GAD VLAAD_LTSTANTN_TYEIAPVFLLEYV

本願のラット GAD₆₅ GLAADWLTSTANTNMFTYEIAPVFLLEYV

(ii) 断片 2

引用例 1 のラット GAD REIIGWPGGS_DGIFSPGGAISN_YAMLIARYKMFPEVKEKG_

本願ラット GAD₆₅ REIIGWPGSGDGI FSPGGAISNMYAMLIARYKMFPEVKEKGM

(iii) 断片 3

引用例 1 のラット GAD SRLSKVAPVIKAR_MEYGT V_YQP_GDK_NFFR

本願のラット GAD₆₅ SRLSKVAPVIKARMEYGT TMVSQPLGDKVNFFR

イ 上記アの比較によると、引用例 1 において決定された 97 個のアミノ酸残基のうち、本願発明 1 のラット GAD₆₅ と明らかに異なっているアミノ酸は、「断片 1」の一番最初のアミノ酸が引用例 1 では、「V」であるが、本願では「G」である、この 1 個のみである。

これについては、原告が提出した本願発明者が発表した文献である甲 5 (I and A「The Structural and Functional Heterogeneity of Glutamic Acid Decarboxylase: A Review」Neurochemical Research, Vol.16, No.3, 1991, p.215-226) においても、引用例 1 に記載されたアミノ酸 97 個のうち 96 個がラット GAD₆₅ と一致していることが記載されており (220 頁左欄 11 行 ~ 17 行)、引用例 1 のラット GAD と本願のラット GAD₆₅ のアミノ酸配列が 1 個だけ異なるということは、本願発明者自身も認め

ていることである。

そして、アミノ酸配列決定技術において、この程度の決定の誤りは、よくあることであるし、この１アミノ酸の違いは解析対象となったラットの個体間の差によるものである可能性もある。また、引用例１（甲１）の表２（Table ２）をみると、唯一の相違であった１番目のアミノ酸を含む最初の領域は、ネコとラットにおいて連続して保存性が高い領域ではないから、１番目のアミノ酸を含む領域の配列から縮退プライマーを作製することは、通常、当業者は行わないことである。したがって、この部分のアミノ酸の相違は、引用例１に基づく本願発明１の容易性に影響を与えないものである。

ウ 上記アの比較によると、引用例１のラット G A D のアミノ酸配列において、空白で示された位置（上記比較では、「_」で示した。）は、すべて本願のラット G A D₆₅においてそれに対応する数のアミノ酸が存在することから、引用例１のアミノ酸配列における空白の数は、すべて正確である。

エ 本願の実施例１において、G A D クローニングのためのプライマー設計の基となるネコ及びラット G A D の共通配列についての記載において、引用例１を参照文献として挙げられていること（甲１１〔明細書〕の１３頁下３行～１４頁２行）からすると、出願人自身も引用例１に記載された配列を本願発明１の c D N A のクローニングに用いたことは明らかである。

オ 以上のことからすると、引用例１は引用発明として適格性を欠くものではなく、引用例１を主引例として本願発明１の進歩性を判断した審決の認定及び判断に誤りはない。

(2) 取消事由２に対し

ア 本願発明１について

（ア） 引用例１の記載に基づいて本願優先日（１９９０年〔平成２年〕９

月 21 日) 当時の周知技術を用いてラット GAD をコードする cDNA をクローニングすることができる

- a 本願優先日(1990 年[平成 2 年]9 月 21 日)当時における cDNA のクローニングに関する周知技術を立証するために, 乙 8 (鈴木信太郎「混合プライマーを用いた PCR 法の応用」実験医学 Vol.8, No.9 (増刊) 1032 頁~1036 頁[1990 年 6 月発行]) 及び 乙 9 (結城惇「新しいクローニング法: PCR と IPCR」Cell Science, Vol.6, No.5, 370 頁~376 頁[1990 年 8 月発行]) を提出する。

乙 8 には, 相同な蛋白質の cDNA をクローニングする方法として, 既知のアミノ酸配列を比較検討して, 1 組の良く保存されているアミノ酸配列に対応するすべての可能なヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて, mRNA より合成した cDNA を PCR 法により増幅し, 増幅した DNA をベクターにサブクローニングし, 増幅した DNA をプローブとしたスクリーニングを行うことにより, 目的のクローンを得て, 得られたクローンのシーケンシングを行い, ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を決定すること, 及び, 得られた DNA は, スクリーニング用プローブとして使用できることが記載されている。

乙 9 には, タンパク質のアミノ酸配列をもとにクローンを得る方法として, アミノ酸配列から推定される多数のオリゴヌクレオチドの混合物を PCR の系に加えて, cDNA ライブラリーの中に探索している特定のクローンが入っているかどうかを検定し, もし探索している塩基配列が増幅されたら, この増幅産物をプローブとして使い, クローンを拾い出すことにより, cDNA のクローニングができることが記載されている。

乙 8 及び 9 に記載されるように、同じ機能を有する複数のタンパク質において、該タンパク質間において保存されたアミノ酸配列が得られた場合、同様の機能を有する新たなタンパク質をコードする cDNA を得ることを目的として、その保存アミノ酸配列を基に縮退プライマー、すなわち、該アミノ酸配列をコードすることが可能なすべてのヌクレオチド配列を含む混合プライマーを調製し、それを用いて、対象となる組織等から調製した cDNA を PCR 法により増幅し、増幅した DNA をプローブとして、cDNA ライブラリー等をスクリーニングすることにより、目的のタンパク質の cDNA を得ることは、本願優先日当時における周知技術であった。

さらに、この周知技術を用いて、目的タンパク質の cDNA を得た周知例として、乙 10 (GREGORIO GIL ほか「Mutlupal genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.85, 1988, p.8963-8967) 及び乙 11 (CHENG CHI LEE ほか「Generation of cDNA Probes Directed by Amino Acid Sequence: Cloning of Urate Oxidase」Science, Vol.239, 1988, p.1288-1291) を提出する。

乙 10 には、レダクターゼプロモーター因子タンパク質 A 及び B において一致するアミノ酸配列を基に作製された縮退プライマーを用いて、cDNA を鋳型として PCR 法により増幅し、増幅された DNA をプローブとして、cDNA ライブラリーをスクリーニングして、レダクターゼプロモーター因子タンパク質 B の cDNA をクローニングしたことが記載されている。

乙 11 には、ブタ尿酸オキシダーゼのアミノ酸配列を基に作製した

縮退プライマーを用いて，cDNAを鋳型としてPCR法により増幅し，増幅されたDNAをプローブとして，cDNAライブラリーをスクリーニングして，尿酸オキシダーゼのcDNAをクローニングしたことが記載されている。

- b 引用例1（甲1）には，表2に示したラットとネコGADの比較において，「比較的長い一致した配列が存在し，12アミノ酸残基のものが1つ，10アミノ酸残基のものが1つ，8アミノ酸残基のものが1つ，5アミノ酸残基のものが1つであった」ことが記載されている（2126頁右欄25行～27行，訳文〔乙1〕1頁）。

通常，縮退プライマーの設計の基となるアミノ酸配列は，5～7残基である（乙8の1033頁左欄2行）から，引用例1に記載された保存アミノ酸配列は，プライマーを作製するために十分な長さの領域を少なくとも四つ開示しているものである。PCR法は，部分配列に基づいてプライマー対を設計すれば，各プライマー間のDNA配列がどのようなものであるかにかかわらず，プライマー対間のDNA配列を増幅できるのであるから，未知のギャップがあるか否かは，目的の配列が得られるか否かと無関係である。

このようにGADについてラットとネコの種間において5アミノ酸以上の長さをもって保存されたアミノ酸配列を開示する引用例1の記載に接した当業者は，上記の本願優先日当時の周知技術を適用して，すなわち，両者で一致した配列を基に，GADをクローニングするための縮退プライマーを作製して，ラット脳由来のcDNAを対象にしてPCR法によりGAD cDNA断片を増幅し，得られたcDNA断片をプローブとして，cDNAライブラリーをスクリーニングして，ラットGADのcDNAを得ることを容易に想到するものである。

本願の実施例1におけるラットGAD₆₅ cDNAのクローニング手

法は、このような周知技術を採用したにすぎないものであって、本願明細書をみても、ラット GAD₆₅ cDNA のクローニングのための格別な工夫が示されているわけでもない。

したがって、本願優先日当時の技術水準では、引用例 1 に記載されているような部分的なアミノ酸配列であって、しかもその中にいくつかの未知のギャップを含むものを手がかりに全長のアミノ酸配列を得ることはできないとする原告の主張は失当であり、引用例 1 の記載に基づいて、本願優先日当時の周知技術を用いてラット GAD をコードする cDNA をクローニングすることは、当業者が容易に想到し得ることであるとした審決の判断に誤りはない。

(イ) 引用例 1 に記載されたラット GAD をコードする cDNA を得ようとするには以下に述べるように動機付けがあり、PCR 法を用いることによって容易に引用例 1 に記載されたラット GAD をコードする cDNA を得ることができた

a GAD の由来となる遺伝子の数とは無関係に引用例 1 に記載されたラット GAD をコードする cDNA を得ようとする動機付けがある

(a) 本願優先日前の技術的状况

本願優先日前の GAD に関する技術的状况については、甲 5 に記載されているように、複数の研究グループが、哺乳類の脳から精製された GAD は、電気泳動により大小二つのバンドに分かれることを確認していることから、哺乳類の脳には、分子量が異なる大小二つの型の GAD が存在していることは明らかになっていた（甲 5 の 217 頁右欄下 13 行～下 1 行）。これらは後に、その分子量から、「GAD₆₇」と「GAD₆₅」と命名されるものである。

1986 年に、ネコの脳由来の一つの GAD（以下、これを「ネコ GAD」という。）を、本願発明者である A が、抗体スクリー

ニング法を用いてクローニングした（甲５の２１８頁左欄下１行～右欄２行）。この「ネコＧＡＤ」のｃＤＮＡ配列及び推定アミノ酸配列は、乙２（Ｋ、Ｆ and Ａ「Glutamic Acid Decarboxylase cDNA:Nucleotide Sequence Encoding an Enzymatically Active Fusion Protein」The Journal of Neuroscience, Vol.7, No.9,1987, p.2768-2772）において発表された。このＡらが得た「ネコＧＡＤ」は、後にその推定分子量から大きい方の型である「ＧＡＤ₆₇」と呼ばれることになるものである（甲５の２１９頁左欄下２３行～１６行）。

１９８７年に、Ｌらの研究グループは、ラット脳由来のＧＡＤｃＤＮＡを抗体スクリーニング法によりクローニングした（甲５の２１９頁左欄１行～３行）。このラット脳由来のＧＡＤｃＤＮＡ配列は、１９９０年２月に発行された甲７において発表された。また、別のグループは、Ａらの「ネコＧＡＤ」ｃＤＮＡをプローブとして、マウス由来のＧＡＤｃＤＮＡをクローニングした（甲５の２１９頁左欄３行～５行）。このマウス由来のＧＡＤｃＤＮＡ配列は、１９９０年３月に発行された乙１２（Ｊほか「Molecular Identification of the 62 kd Form of Glutamic Acid Decarboxylase from the Mouse」European Journal of Neuroscience, Vol.2, No.3,1990, p.190-202）において発表された。

そして、上記の「ネコＧＡＤ」、ラット及びマウス由来のＧＡＤは、同一性が９０％以上と高いものであって、共通のＧＡＤ遺伝子を祖先とするもの、すなわち、オーソログであって、二つの型のうち、推定分子量が６万７０００の大きい方であるＧＡＤをコードするものである（甲５の２１９頁左欄６行～１２行）。

このように、二つの型が存在する G A D のうち、一方の型の G A D の c D N A , すなわち、後に「 G A D₆₇」と命名される型の c D N A は、本願優先日前には、ネコ、ラット及びマウス等の複数の種において既に D N A 配列及びアミノ酸配列の決定がなされていた。

そして、二つの型の G A D の由来となる遺伝子の数は、単一であるのか、それとも複数であるのかという学術的な議論もまた当業者の関心事項であった。

(b) 引用例 1 の記載事項

引用例 1 (甲 1) は、「ネコ G A D」の c D N A がクローニングされた後の 1 9 8 8 年に発行された。

引用例 1 について審決が記載事項 (a 1) として認定した箇所には、次の事項が記載されている。

「 G A D - 1 免疫親和性カラムは、ラット脳ホモジネートの細胞質分画から G A D 活性を濃縮された画分を得るために使用された。最も濃縮された画分は、ニワトリ脳からのものと区別がつかない一連のタンパク質を含んでいた。最も顕著なバンドは明らかに 5 9 k D a の分子量を有するものであった。他のバンドとして、6 3 k D a と 5 5 k D a を中心とする一連の約 3 つのバンドが存在した。ラット脳の膜分画からの精製は、似た図を示す。5 9 k D a と 6 3 k D a タンパク質は明瞭に存在し、より少ない量で低分子量成分が存在した。H P L C により自然な形のままでこれらのバンドを分離するすべての試みは失敗した。5 9 k D a タンパク質は、予備的 S D S - P A G E によって単離され、臭化シアンによる切断により断片化された。配列分析によると、このタンパク質はネコの G A D c D N A (F et al., 1986; K et al., 1987) (被告注：「ネコ G A D」の c D N A) と強い相同性を有していることを示し、これは、酵素

的に活性なGADをコードしていることを示している。」(212
9頁左欄15行～31行, 訳文[乙1]1頁～2頁)

また, 引用例1には, 下記の事項が記載されている。

「A氏と共同研究者は, ネコGADのcDNAをクローニングし, 配列決定をした(F et al., 1986; K et al., 1987)。59kDaタンパク質とネコGADcDNAの関係を理解するために, 59kDaタンパク質を予備的SDS-PAGEにより精製した。第4図は, この精製工程を経て得られた精製59kDaタンパク質を示す。このタンパク質のN末端は, ブロックされていることがわかったため, アミノ酸配列を決定するために, このタンパク質は臭化シアンにより切断され, 切断されたペプチドは逆相HPLCにより分離された。12ペプチドのピークを配列決定した。これらのうち, 4つは, 完全に又は部分的に重複するものであったが, 8つはユニークな配列を有していた。ネコcDNAから推定されるタンパク質配列と, ラット59kDaタンパク質からの配列の間には, 強い相同性があることがすぐに明らかになった。推定ネコ配列とともに得られた該タンパク質配列を比較したデータを表2に示す。配列決定されたすべてのペプチドは, 少なくとも部分的に相同性を有するものである。配列決定されたペプチドは, 長さで計97個のアミノ酸残基である。それらを推定ネコ配列の3つの隣接したセクションと共に比較した。比較した配列において, 97アミノ酸のうち68個が一致した。さらに, 比較的長い一致した配列が存在し, 12アミノ酸残基のものが1つ, 10アミノ酸残基のものが1つ, 8アミノ酸残基のものが1つ, 5アミノ酸残基のものが1つであった。29個の一致しないアミノ酸残基のうち, 17個は, 単一の塩基置換によりできる可能性があるものであった。」

(2 1 2 6 頁右欄 6 行 ~ 2 9 行 , 訳文 [乙 1] 1 頁)

上記記載によると , 引用例 1 は , ラット脳から G A D を精製すると現れる 6 3 k D a と 5 9 k D a の大小 2 つのバンドのうち , 小さい方である 5 9 k D a タンパク質の一部のアミノ酸配列を決定し , 上記の A らによる「ネコ G A D」のアミノ酸配列と比較したところ , 「ネコ G A D」アミノ酸配列と一部一致する配列を有するものの , 異なる配列をも含むものであって , 9 7 個のうち , 2 9 個のアミノ酸残基は , 「ネコ G A D」c D N A とは異なるものであったことが記載されている。甲 5 によると , 両者の相同性は 7 0 % である (2 1 9 頁左欄下 1 行 ~ 右欄 8 行)。

そして , 引用例 1 の著者は , 既知の「ネコ G A D」と 5 9 k D a のラット G A D アミノ酸配列に差が生じる原因について , 引用例 1 において下記のように考察している。

「 5 9 k D a ラットタンパク質とネコタンパク質間の相同性は , 3 つの可能な方法によって説明することができる。最初は , これらは , ネコとラットの両方において , G A D をコードする一つの遺伝子であって , 2 つのタンパク質の相違の全ては , 進化の多様性によるものであるという仮定である。2 つめの可能性は , それぞれの種は単一の遺伝子をもっており , 選択的スプライシングのパターンでいくつかの m R N A が生じるというものであって , したがって , ネコ c D N A とラット 5 9 k D a タンパク質は , 単一遺伝子の選択的スプライシングの経路を示すものであるというものである。最後は , G A D 又は G A D 様タンパク質は複数の遺伝子が存在して , ネコ c D N A とラット 5 9 k D a タンパク質は , 関連性はあるが , 異なる遺伝子の産物であるというものである。これらの選択肢の中から一つを選ぶには , 該免疫精製したタンパク質および対応する c D

NAのさらなる解析が必要である。」(2129頁左欄31行～44行, 訳文[乙1]2頁)

以上の記載事項を整理すると, 引用例1の著者は,

59kDaのラットGADは, 「ネコGAD」と祖先を共通にするオーソログ(同じ型)であって, 「ネコGAD」とのアミノ酸配列の相違は進化の多様性によるものである。

59kDaのラットGADは, 「ネコGAD」の型とは異なるもう一方の型のタンパク質である。その場合は, 二つのGADの由来となる遺伝子は,

単一遺伝子であって, 二つのGADは, 選択的スプライシングにより生じるものである。

別々の遺伝子であって, 二つの型のGADはそれぞれの遺伝子から生じるものである。

という三つの仮説をたてている。

しかし, 本願優先日(1990年[平成2年]9月21日)前には, 既に, ラットにおける「ネコGAD」の型に相当するGAD₆₇型は, Lらによりクローニングされ, 甲7において発表されたから, ネコとラット由来のそれらの相同性は, 95%と高いものであることは, わかっていた。したがって, 引用例1に記載の59kDaのラットGADは, 「ネコGAD」のオーソログではなく, 異なる型であること, すなわち, 上記の可能性がないことは本願優先日前には既に判明していたのである。

そして, 上記の場合には, 上記の場合でも, 上記の場合でも, 次のとおり, 二つの型のGADにそれぞれ対応した, 二つの異なるmRNAが生じている。

単一遺伝子由来である場合(上記の場合)

遺伝子は一つで，そこからmRNAが転写された後，選択的スプライシングが起きて，2種類のmRNAが生じ，それぞれが，タンパク質へと翻訳され，2種類のGADが生じる。

二つの遺伝子由来である場合（上記 の場合）

二つの型のGADに対する遺伝子がそれぞれに存在し，この二つの遺伝子がそれぞれmRNAへと転写されて2種類のmRNAが生じ，それぞれがタンパク質へと翻訳され，2種類のGADが生じる。

(c) 本願優先日当時，GADの由来となる遺伝子が単一の遺伝子であるか，二つの別の遺伝子であるかのいずれであっても，二つの型のGADに対応するmRNAが二つ存在することは，上記(b)で述べたとおりである。

したがって，GADの由来となる遺伝子の数に関する議論はさておき，当業者であれば，一方の型のcDNAが取得されているのであれば，もう一方の型についても，そのcDNAを得て，DNA配列を決定しようとすることは，自然な発想である。

そして，両者の型のGADのcDNAが得られれば，それらをプローブとして用いたサザンブロット法（ゲノム遺伝子断片を対象とした核酸プローブによる検出方法であって，ゲノム上の遺伝子の数を調べることができる方法，乙13〔松橋通生，大坪栄一監訳「ワトソン・組換えDNA」81頁～82頁（昭和63年3月25日第3刷発行）丸善株式会社〕）などの周知技術により，自ずと単一遺伝子であるのか，二つの遺伝子であるのかという学術的な問題の結論を得ることができるのである。

さらに，上記(b)のとおり，引用例1には，この問題の結論を得るために，記載されたラットGADに対応するcDNAを得ること

が示唆されている（ 2 1 2 9 頁左欄 4 1 行～ 4 4 行）。

以上のように，どちらの仮説が真であるかにかかわらず，当業者であれば，まずは，引用例 1 に記載のラット G A D の c D N A を得ようと発想するのであって，G A D は単一の遺伝子由来であると考えられていたという原告の主張は，引用例 1 に記載のラット G A D の c D N A を得ようとする自然な技術の流れを妨げるものではない。

(d) 原告は，J らにより偽遺伝子の存在が報告されていたから，引用例 1 で示されたものも偽遺伝子の産物である可能性があったと主張する。

しかし，甲 6（J ほか「Sequences Homologous to Glutamic Acid Decarboxylase cDNA Are Present on Mouse Chromosomes 2 and 10」GENOMICS 6, 1990, P.115-122）で偽遺伝子として推定されている M G A D 8 A は，ゲノム配列から得られたものであり，イントロンを欠く等の理由で「processed pseudogene」（プロセッシングされた偽遺伝子）と判断されている（1 1 7 頁右欄 5 行～ 1 0 行）。しかし，「processed pseudogene」は，m R N A が逆転写により c D N A 化し，ゲノムに再挿入されて生じるものと考えられており，一般にプロモーター配列を失うため，転写活性を失うものである（乙 1 4 [松原謙一，中村桂子，三浦謹一郎監訳「ワトソン・遺伝子の分子生物学第 4 版」6 6 2 頁～ 6 6 3 頁（1 9 8 8 年 9 月 1 0 日発行）株式会社トッパン]）。したがって，引用例 1 に記載された，m R N A へ転写され，さらにタンパク質へと翻訳されているラット G A D が偽遺伝子の産物であるとは，当業者であれば考えないものである。また，原告は，引用例 1 のタンパク質が偽遺伝子の産物であるという合理的な根拠を示したわけでもなく，J らの報告した遺

伝子が偽遺伝子であったという1例があったからといって、当業者が引用例1に記載されたアミノ酸配列をGAD cDNAのクローニングに利用することを妨げるものではない。

また、原告は、ラットのGAD₆₇ cDNAをクローニングした甲7（Lほか「Rat Brain Glutamic Acid Decarboxylase Sequence Deduced from a Cloned cDNA」Journal of Neurochemistry Vol.54, No.2, 1990, P.703-705）をあげ、甲7においてクローニングされたラットGADのアミノ酸配列と引用例1のアミノ酸配列が異なる理由として、引用例1はアミノ酸配列決定を誤ったものであることを示唆している旨主張している。

しかし、甲7をみると、Lらが決定したラットGADアミノ酸配列と、引用例1の配列との違いについて、「アミノ酸の配列決定に内在する可能性が大きい（with the differences most likely being inherent in protein sequencing.）」（704頁左欄下4行～右欄6行）と、アミノ酸配列決定が誤りがあったかもしれないことを示唆しているにすぎないものであって、引用例1に記載されたアミノ酸配列が誤りであることを示す合理的な根拠を示したのではないから、引用例1に記載されたアミノ酸配列をGAD cDNAのクローニングに利用することを妨げるほどの事情があったということとはできない。

なお、甲7でLらが得たラットGADは、Aらによる「ネコGAD」と95%と高い同一性を有するものであって（703頁左欄要約[Abstract]7行～9行）、当業者はLらが得たラットGADは「ネコGAD」と同じ型であることは容易に予測できることである。そして、実際にLらのラットGADは、GAD₆₇型であって、引用例1の59kDaのラットGADとは異なる型であったのだから

ら，両者のアミノ酸配列が相違するのは当然のことであって，結局，甲7における示唆の方が間違っていたのである。

さらに，原告は，引用例1には，どのようにして，GADの由来となる遺伝子が単一の遺伝子であるか，二つの別の遺伝子であるかを解明できるのかについて記載されていないと主張しているが，引用例1には，ラットGADのcDNAをクローニングすることが必要であることが記載されている。そして，引用例1に記載されたGAD cDNAを得る手法は当業者が容易に想到することであって，得られたcDNAを用いて，周知の技術により遺伝子の由来に関する二つの仮説を解明することもまた容易であることについては，下記のbにおいて詳しく述べるとおりである。

b 本願優先日当時の周知技術を考慮すれば，PCR法を用いることによって容易に引用例1に記載されたラットGADをコードするcDNAを得ることができた

(a) 本願の縮退プライマーの縮退の程度は，通常の範囲である

原告は，「プライマーはかなり縮退していた」と主張しているので，実際にそうであるかについて検討する。

本願明細書（甲11）において，2セットの縮退プライマーの設計の基となったアミノ酸配列は，センス側が「YEIAPVFV」及び，アンチセンス側が「FPEVKEKG」である（甲11の13頁下3行～142行及び図1）。

本願明細書には用いた縮退プライマーの数については記載されていないので，プライマーの設計の基となったアミノ酸配列に基づいて，計算してみると，以下のとおりである。

センスプライマー Y E I A P V F V

$$2 \times 2 \times 3 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2 \times 4 = 3 \times 2^{11} = 6144 \text{個}$$

アンチセンスプライマー F P E V K E K G

$$2 \times 4 \times 2 \times 4 \times 2 \times 2 \times 2 \times 4 = 2^{11} = 2048 \text{個}$$

これらの数は，PCRによる増幅が不可能となるほど縮退しているものではない。

前記乙8には，縮退プライマーに含まれるオリゴヌクレオチドの数に関して，「プライマーに含まれるオリゴヌクレオチド配列の組み合わせの数であるが，Gouldらは 2^{18} の組み合わせを含んでいるプライマーも働いたとしているし，われわれの経験でも $2^{13 \sim 14}$ なら十分働くようである，従って，20b（7アミノ酸）前後のプライマーを用いる限り，組み合わせの数はほとんど問題にはならないものと考えられる。」と記載されている（1032頁右欄21行～27行）。

したがって，本願の縮退プライマーは，PCRによる増幅が行えない程に縮退したものではなく，PCR法の適用に疑問をもたせるような事情はない。

(b) cDNAのクローニングにおいて，イントロンの存在は，無関係である

原告は，「いくつかの大きなイントロンがあったなら，否定的な結果をもたらしたであろう」と主張する。

しかし，あるタンパク質のcDNAのクローニングを目的としている場合，PCR法により増幅する対象として，目的の細胞や組織由来のcDNAを用いることは当然であって，イントロンを含むゲノムDNAを対象とすることは考えられない（乙8の1033頁右欄下10行～下8行及び図1，前記乙9の372頁左欄21行～25行）。

cDNAは，遺伝子から転写されたmRNA前駆体からイントロ

ンの部分が切断されて生成した成熟mRNAに相補的な配列のことであって、イントロンが既に除去されたものであるから、cDNAをPCR増幅の鋳型とした場合に、原告の主張するような問題は存在しない。

したがって、原告の主張は当を得ないものである。

(c) 縮退プライマーの5'末端における制限酵素の選択は当業者にとって通常の創作能力の発揮である

原告は、「クローニングのために選択した酵素が、想定される第2GAD遺伝子の内部に存在する特異的な配列を切断してしまえば、想定される第2の遺伝子は排除されることになる。」と主張する。

本願優先日(1990年[平成2年]9月21日)当時、プライマーの設計時にプライマーの5'末端に出現頻度の低い制限酵素認識配列を入れておき、このプライマーにより増幅を行った後、該制限酵素認識配列を切断する制限酵素により当該末端を整えてPCR生成物をベクターにクローニングすることは周知技術であった(乙8の1033頁左欄11行~13行及び図1、乙9の373頁左欄21行~33行及び図2、乙15[猪子英俊「PCR法の発展とその医学応用」Biotherapy, Vol.4, No.6(1990年6月発行)1103頁~1113頁]の1109頁左欄「5.塩基配列」)。この際、当該制限酵素処理により、PCR生成物が途中で切断されてしまう場合には、他の制限酵素認識部位の付加を試してみればよいのであって、このようなプライマーに付加すべき制限酵素認識配列の選択は、当業者にとって通常の創作能力の発揮の範囲である。

本願明細書(甲11)の実施例をみると、用いたプライマーは末端に「SstI及びHind (5'末端オリゴ) SstI及びS

s t (3 ' 末端オリゴ) 」の制限酵素認識配列を付加したものであって、P C R生成物を「H i n d / S s t I」制限酵素で消化されたベクターにクローニングすることが記載されていることから(1 4 頁2 行～1 1 行)、本願の実施例の方法はこの周知技術を用いたものである。本願明細書の実施例において使用された制限酵素「S s t I」、 「S s t 」及び「H i n d 」は、当該技術分野において一般的に用いられている制限酵素であって、当業者であれば、これらの制限酵素を選択することは、普通に行うことである。そして、本願明細書をみても、これらの制限酵素の選択に格別の困難があったということも確認できない。

したがって、原告の上記主張は、失当である。

(d) P C R増幅されたP C R生成物から容易にG A D₆₅ c D N Aを得ることができた

乙1 6 (M I C H A E L S T R A T H M A N Nほか「Diversity of the G-protein family:Sequences from five additional subunits in the mouse」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.86, 1989, p.7407-7409) には、縮退プライマーを用いて、c D N AをP C R法により増幅し、得られたP C R生成物をベクターにクローニングしてから、すべてのクローンの塩基配列決定を行うことにより新たなGタンパク質のメンバーを五つ見い出したことが記載されている。

乙1 7 (A N D R E W F . W I L K S「Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.86, 1989, p.1603-1607) には、縮退プライマーを用いて、c D N AをP C R法により増幅し、得られたP C R

生成物をベクターにクローニングしてから，すべてのクローンの塩基配列決定を行うことにより，新たなチロシンキナーゼファミリーのメンバーを二つ見い出したことが記載されている。

乙16及び17に記載されるように，PCR生成物をベクターにクローニングした後，複数のクローンから目的のものを選択するという手間をかけずに，すべてのクローンの塩基配列決定を行うことは，本願優先日前における周知技術であった。

この周知技術を考慮すれば，本願の場合も，当業者は，PCR生成物をベクターにクローニングした後に，すべてのクローンの塩基配列決定を行うことを容易に発想するものである。そうすれば，乙16及び17と同様に，PCR生成物に含まれる二つの型のGAD cDNAのうち，既知の型とは異なるDNA配列からなるGAD cDNA，すなわち，GAD₆₅ cDNA配列を有するPCR生成物を容易に見つけることができる。

そして，そのようにして得られたGAD₆₅ cDNA配列を有するcDNA断片を，GAD₆₅ cDNAをクローニングするためのプローブとして用いて，ラット脳関連のcDNAライブラリーをスクリーニングし，GAD₆₅ cDNAを得ることは，当業者が容易に想到し得ることである。

(e) 原告が主張する「否定的選択」を用いることも容易である

原告は，多くの「的はずれの」PCR由来の増幅産物があるので，ネコオーソログにハイブリダイズしないものはすべて第2のGADを示すという考えを持って「否定的選択」をすることは難しいことが周知である旨主張する。

しかし，PCR生成物を電気泳動にかけて，予想される大きさのバンドを分離し，DNAを抽出することは，本願優先日前における

周知技術であった（乙 8 の 1 0 3 4 頁右欄 1 1 行～ 1 3 行，乙 9 の 3 7 3 頁右欄下 1 行～ 3 7 4 頁左欄 6 行）。

P C R 法において，プライマー - ダイマーによる的はずれな生成物ができることは，あたりまえのことで，そのような生成物は極端に短いから，上記周知技術である P C R 増幅後に行う電気泳動により簡単に排除できるものである。

したがって，的はずれな生成物ができることは，「否定的選択」が困難であることの根拠にはならない。

そして，電気泳動により，そのような明らかに目的物ではない副産物を除いた P C R 生成物は，二つの型の G A D である可能性が非常に高いものに候補が絞られている状況である。

この場合，すでに一方の型の G A D (G A D₆₇) の c D N A 配列は知られていたわけであるから，当業者であれば，既知の G A D c D N A とハイブリダイズする陽性コロニーは，それと同じ型であって，ハイブリダイズしない陰性コロニーは，もう一方の型の G A D であることは容易に予測できることである。とすれば，G A D₆₇ c D N A をクローニングしようとするれば，陽性コロニーから得られた c D N A 配列を使用し，引用例 1 に記載された 5 9 k D a のラット G A D c D N A をクローニングしようとするれば，陰性コロニーから得られた c D N A 配列を使用することは当然のことであり，このようにハイブリダイズしない陰性コロニーを選択することにより，引用例 1 に記載された G A D の c D N A クローンの候補を絞ろうとすることは，当業者が容易に想到することである。

以上のとおり 原告が主張する「否定的選択」は，困難性のある手法ではない（乙 1 8 [松橋通生，大坪栄一監訳「ワトソン・組換え D N A 」 7 4 頁～ 7 6 頁（昭和 6 3 年 3 月 2 5 日第 3 刷発行）丸

善株式会社」)。

- (f) ノーザンブロット法及びサザンブロット法により本願発明1のラットGAD₆₅は「ネコGAD」とは異なる遺伝子から誘導されたことを証明すること及びタンパク質を発現させてその酵素活性を確認することは容易である

ラットGAD₆₅ cDNAが得られれば、それと既知のGAD₆₇ cDNAを用いて、サザンブロット法などの周知技術(乙13)により、それらの由来となる遺伝子の数を決定することは、当業者が容易になし得ることである。その結果、二つのGADの由来となる遺伝子の数に関する学術的な議論が解明できて、二つの遺伝子由来であることが証明されたことは、ラットGAD₆₅ cDNAという物質自体に係る発明の効果として、評価できることではない。

また、酵素活性を確認した点については、GAD₆₅ cDNAが得られたのであれば、それを発現させて、その機能を確認することは、当業者が普通に行うことである。その結果、引用例1におけるラット脳由来の59 kDaタンパク質は酵素的に活性なGADであるという示唆のとおり、ラットGAD₆₅がGAD酵素活性を有することが確認されたにすぎず、これをもって格別の効果ということとはできない。

- (ウ) 得られたcDNAがGADの全長をコードするものでなかった場合でも、RACE法等の手法を適用して、全長cDNAを得ることができる

前記乙15には、一方の端の塩基配列が不明の時、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるdA又はdGの3'末端への付加により、この人工的なアンカープライマーと既知のプライマーとの組み合わせでPCR反応を行い、塩基配列が不明な領域を含む特異的

な遺伝子の増幅を行うことができることが記載されている（１１０５頁右欄「３．Anchored P C R」及び図４）。

乙１９（MICHAEL A.FROHMANほか「Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.85, 1988, p.8998-9002）は，本願明細書（甲１１）において，G A D_{6.5}の残りの５'末端をクローニングするために行った「アンカー（anchored）P C R」の参照文献として記載された文献であって（１５頁１０行～１３行），完全長c D N Aクローンを得るための効率的なクローニング法であるR A C E法が記載されている。

乙１５及び１９に記載されるように，本願優先日前において，目的のc D N Aの全長が得られなかった場合は，「アンカーP C R」法（R A C E法も含む）により，５'末端側又は３'末端側の未知のc D N A配列を決定することは，周知技術である。

審決は，「また，これにより得られたc D N AがG A Dの全長をコードするものでなかった場合でも，さらに，本願優先日前における周知技術であった５'末端側又は３'末端側のD N A配列を決定するR A C E法等の手法を適用して，全長c D N Aを得ること...は，当業者にとって格別な困難性を有するものとも認められない。」（６頁１１行～１７行）と判断しているが，これは，R A C E法に用いるプライマーとして，縮退プライマーを用いることを述べたものではなく，P C R法を適用したクローニングにより得たc D N Aが全長でなかった場合には，R A C E法などの周知の方法により，５'末端や３'末端のD N A配列を得ることも容易にできることを述べたものである。

イ 本願発明６について

本願発明 6 は、「エピトープを少なくとも 1 個有する，アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする cDNA 配列」というものであるから，エピトープのみをコードする cDNA 配列に係るものでなく，エピトープを「有する」アミノ酸配列を有するポリペプチド，すなわち，全体のアミノ酸配列のうちにエピトープに相当する配列を最低一つ含んでいるポリペプチドをコードする cDNA に係るものである。

原告は、「引用例 1 に示されたラット部分アミノ酸配列から全長のラット GAD₆₅を得ることは容易ではなかった。」と主張するが，上記アで述べたとおり，本願発明 1 のラット GAD₆₅の全長をコードする cDNA は，当業者が容易に取得することができたのであるから，原告のこの主張は誤りである。また，エピトープはたかだか，6 ～ 10 アミノ酸残基の長さであって，本願発明 6 は，そのような 6 ～ 10 アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする cDNA を対象としているのであるから，そのような cDNA を得るためには，上記ア(ウ)で述べたような完全長を得るために RACE 法などの周知技術を適用するまでもなく，PCR 法により増幅した断片をプローブとして，GAD₆₅ cDNA のある程度の長さの配列を得れば，その中にはエピトープをコードする配列が含まれる蓋然性は非常に高いものであって，完全長 cDNA と比べると，より容易に取得できるものである。

また，原告の「任意の部分アミノ酸配列中の 6 ～ 10 個のアミノ酸の一続きのつながりを，簡単に選択しても，抗体に対するエピトープが存在することは保証されないであろう。」との主張は，その意味が不明確であるが，クローニングしたラット GAD₆₅の完全長 cDNA がコードするアミノ酸配列から任意の 6 ～ 10 個のアミノ酸を選択してもエピトープが存在するかどうか保証されないことを意味しているのであれば，本願発明 6 は，エピトープのみをコードする DNA に係るものではないから，そのよ

うな主張は当を得ないものである。上記したように，GAD₆₅の完全長cDNAは容易に取得できるものであって，その中には必ずエピトープが含まれるものである。

さらに，原告は，「引用例1によって提供されたラット部分アミノ酸配列にはアミノ酸自体の誤り及びギャップの誤りがあったから，選択された6～10個のアミノ酸の一続きのつながり自体が正しいものであるという保証すら無かった。」と主張する。この主張が，引用例1に記載されたアミノ酸配列から，任意に選択された6～10個のアミノ酸配列に，自己抗体に対するエピトープが存在するかどうか保証されないこと，すなわち，引用例1のアミノ酸配列がエピトープを含むかどうか分からないことを主張しているのであれば，引用例1の部分アミノ酸配列は，自己抗体に対するエピトープを含むものである。すなわち，本願出願後に原告により出願された特願平4-158195号は，平成14年5月2日付で拒絶査定がなされ，これに対して不服審判請求がなされ，不服2002-15239号として特許庁における審理に付されたが，その審理の際，原告自身が平成18年10月2日付で提出した回答書（乙22）において，GAD₆₅における，特定の自己抗体に対するエピトープの一つがPEVKEKアミノ酸配列であることを主張している（2頁下7行～下5行及び4頁8行～24行）。このPEVKEKアミノ酸配列は，まさに，引用例1に記載されたラットGADアミノ酸配列のうち，二つめのペプチド断片の37番～42番のアミノ酸配列に相当するものである。

したがって，本願発明6の自己抗体のためのエピトープを有するアミノ酸配列をコードするcDNAは，引用例1の記載に基づいて容易に調製できるものである。

(3) 取消事由3に対し

ア 本願発明1の効果である，GAD₆₅がIDDM診断の指標となること及

びIDD M予知マーカーとなることについては、引用例2及び引用例3の記載事項に基づいて、当業者が容易に予測できるものである。その理由は、審決6頁下4行～7頁23行記載のとおりである。

イ また、原告は、GAD₆₅ cDNAは、組換えGAD₆₅を生産することができるという効果を主張する。

しかし、あるタンパク質をコードするcDNAを得ようとする主たる目的の一つは、当該タンパク質を遺伝子工学技術により大量に産生するためであることは、当該技術分野における技術常識であることを考慮すれば、原告の主張する効果は、当然のことであって、格別な効果と評価できるようなものではない。

ウ 原告は、本願明細書中には示されていないが、その後の検討によって、I型糖尿病患者の自己免疫応答は、主にGAD₆₅に向けられていることが確認されている旨を主張している。

しかし、出願時の明細書に記載されておらず、その後に明らかになった知見は、出願時点において発明者がなした技術的貢献であるとはいえず、それに基づき本願発明の顕著な効果を主張することは、進歩性の規定の趣旨からみて、許されないというべきである。

(4) なお、審決では、引用例1の記載に基づいて、プライマーによるPCR増幅による手法でGAD₆₅ cDNAのクローニングは容易であることを述べたが、他の周知の手法により、引用例1に記載された事項に基づいて、GAD₆₅ cDNAをクローニングすることも、次のとおり容易である。

ア 引用例1(甲1)には、59 kDaのラットGADに特異的に結合する抗体であるGAD-6抗体が記載されている(2126頁右欄下8行、右欄下2行～下1行及び第5図[Fig. 5])。

ところで、本願優先日前には、cDNAの発現ライブラリーを抗体を用いてスクリーニングすることにより、所望のcDNAを取得するという抗

体スクリーニング法は周知技術であった（乙 23 [松橋通生，大坪栄一監訳「ワトソン・組換えDNA」86頁～87頁（昭和63年3月25日第3刷）丸善株式会社] ）。

そして，GADにおいても，Aらによる「ネコGAD」及び甲7のラットGAD₆₇は抗体スクリーニング法によりクローニングがなされたものである。

引用例1において，59kDaのラットGADに特異的に結合することができるGAD-6抗体の記載に接した当業者であれば，上記周知技術を考慮して，このGAD-6抗体を用いて，ラット脳由来のcDNAの発現ライブラリーを抗体スクリーニングを行うことにより，59kDaのラットGADをコードするcDNAを取得することを容易に想到するものである。

イ また，本願明細書（甲11）には，「真核性GAD₆₅ポリペプチドをコードする特異的DNA配列の作製は各種の方法を用いて実施できる。」（4頁11行～12行）と記載されており，その具体的な方法の一つとして，「GAD₆₅に対する抗体を用いて，少なくとも1個のエピトープを有するGAD₆₅ペプチドに対して，cDNAライブラリーを間接的にスクリーニングすることができる（B and C, J.Neurosci., 8:2123,1988）。」（5頁22行～24行）と記載されている。ここで引用された「B and C, J.Neurosci., 8:2123,1988」とは，まさしく引用例1のことである。このように，本願発明者自身も，引用例1に記載された抗体を用いて，抗体スクリーニング法によりGAD₆₅をクローニングすることができるという認識があった。

ウ したがって，本願発明1のラットGAD₆₅のcDNAは，引用例1に記載された抗体を用いた抗体スクリーニングによっても，容易に得られるものである。

第4 当裁判所の判断

1 請求原因(1)(特許庁における手続の経緯)，(2)(発明の内容)，(3)(審決の内容)の各事実は，当事者間に争いが無い。

2 本願発明の意義について

(1) 本願の本件補正後の「特許請求の範囲」請求項1には，前記第3の1(2)の記載があるほか，本願明細書(甲11)には次の記載がある。

ア 背景技術

「インシュリン - 依存性真性糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM; I型糖尿病) は，最も普遍的な代謝性疾患の一つである。アメリカ合衆国では，IDDMはおよそ300から400人に1人の割合で見られ，疫学的研究によると，この疾患は増加していることを示唆している。この疾患は膵臓のインシュリン生産性 - 細胞の自己免疫破壊の結果生じる。更に特定すれば，この疾患の始まる前段階は，リンパ球が膵臓の(ランゲルハンス)島細胞に浸潤し， - 細胞を選択的に破壊する，”インスリティス”という状態を特徴とする。典型的なIDDMの過血糖症は，インシュリン - 生産性 - 細胞の少なくとも80%がうしなわれた後に，初めて現れる。残りの - 細胞は引きつづく数年間に破壊される。

インシュリン治療によって大半のIDDM患者は普通の生活を送ることができるが，この補充は不完全なものであって，代謝恒常性を完全に元に戻すものではない。従って，目，腎臓，心臓，及びその他の器官の機能低下に至る深刻な合併症が，インシュリン治療を受けているIDDM患者には多い。このために， - 細胞破壊の開始時と，実際にインシュリン補充が必要となる時(即ち， - 細胞の80%が破壊されたとき)との間の潜伏期間を伸ばすこと(例えば，免疫抑制剤の投与によって)が極めて望ましい。従って， - 細胞破壊の開始を決定する診断テストがあれば，医者

が潜伏期間を伸ばすための免疫抑制剤を投与することができ
(Silverstein et al., New England Journal of Medicine, 319:599-604,
1988), それによってインシュリン補充による副作用の開始を遅らせるこ
とができる。

I D D M患者の多くは, 6 4 k D分子 (Baekkeskov et al., J. Clin.
Invest. 79:926-934, 1987; Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360,
1990), 島細胞細胞質 (I C A) 分子又は島細胞表面 (I C S A) 分子
(Bottazzo et al., Lancet, 1:668-672, 1980), 或いはインシュリン
(Palmer et al., Science, 222:1137-1139, 1983; Atkinson et al., Diabetes,
35:894-898, 1986) に対する抗体を含む血清を有している。Atkinsonとそ
の共同研究者ら (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990) は, ヒト
血清中における 6 4 k D分子に対する抗体の存在が, I D D M症状が実際
に起きる始まりについての, 最も初期でかつ最も信頼できる指標であるこ
とを示した。

最近になって, Baekkeskovとその共同研究者らは, 6 4 k D分子と, グ
ルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D) とは幾つかの共通の抗原エピト
ープを有しており, 従ってこれらは同じものであるか, 或いは非常によく
似た分子である, ということを確認した。この同定は重要な発見ではある
が, G A Dの分子生物学に関する知識が未知である限りは, この情報を I
D D M予知の診断法として用いることは極めて厄介であり, かつ限定され
ている。結果として, 大量の 6 4 k D分子, 又は 6 4 k D分子と抗原的に
実質的に同一な G A D分子をクローニングし, 次いで量産することができ
れば, I D D M予知のための診断キットの開発が可能となろう。本発明
は, かかる結果を達成するための手段を提供する。」(1 頁下 1 3 行 ~ 2
頁下 3 行)

イ 発明の要約

「本発明は、組み換えDNA手法を用いて真核性GAD₆₅ポリペプチドの生産が可能であり、かつGAD₆₅ポリペプチドを自己免疫疾患の患者の診断及び治療に用い得るという知見に基づいてなされた。特定すれば、クローン化真核性GAD₆₅ポリペプチドを、インシュリン依存性真性糖尿病（IDDM）を有する患者、或いは有する危険性のある患者の診断に用いることに関する。

本発明の主な利点は、天然の真核性GAD₆₅ポリペプチドをその他の真核性非GAD₆₅ポリペプチドから分離する際に、その単離に関して生じる問題を回避しつつ、天然源から精製したものに対応する真核性GAD₆₅ポリペプチドの容易な生産源を当業界に提供することである。その他の真核性非-GAD₆₅ポリペプチドが存在しないことは、GAD₆₅ポリペプチドと特異的に反応する抗体のみを検出する試験システムの開発が可能となるので、重要である。

宿主細胞中にある真核性GAD₆₅ポリペプチドを提供する他の利点は、そうすることによって天然源から現在実際に得られているよりも、はるかに大量のポリペプチドを得ることが可能となることである。その結果、本発明のポリペプチドを用いてIDDMのような自己免疫疾患を有する患者をより正確に分類することが可能となるばかりでなく、診断システムに使用するための商業的に使用可能な量のGAD₆₅ポリペプチドを提供することも可能となる。」（2頁下1行～3頁16行）

ウ 発明の詳細な説明

(ア) 「本発明者による研究により、GAD₆₅とGAD₆₇とは別々の遺伝子でコードされ、例えば、共通のゲノム性配列が転写後、又は翻訳後に修飾されることによって生産されるのではないことが明白に確立された。GAD₆₅とGAD₆₇とが別々の遺伝子によってコードされることを示す証拠には以下のものが含まれる：(a) GAD₆₅及びGAD₆₇ c D

N Aの間の正確に一致する部分の最大の連続した配列は、たった17ヌクレオチドの長さである、(b) G A D₆₅及びG A D₆₇からのc D N Aは、低い緊縮調節 (stringency condition) 下で (2 . 0 x S S C , 0 . 0 1 % S D S , 2 3) お互いにクロスハイブリダイゼーションしないし、またお互いのm R N Aともクロスハイブリダイゼーションしない、そして(c) G A D₆₅及びG A D₆₇ c D N Aは、それぞれG A D₆₇及びG A D₆₅をコードする単離したゲノム性クローンとクロスハイブリダイゼーションしない。」(6頁17行~下1行)

「本発明のc D N A配列は本質的に全てのヒト又はラットG A D₆₅分子をコードするものであるので、これからc D N Aの小さいポリペプチド断片、又はヒト又はラットG A D₆₅に対する自己抗体のための少なくとも1個のエピトープをコードする対応するc D N A配列を調製し、サブクローニングし、そして発現させることは今や日常的なことである。次いでクローン化ポリペプチド上にこのようなエピトープが存在することを、例えばG A D₆₅に対する自己抗体を有する患者からの血清を用いて確認できる。このような小さいペプチドの例としては、G A D₆₅のN - 末端からの最初の約100アミノ酸がある…。このアミノ酸配列には本質的にG A D₆₇が欠けている。」(8頁19行~下2行)

「キットを使用するに当たって使用者がしなければならないことは、測定可能であるが、未知の量の検出されるべきG A D₆₅に対する自己抗体を含む、あらかじめ測定した量の検出用サンプルと、第1の容器中に存在するあらかじめ測定した量の担体結合したG A D₆₅と、第2の容器中に存在するあらかじめ測定した量の検出可能な標識化第2抗体とを容器に加えることである。若しくは、検出不能な標識化G A D₆₅を容器に付けて提供し、これにサンプルと、検出可能な標識化第2抗体とを加えることもできる。適当な時間インキュベーションした後、免疫複合体が

形成され、これを上澄み液から分離し、免疫複合体又は上澄み液を、放射能力カウントするか、又は酵素基質を加えて発色させるなどによって検出する。」（１０頁１５行～２３行）

「本発明の組み換え GAD_{65} ポリペプチドは、 GAD_{65} に対する自己免疫応答を有する患者の治療に用いることもできる。このような治療は、例えば、組み換え GAD_{65} ポリペプチドを投与することによって実施できる。このような投与には非標識化又は標識化 GAD_{65} ポリペプチドを用いることができる。非標識化 GAD_{65} ポリペプチドを用いるのが有利な場合には、例えば、免疫応答を刺激するには小さすぎるが、自己免疫応答の継続を束縛したりブロックしたりするには十分大きい断片の形で GAD_{65} ポリペプチドを投与する。例えば、 GAD_{65} をエピトープ-サイズのペプチド（典型的には５ - １２アミノ酸の長さ）に酵素的に消化して、自己免疫疾患を有する患者の体液中、又は免疫細胞の表面上に存在する Fab 結合部分に結合させる。

或いは、本発明の組み換え GAD_{65} ポリペプチドは、治療剤で標識して投与することができる。これらの治療剤は本発明の GAD_{65} ポリペプチドと直接又は間接にカップリングさせることができる。間接的カップリングの一例はスペーサー部分を用いることである。このスペーサー部分は可溶性又は不溶性であることができ（Diener et al., Science, 231:148, 1986）、ターゲット部分で GAD_{65} ポリペプチドから医薬の放出をできるように選択される。免疫治療用に本発明の GAD_{65} ポリペプチドとカップリングすることができる治療剤の例としては、医薬、放射性同位体、レクチン、及び毒素がある。

本発明の GAD_{65} ポリペプチドと結合することができる医薬には、マイトマイシン C、ダウノルビシン、及びビンブラスチンのような古典的に医薬と呼ばれていたものを含む。」（１０頁下１行～１１頁２０行）

(イ) 実施例 1 (「GAD₆₅のクローニング及び発現」「A. 組み換え DNA 手法」)

「GAD₆₅及びGAD₆₇に特異的な cDNA プロブを得るために、Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294, 1979の方法を用いて、成熟ラットの脳から、グアニジンインチオシアネート - セシウムグラジエントによって、全 RNA を抽出した。Bethesda Research Laboratories (BRL)による実験書を用いて、ポリ (A) RNA をオリゴ dT セルロース上で精製した。ポリ d (N₆) - mers (Pharmacia) をプライマーとして用いた以外は、指示された条件を用いて、MMLV - 逆転写酵素 (BRL) を用いて一本鎖合成を行った。この cDNA - RNA 混合物を 65 ° で 15 分間加熱して不活性化して、- 20 ° に貯蔵した。PCR のためには、サンプルの 1 / 50 を反応物 100 µ l に加えた。ネコ (cDNA から) (K et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987) 及びラット (ペプチドから) (B and C, J. Neurosci., 8: 2123, 1988) GAD (図 1) の下線を施した共通のアミノ酸配列をコードするために変性 (degenerate) オリゴヌクレオチドを合成した (Applied Biosystems)。各変性オリゴヌクレオチドの 5' 末端配列は、SstI 及び HindIII (5' 末端オリゴ) 又は SstI 及び SstI (3' 末端オリゴ) のいずれかによって認識される DNA 配列の 1 本鎖を含む。これらのプライマーを用いて、Gould et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:1934, 1989 に記載されたように、生じた cDNA 鋳型のポリメラーゼ鎖反応によって選択的増幅を行った。PCR 産物を HindIII / SstI で二重消化された Bluescript SK ベクター (Stratagene) にサブクローニングし、DH5 (BRL) に形質転換して、標準法 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)

によってプレートした。

ネコ G A D₆₇ に特異的な 5' - ³²P 末端標識化オリゴヌクレオチドでコロニーハイブリダイゼーションを行った (K e t a l . , J.Neurosci . , 7:2768, 1987) 。 ニトロセルロースフィルターを 5 0 で 1 5 分洗浄した以外は , 文献 (Wallace et al . , in Guide to Molecular Cloning Techniques; Berger et al . , Eds. in Methods of Enzymology; Abelson et al . , Eds. Academic Press, Inc. San Diego , 432-442, 1987) 記載のようにして , オリゴヌクレオチドの末端標識 , ハイブリダイゼーション条件 , 及び洗浄条件を実施した。ハイブリダイゼーションで陽性及び陰性であったコロニーを個々に取り上げて , Terrific 液体培地中で一夜成長させた (Tartof et al . , Focus , 9:12, 1987) 。 煮沸法 (Maniatis et al . , Molecular Cloning: A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) を用いて D N A を単離し , 0 . 2 N N a O H で鋳型を変性し , Sephacryl S 4 0 0 スパンカラム (Pharmacia) で精製した。変性された二本鎖鋳型の配列決定は , T 7 - シークエンスキット (Pharmacia) を用いて , 鎖 - 末端法 (Sanger et al . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977) によって行った。

図 1 に示すように , P C R で生じたラット G A D₆₅ 及び G A D₆₇ c D N A をプローブとして用いて , 標準的手法 (Maniatis et al . , Molecular Cloning: A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor, NY, 1989) によって , S. Heinemann (Salk Institute) から供与されたラムダ Z A P (Stratagene) ラット海馬ライブラリーをスクリーニングした。2 4 0 0 ヌクレオチドの G A D₆₅ c D N A (最大クローン) を単離して , Stratagene に記載するよう ” ザッピング (zapping) ” によってサブクローニングした。手元に既にあった 3 .

2 kb のラット GAD₆₇ cDNA クローンよりも小さいラット GAD₆₇ cDNA を得たら、より大きな cDNA の配列決定を行った。GAD₆₅ 及び GAD₆₇ について両方の方向に Exo 削除 (Henikoff, Gene, 28:351, 1984) を行って、鋳型を調製し、上記のようにして配列決定を行った。ライブラリースクリーニングにおいて単離された元の cDNA クローン中には現れていなかった GAD₆₅ 及び GAD₆₇ mRNA の残りの 5' 末端をクローニングするために、アンカー (anchored) PCR を行った (Frohman et al., Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998, 1988)。これらのクローンの配列決定を行ったところ、GAD₆₅ 又は GAD₆₇ mRNA のいずれも、フレーム中に元の cDNA クローンの開始コドンであると以前に同定されたものと共に、更に別の開始コドン (AUG) をなんら含んでいないことが明らかとなった。」(13 頁 15 行 ~ 15 頁 17 行)

(ウ) 実施例 2 (「クローン化 GAD₆₅ の特徴」)

「A. ノーザンブロットハイブリダイゼーション」には、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによって GAD₆₇ 及び GAD₆₅ cDNA は 2 個の異なる mRNA に由来することを確認したことが記載されている。(15 頁下 9 行 ~ 16 頁 11 行)

「B. GAD₆₇ 及び GAD₆₅ のゲノム性ハイブリダイゼーション」には、GAD₆₇ 及び GAD₆₅ が別々の遺伝子に由来する可能性を調べるために、GAD₆₇ 及び GAD₆₅ の両方の cDNA を、ゲノム性 DNA を含む DNA ブロットとハイブリダイゼーションしたところ、異なるサイズのゲノム断片とハイブリダイズしたことで、GAD₆₅ と GAD₆₇ cDNA との同一のヌクレオチド配列のうち最大の連続した配列は、たった 17 ヌクレオチド塩基の長さであることが、したがって、GAD₆₇ と GAD₆₅ とは 2 個の異なる遺伝子によってコードされていることが記載されている。

る(16頁12行~17頁8行)。

「C. GAD₆₇及びGAD₆₅の酵素的比較」には, GAD₆₇及びGAD₆₅の活性におけるPLP(ピリドキサルリン酸)の効果を比較する研究を行ったところ, 「...GAD₆₅又はGAD₆₇を含むバクテリア溶菌物は[1-¹⁴C]-グルタミン酸と, GABA及び¹⁴CO₂との変換を触媒する。PLPは, GAD₆₇よりもGAD₆₅の酵素活性を刺激する。このより大きな刺激は多分, Martin及びその共同研究者(Martin, Cell.Mol.Neurobiol.,7:237,1987)が提唱した不活化サイクルを通して, GAD₆₅がより速く循環することを示している。このより速い循環は, *in vivo*で存在するapo-GADのプールに, GAD₆₅がより貢献していることを示している(Miller et al., Brain Res.Bull.,5(Suppl.2):89,1980)。従って, *in vivo*ではPLPは, GAD₆₇活性よりもGAD₆₅活性をより制御していると考えられる。」(19頁下15行~下7行)と記載されている。

「D. GAD₆₅及びGAD₆₇の免疫学的同定」には, 「ラット脳中のGADの低分子量及び高分子量形は, それぞれGAD₆₅及びGAD₆₇cDNAの産物と, 抗原的にまた大きさに同じものである。その結果, ラット脳中の2つのGADは, GAD₆₅とGAD₆₇である。このデータから, 既に報告されているタピア(Tapia)によるPLP-依存性GADと, PLP-非依存性GAD(Bayon et al., J.Neurochem.,29:519,1977)は, それぞれGAD₆₅及びGAD₆₇と分子的に同じものである, と結論付けることができる。」(21頁4行~9行)と記載されている。

「E. 脳組織中のRNAにおけるGAD₆₅及びGAD₆₇の分布」には, その場での(*in situ*)ハイブリダイゼーションを用いて, 小脳のRNAにおけるGAD₆₅及びGAD₆₇の分布を決定するための実

験を行ったところ、「全ての神経性細胞タイプにおいて、 GAD_{67} mRNA レベルの方が大きい。*in situ*でのハイブリダイゼーションにおける観察は、小脳中の非依存性 GAD 活性に対する PLP の依存率は、試験した脳領域中で最も低いものの一つである、という従来知見 (Nitsch, J. Neurochem., 34:822, 1980; Denner et al., J. Neurochem., 44:957, 1985; Itoh et al., Neurochem. Res. 6: 1283, 1981) と一致している。更に、表 2 に示すように、 GAD_{67} mRNA に対する量は、プルキニエ > ゴルジ > 籠 > 星細胞の順であり、一方 GAD_{65} に対する量は、ゴルジ > プルキニエ > 籠 > 星細胞の順である。このように GAD_{65} 及び GAD_{67} mRNA の発現はニューロンのクラスによって異なる。つまり、全 GAD 活性に対するそれぞれの貢献度が、いかに $GABA$ 生産が制御されているかに影響している。」(23 頁下 11 行 ~ 下 1 行) と記載されている。

「F. GAD_{65} 及び GAD_{67} の無細胞系配置」には、 GAD_{65} 及び GAD_{67} の分布を S_2 及びシナプトソーム無細胞分画において評価したところ、「...どちらの分画にも等量の GAD_{67} が存在することを示している。 S_2 分画は神経膠 (及びその他の非ニューロン性) の細胞質ゾルタンパク質と、ニューロン細胞とを含んでいるので、 GAD_{67} の濃度は、神経末端よりもニューロン細胞体部における方が大きいに違いない。これとは対照的に、 GAD_{65} の濃度は S_2 よりもシナプトソームにおける方が大きい。これらの無細胞分画実験は、 GAD_{65} とは対照的に、神経末端よりもニューロンの細胞体部において、はるかに大きい GAD_{67} 分画が存在することを示唆している。従って、免疫組織化学的研究におけるのと同様に、無細胞分画化は、 GAD_{65} 及び GAD_{67} が異なる無細胞分布を有していることを示している。」(24 頁下 6 行 ~ 25 頁 3 行) と記載されている。

(工) 実施例 3 (「臨床標本中の GAD 自己抗体の検出」)

「... I D D M の危険があるか、或いは I D D M 患者の (5 例のうち) 4 例の血清は、コントロール患者の血清よりも、有意に大量のヒト脳抽出物の酵素的に活性な GAD と結合している。更に、患者のうちの 1 人からの血清は前 - I D D M 時期に採取されており、従って GAD に対する自己抗体は I D D M 症状の発病前に存在していたことになる...

更に別の実験 (結果を示さず) では、I D D M の危険がある患者 2 人 (D A , D C) からの血清は、組み換え法で生産された ^{35}S - GAD₆₅ を免疫沈降させるが、一方組み換え法で生産された ^{35}S - GAD₆₇ は、患者 D A の血清のみによって認識された (そしてこれは ^{35}S - GAD₆₅ よりも弱い) ことを示した。またそれ以後の研究で、神経病の合併症を有する I D D M 患者の血清中には、GAD₆₅ よりも GAD₆₇ 自己抗体の力価が大きいことが見いだされた (ここでは示さず)。

患者 D A の血清を用いる別の研究において、ヒト膵臓小島細胞で生産される特異的ポリペプチドを認識する抗体の存在が示された。結合ポリペプチドの電気泳動分析によって、他の研究者によって以前にヒト I D D M (Baekkeskov et al., Nature, 298:167-169, 1982) 及び動物モデル (Baekkeskov et al., Science, 224:1348-1350, 1984; Atkinson et al., Diabetes, 37:1587-1590, 1988) で示されたような、64 kD の成分に対する自己抗体の存在が明らかとなった。GAD₆₅ を認識するが、GAD₆₇ は認識しない、GAD - 6 モノクローナルで、或いはバクテリアで生産される GAD₆₅ でこれらの血清をあらかじめ吸着させると、64 kD の膵臓ポリペプチドを血清が認識する能力が失われる。従って 64 kD の自己抗原に対する自己抗体によって認識されるエピトープが GAD₆₅ 中に存在し、このことは該自己抗原が GAD₆₅ であることを示唆している。GAD₆₅ の予測される値を調査するために、I D D M の臨床

的発現の発病前の患者から血清を採取して，このGAD₆₅に対する自己抗体を調べた。」（31頁1行～下1行）

「...12標本中の9標本（75%）は³⁵S-GAD₆₅と免疫反応性であった。更に，2人の患者（JA及びVC）はこの条件下でGAD₆₇と免疫反応性であったが，GAD₆₅とは免疫反応性でなかった。従って，組み合わせると，これらの患者の血清の12例中，11例（91%）にGAD₆₅及びGAD₆₇に対する自己抗体が存在した。このことは，GAD₆₅に対する自己抗体はGAD₆₇に対する自己抗体よりも一般的であるが，アッセイにおいて両方の組み換えGAD（GAD₆₅及びGAD₆₇）を用いると，IDDMをより広く予測できるようになることを示唆している。これらの血清についての以前の試験（Atkinson et al., *Lancet*, 335:1357-1360, 1990）は，12例のうちの11例，又は92%がヒト膵臓小島細胞からの³⁵S-64kD分子と免疫反応性であることを示している。64kD分子に対する検出可能な自己抗体を含むが，GAD₆₅に対する自己抗体は含んでいない血清は，64kD分子にとって最低の力価（又は”1”）を含む血清であった。従って，ここで得られた誤りのネガティブはこのアッセイの感度が低いために起きたことである。更に，このアッセイは，64Kに対してネガティブな1人の患者（BR）においてIDDMを予測している。

これらの結果は，ヒト膵臓のβ細胞中に同定された64kD分子は，ラットGAD₆₅とサイズ及び抗原性が同一であることを示している。更に，IDDM発病前の患者から採取した血清は，GAD₆₅に対する自己抗体を含んでいる。結論として，GAD₆₅組み換え分子は，IDDM予測の診断手段として非常に有用である。実際に症状がでる前に医師がIDDMを診断できるということは，疑いもなくインシュリン治療が必要となるまでの時間がおおいに伸びる結果となる。このような免疫

アッセイの感度は、膵臓のβ細胞に存在するGAD形を表すヒト由来の組み換えGAD₆₅を用いて改良されるであろう。」(33頁1行～下3行)

- (2) 以上の(1)の記載によると、本願発明1について、血清中における64 kD分子に対する抗体の存在が、インシュリン-依存性真性糖尿病(IDDM, I型糖尿病)の症状が実際に起きる始まりについての、最も初期でかつ最も信頼できる指標であるところ、64 kD分子とグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)とは、いくつかの共通の抗原エピトープを有しており、これらは同じものであるかあるいは非常によく似た分子であるので、GAD分子をクローニングし、次いで量産することができれば、IDD M予知のための診断キットの開発が可能になること、本願発明1は、「(a)『ラットGAD₆₅のアミノ酸配列(別紙1)からなるタンパク質』、(b)『ヒトGAD₆₅のアミノ酸配列(別紙2)からなるタンパク質』、又は、(c)『(a)もしくは(b)のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された(a)もしくは(b)由来のタンパク質でかつGAD活性を有するタンパク質』をコードするcDNA」というものであるところ、この発明は、GAD₆₅とGAD₆₇とが別々の遺伝子でコードされていることを見出し、ラットとヒトのGAD₆₅のDNA配列及び対応するアミノ酸配列を特定したものであること、GAD₆₅ポリペプチドは、IDD M予知のための診断のみならず、IDD Mの治療に用いることもできること、以上の事実が認められる。

3 取消事由1(引用発明1は引用発明としての適格性を欠く)について

- (1) 引用例1(B and C「Characterization of the Protein Purified with Monoclonal Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase [グルタミン酸デカルボキシラーゼに対するモノクローナル抗体により精製されたタンパク質の特徴付け]」The Journal of Neuroscience, Vol.8, No.6,1988

p.2123-2130，甲１）には，次の記載がある。

ア 「GADが重要な機能を有することは以前からわかっていたが，この酵素の構造や細胞内での分布に関する主要な疑問点はまだ解明されていない。GADは，最初に出発材料としてマウス脳を使用して，Robertsとその共同研究者によって幅広く精製された（Wu et al., 1973）。ほとんどの精製された分画のSDS-PAGEは，15から118 kDaの範囲の分子量を有する7つのタンパク質バンドを含んでいた（Wu 1976）。これらのデータに基づいて，GADは，15 kDaタンパク質のホモマルチマーからなることが提案された。その後，GADは，ラットの脳からWuとその共同研究者によって精製された。最も広く精製された物質は，40と80 kDaのポリペプチドで構成されていた（Denner et al., 1987）マウスから精製されたそれらと，これらのタンパク質との関係は，研究されていない。Spink et al. (1985)は，ブタ脳から精製されたGADは，60 kDaの単一のポリペプチドであることを提唱した。最近，Legay et al. (1987a,b)は，59と63 kDaのタンパク質を沈殿させる，ラット脳GADのモノクローナル抗体について述べている。このように，文献によって提唱されているGAD構造には，大きな不一致がある。」（2123頁右欄3行～22行，訳は審決3頁7行～21行）

イ 「GADの構造が解明できることを期待して，我々はGAD-1モノクローナル抗体で認識されたタンパク質について研究した。59 kDaタンパク質は，精製され，部分的に配列決定された。」（2124頁左欄1行～3行，訳は審決2頁下2行～3頁1行）

ウ 「A氏と共同研究者は，ネコGADのcDNAをクローニングし，配列決定をした（F et al., 1986; K et al., 1987）。59 kDaタンパク質とネコGAD cDNAの関係を理解するために，59 kDaタンパク質を予備的SDS-PAGEにより精製した。第4図は，この精製工程を経て

得られた精製 59 kDa タンパク質を示す。このタンパク質の N 末端は、ブロックされていることがわかったため、アミノ酸配列を決定するために、このタンパク質は、化学シアンにより切断され、切断されたペプチドは逆相 HPLC により分離された。12 ペプチドのピークを配列決定した。これらのうち、4 つは、完全に又は部分的に重複するものであったが、8 つはユニークな配列を有していた。ネコ cDNA から推定されるタンパク質配列と、ラット 59 kDa タンパク質からの配列の間には、強い相同性があることがすぐに明らかになった。推定ネコ配列とともに得られた該タンパク質配列を比較したデータを表 2 に示す。配列決定されたすべてのペプチドは、少なくとも部分的に相同性を有するものである。配列決定されたペプチドは、長さで計 97 個のアミノ酸残基である。それらを推定ネコ配列の 3 つの隣接したセクションと共に比較した。比較した配列において、97 アミノ酸のうち 68 個が一致した。さらに、比較的長い一致した配列が存在し、12 アミノ酸残基のものが一つ、10 アミノ酸残基のものが一つ、8 アミノ酸残基のものが一つ、5 アミノ酸残基のものが一つであった。29 個の一致しないアミノ酸残基のうち、17 個は、単一の塩基置換によりできる可能性があるものであった。」(2126 頁右欄 6 行～29 行、訳は乙 1 の 1 頁 5 行～21 行)

エ Table 2 (表 2) には、ネコ GAD cDNA から推定される GAD アミノ酸配列とラット 59 kDa タンパク質の部分アミノ酸配列との比較が記載されており、両者において保存されているアミノ酸は、実線により囲まれている。Table 2 (表 2) の脚注には、「K et al. (1987)」,「ネコ cDNA 配列のブレイクは、最初のアミノ酸の最初の塩基の番号を付した垂直線により示した。」及び「タンパク質配列における空白の位置は、ペプチド配列決定において、それらの位置のシグナルが欠失 (absence) していたことによるものである。」(訳は乙 1 の 1 頁 23 行～24 行及び 2

6 行～ 2 7 行)の記載があり, Table 2 (表 2)には, 上記「最初のアミノ酸の最初の塩基の番号を付した垂直線」が 3 本記載され, その番号とは「7 1 1」, 「8 1 4」, 「1 7 1 3」である。

オ Table 2 (表 2)において, ネコ G A D アミノ酸配列とラット 5 9 k D a タンパク質の部分アミノ酸配列において, 実線により囲まれた, 5 アミノ酸以上の長さで保存されている配列は, 次のとおりである。

(ア) ネコ c D N A の塩基番号「7 1 1」で始まる領域で, 6 アミノ酸の次に「L T S T A N T N」(8 アミノ酸残基), さらに 2 アミノ酸の次に「T Y E I A P V F V L」(1 0 アミノ酸残基)

(イ) ネコ c D N A の塩基番号「8 1 4」で始まる領域で, 1 2 アミノ酸の次に「D G I F S P G G A I S N」(1 2 アミノ酸残基), さらに 1 1 アミノ酸の次に「F P E V K」(5 アミノ酸残基)

(ウ) ネコ c D N A の塩基番号「1 7 1 3」で始まる領域にはない。

上記 3 つの領域で, 他に, 実線により囲まれた, 4 アミノ酸残基が重複する箇所が 1, 3 アミノ酸残基が重複する箇所が 5, 2 アミノ酸残基が重複する箇所が 3, 1 アミノ酸残基が重複する箇所が 8 ある。合計の重複は, $8 + 1 0 + 1 2 + 5 + 4 + 1 5 + 6 + 8 = 6 8$ アミノ酸残基である。

カ 「G A D - 1 免疫親和性カラムは, ラット脳ホモジネートの細胞質分画から G A D 活性を濃縮された画分を得るために使用された。最も濃縮された画分は, ニワトリ脳からのものと区別がつかない一連のタンパク質を含んでいた。最も顕著なバンドは明らかに 5 9 k D a の分子量を有するものであった。他のバンドとして, 6 3 k D a と, 5 5 k D a を中心とする一連の約 3 つのバンドが存在した。ラット脳の膜分画からの精製は, 似た図を示す。5 9 k D a と 6 3 k D a タンパク質は明瞭に存在し, より少ない量で低分子量成分が存在した。H P L C により自然な形のままでこれらのバンドを分離するすべての試みは失敗した。5 9 k D a タンパク質は, 予

備的 SDS - PAGE によって単離され，臭化シアンによる切断により断片化された。配列分析によると，このタンパク質はネコの GAD cDNA (F et al., 1986; K et al., 1987) と強い相同性を有していることを示し，これは，酵素的に活性な GAD をコードしていることを示している。」「59 kDa ラットタンパク質とネコタンパク質間の相同性は，3 つの可能な方法によって説明することができる。最初は，これらは，ネコとラットの両方において，GAD をコードする一つの遺伝子であって，2 つのタンパク質の相違の全ては，進化の多様性によるものであるという仮定である。2 つめの可能性は，それぞれの種は単一の遺伝子をもっており，選択的スプライシングのパターンでいくつかの mRNA が生じるというものであって，したがって，ネコ cDNA とラット 59 kDa タンパク質は，単一遺伝子の選択的スプライシングの経路を示すものであるというものである。最後は，GAD 又は GAD 様タンパク質は複数の遺伝子が存在して，ネコ cDNA とラット 59 kDa タンパク質は，関連性はあるが，異なる遺伝子の産物であるというものである。これらの選択肢の中から一つを選ぶには，該免疫精製したタンパク質および対応する cDNA のさらなる解析が必要である。」(2129 頁左欄 15 行～44 行，訳は乙 1 の 1 頁下 7 行～2 頁下 1 行)

「K et al. (1987)によると，ネコ GAD cDNA は，66 kDa のタンパク質をコードする。われわれの抗体を使って免疫沈殿させた 59 kDa の相同体と，予想されている分子量の間に矛盾があるのは，種の違いやタンパク質がゲル上で異常な移動を示すこと，又は，生合成の際のタンパク質分解で除去された配列が存在していることによるものであろう。」(2129 頁左欄 44～50 行，訳は審決 2 頁下 9 行～下 5 行)

- (2) 以上の(1)の記載と乙 2 (K, F and A 「Glutamic Acid Decarboxylase cDNA: Nucleotide Sequence Encoding an Enzymatically Active Fusion

Protein [グルタミン酸デカルボキシラーゼの c D N A : 酵素的に活性な融合タンパク質をコードする核酸配列] 」 The Journal of Neuroscience, Vol.7, No.9, 1987, p.2768-2772) によると, 引用例 1 (甲 1) は, ラット脳ホモジネート又はラット脳の膜分画から, G A D に対するモノクローナル抗体 G A D - 1 の免疫親和性カラムを用いて, G A D 活性を有するタンパク質を集め, これが, 顕著なバンドとして 5 9 k D a のもの, 他のバンドとして 6 3 k D a のものを含むことを確認し, この 5 9 k D a タンパク質を部分的に配列決定し, 既に上記乙 2 によって配列が知られていたネコ G A D c D N A から導かれるアミノ酸配列と比較したもので, 比較した三つのセクションの計 9 7 個のアミノ酸のうち, 6 8 個が一致し, この中には, 1 2 アミノ酸残基, 1 0 アミノ酸残基, 8 アミノ酸残基, 5 アミノ酸残基といった, 一致した比較的長い配列があることを見出し, 両者に強い相同性があると結論付けたものである。そして, この相同性について引用例 1 (甲 1) は, 三つの可能性, すなわち, ネコとラットの両方において, G A D をコードする一つの遺伝子であって, 二つのタンパク質の相違は, 進化の多様性によるものである, それぞれの種は単一の遺伝子をもっており, 選択的スプライシングのパターンでいくつかの m R N A が生じた, ネコ c D N A とラット 5 9 k D a タンパク質は, 関連性はあるが, 異なる遺伝子の産物である, という可能性を挙げ, この解明のために, 免疫精製したタンパク質及び対応する c D N A のさらなる解析が必要であると述べている。

引用例 1 (甲 1) は, 以上のとおり, ラット 5 9 k D a G A D の部分的なアミノ酸配列を特定して, それを既知のネコ G A D c D N A から導かれるアミノ酸配列と比較し, それらは, 異なる遺伝子の産物である可能性があると述べているから, 当業者 (その発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者) に対し, ラット 5 9 k D a G A D 全体のアミノ酸配列及び対応する c D N A を解析する動機付けとなるということができる。本願明細書

(甲11)には、前記2(1)ウ(ア)のとおり、「ネコ(cDNAから)(K et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987)及びラット(ペプチドから)(B and C, J. Neurosci., 8:2123, 1988)GAD(図1)の下線を施した共通のアミノ酸配列をコードするために変性(degenerate)オリゴヌクレオチドを合成した(Applied Biosystems)。」との記載があるところ、ここで「K et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987」は、引用例1に引用されている乙2に当たり、「B and C, J. Neurosci., 8:2123, 1988」は引用例1に当たるから、本願発明の発明者も引用例1に基づいてプライマーを設計している。

そして、引用例1(甲1)の上記記載から周知技術を用いてラット59 kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析することができたことは、後記4で判断するとおりである。原告は、GAD₆₇と異なる遺伝子を見つけようとするならば、ラット59 kDa GADアミノ酸配列とネコGAD₆₇アミノ酸配列が同じ配列である部分をプローブとして用いることは避けなければならないが、ラット59 kDa GADにおいてネコGAD₆₇と異なるアミノ酸配列領域は非常に短いと主張する。しかし、後記4のとおり、PCR法を用いれば、引用例1(甲1)の上記記載から周知技術を用いてラット59 kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析することができたと認められるのであって、ラット59 kDa GADにおいてネコGAD₆₇と異なるアミノ酸配列領域が短いことは、この認定を左右するものではない。

なお、甲7(Lほか「Rat Brain Glutamic Acid Decarboxylase Sequence Deduced from a Cloned cDNA [クローン化したcDNAから演繹されたラット脳グルタミン酸デカルボキシラーゼ配列]」Journal of Neurochemistry Vol.54, No.2, 1990, P.703-705)は、引用例1(甲1)に記載のラット59 kDa GADの部分アミノ酸配列と甲7が特定したラットGADのアミノ酸

配列の違いについて「諸相違はタンパク質配列決定に内在する可能性が大きい」（704頁右欄5行～右欄6行，訳は平成19年2月27日付け原告上申書8頁下7行～下6行）と記載されている。しかし，甲7には，上記記載以上に引用例1に記載されたアミノ酸配列が誤りであることを示す合理的な根拠が示されているものではなく，かえって，甲7によると，甲7が特定したラットGADのアミノ酸配列は，乙2に記載されたネコGADのアミノ酸配列とはかなり似ているが，引用例1（甲1）に記載されたラット59kDa GADアミノ酸配列とは異なるところが多くあり，このことは，ラット59kDa GADは，ラットGADやネコGADとは異なる遺伝子の産物である可能性を想起させるものである。また，甲7には，「現在は，脳GADに対するcDNAクローンと配列データが利用可能なので，Legay等（1986）が報告した，60及び63kDのGAD2種の起原と意味を明らかにすることや，Spink等（1985）が特徴を明らかにした動力的に異なるGADの3つの形態を研究することに役立つであろう。」（705頁左欄下14～下9行，訳は上記上申書8頁下4行～下1行）との記載もあって，複数種あるとされるGADの相互の関係は未解明であるとされているのであり，上記のとおり本願発明の発明者が引用例1に基づいてプライマーを設計していることをも考慮すると，甲7の上記記載は，引用例1（甲1）はラット59kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析する動機付けとなるとの上記認定を左右するに足るものということとはできない。

したがって，引用発明1は引用発明としての適格性を欠いているとの原告の主張は理由がない。

4 取消事由2（本願発明1及び6は引用発明1から容易に発明することができたものではない）について

(1) 本願優先日（1990年〔平成2年〕9月21日）当時の技術水準

ア 乙8（鈴木信太郎「混合プライマーを用いたPCR法の応用」実験医学

Vol.8, No.9 (増刊) 1032頁～1036頁[1990年6月発行])には、次の記載がある。

(ア) 「いろいろな研究を進めていく過程において、既知の蛋白質に相同な蛋白質のcDNAを必要とすることがしばしば起こる。このため、これまでにいくつかの方法が考案され用いられてきたが、いずれも一長一短があった。これに対し、最近一組の良く保存されているアミノ酸配列に対応したプライマーを用いるPCR法が盛んに利用されるようになってきた。この方法の最大の特徴は、アミノ酸配列に対応するすべての可能なヌクレオチド配列を含むプライマーを用いる点にある。従って、原理的には用いるアミノ酸配列に誤りがないかぎり目的のcDNAを必ず増幅できることとなり、非常に強力な方法であるといえる。」(1032頁左欄下7行～右欄5行)

(イ) プライマーの作製

「初めにプライマーに関する注意点を二、三述べておきたい。通常PCR用のプライマーとしては20b前後のオリゴヌクレオチドが多く用いられているが、条件を適当に選べば15～17bの短いオリゴヌクレオチドでも十分使用可能である。プライマーとして最も大事な点は3'末端付近の配列が正確なことである。これに対し、5'末端付近のミスマッチは多少許される。このため、アミノ酸配列に多少あいまいな点のある場合は、この部分を5'末端付近においた長めのプライマーを用いると良い。そうすれば、たとえアミノ酸配列に誤りがあったとしても、うまく働いてくれることが期待できる。2つのプライマーの3'末端に相補的構造があるとプライマーダイマーが作られるので避けねばならない。次に、プライマーに含まれるオリゴヌクレオチド配列の組み合わせの数であるが、Gouldらは 2^{18} の組み合わせを含んでいるプライマーも働いたとしているし、われわれの経験でも $2^{13 \sim 14}$ なら十分働くようで

ある。従って、20 b (7 アミノ酸) 前後のプライマーを用いる限り、組み合わせの数はほとんど問題にはならないものと考えられる。

本法を用いるにはまず既知のアミノ酸配列を比較検討することにより、良く保存されている部位または良く保存されていることが十分期待できる部位から、先に述べた点を考慮しながら次のようなアミノ酸配列を選び出す。

(a) アミノ酸 5 ~ 7 残基の配列で、プライマーの 3' 末端に対応するアミノ酸配列に誤りを含んでいる可能性が低いこと。この時、1 つの部位に複数のアミノ酸に対応させても良い...

(b) 2 つの配列間の距離は現在の PCR 法的能力から考えて、アミノ酸約 300 残基以下が望ましい (最大でも 1000 残基以下)。

次に、コドン表をもとに、得られたアミノ酸配列に対応する混合プライマーのヌクレオチド配列を決定する。この時、プライマーの 5' 末端に出現頻度の低い制限酵素のリンカー配列を加えておくと、サブクローニングの際の手間を省くことができる。」(1032 頁右欄 8 行 ~ 1033 頁左欄 13 行)

(ウ) 鋳型 DNA の調製

「鋳型 DNA は mRNA より合成した DNA を用いるのが一般的である。もちろん、cDNA ライブラリーより調製した DNA を流用することも可能である。」(1033 頁右欄下 10 行 ~ 下 8 行)

(エ) PCR

「われわれは PCR を次のような標準的条件下で、市販の自動反応装置を用いて行っている。」(1034 頁左欄 3 行 ~ 4 行) として、標準的条件が記載されている。

「ここで述べた条件は増幅する DNA の長さがおよそ 1 kb 以下である場合を対象としたものであるが、もし、これ以上の長い DNA を増幅

したい場合はDNAの合成時間を延ばしたり，ヌクレオチド濃度を増やしたりといろいろ実験条件を変更する必要がでてくる。しかし，現在のPCRの技術では2 kb以上の長いDNAを効率よく増幅することは一般的に言って容易ではないので，初心者は避けた方が無難であろう。」

（1034頁右欄2行～9行）

（オ）サブクロニング

「このようにして増幅したDNA標品はアガロース電気泳動にかけて予想される大きさのバンドを分離し，DNAを抽出する。用いるアガロースは通常の市販品で十分である。また，DNAの抽出法は一般に用いられているいずれの方法でも良い。

次に，得られたDNAを制限酵素で処理した後，フェノールで処理，エタノール沈殿でDNAを回収，それぞれのベクターにサブクロニングする。

ここで多くの人が経験する大きな問題は，増幅したDNAをうまくベクターにサブクロニングできないことである。…一般に，目的とするDNAは増幅した標品中に比較的多量に含まれていることが期待できる。従って，増幅したDNAをプローブとしたブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことが効果的である。なお，サブクロニングの方法として，リンカーを用いるより blunt end を用いた方が効率が良いという研究者がいることから，問題の生じた場合はこの方法を試みられるのもよからう。また，用いるアガロースによっては制限酵素がうまく働かないこともあるので，特別のアガロースを用いたり，電気泳動と酵素処理の順序を入れ替えることも効果的であるかもしれない。われわれは主にM13ファージベクターを用いているが，pGEM等のプラスミドベクターを用いても良い。」（1034頁右欄11行～1035頁左欄14行）

(カ) 結果の検討および問題点

「最後に、常法に従って得られたクローンのシーケンシングを行い、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を決めて既知のアミノ酸配列と比較し、相同性を検討する。この際、プライマー配列を指標にして結果を解析するのが便利であるが、しばしばこの配列が欠損しているので注意すること…。

このようにして得たDNAの多くは非常に短いものであるが、Northernやスクリーニング用プローブとして十分使用できる。目的に応じて使用されたい。

本法を応用する上で最大の問題は、目的とするmRNAの含量がほかの相同なmRNAに較べてかなり低い場合、または、たまたま関連のないDNAが比較的大量に増幅されるような場合、増幅したDNA中における目的とするDNAの含量はかなり低くなっているため、このようなクローンの分離が難しいことにある。本法は多くの組み合わせの数を含む混合プライマーを用いているので、このような例はしばしば起こるようである。…

ここで述べた方法はかなり平均的なもので、必ず一定の結果が期待できるという無難な方法といえる。」(1035頁左欄下3行～1036頁左欄2行)

(キ) その他への応用

「本法は原理から明らかなように、一般のcDNAクローニングにも応用が可能である。もし、近接した2つのアミノ酸配列が判明しているのであれば直接本法を流用できる。また、1つのアミノ酸配列だけがわかっている場合でもいくつかの方法が考えられる。もしそれがC末端付近にあるのであれば、mRNA 3'末端のpoly Aに対応したオリゴdTを一方のプライマーとして用いることにより応用できる。同様に、

N末端付近のアミノ酸配列が判明している場合は，cDNAの3'末端に人工的にdG鎖等を付加することにより，本法の応用が可能となる（anchoredPCR）。」（1036頁左欄8行～18行）

イ 乙9（結城惇「新しいクローニング法：PCRとIPCR」Cell Science, Vol.6, No.5, 370頁～376頁[1990年8月発行]）には，次の記載がある。

（ア）「PCRはクローニングを単純で，しかも短時間で行われるようにただけではない。1個の細胞に相当するDNAさえあれば，ゲノム当たり1コピーの遺伝子を増幅できるという，従来のクローニングではなし得なかった遺伝子操作を可能にした。

しかし，PCRで増幅できるDNAの長さは2kbまでで，通常1kb以下の領域を指定して増幅する。」（370頁右欄22行～29行）

（イ）PCRとIPCR

「PCRは，20bp以上の塩基配列の判明している二ヶ所の間を増幅する方法...である...。

PCR法では，二本鎖DNAの+鎖に対応するプライマーと-鎖に対応するプライマーとの間をDNAポリメラーゼで合成させる。」（371頁左欄4行～10行）

「PCRでDNA断片を増幅するためには，2つのプライマーに対応する，鋳型DNA上の2ヶ所の塩基配列が判明していることが必要になる。」（371頁右欄10行～12行）

（ウ）タンパク質のアミノ酸配列をもとにクローンを得る方法

「...アミノ酸に対応する遺伝コードは，1つでないため，アミノ酸配列から推定されるメッセンジャーRNAの塩基配列は多数にのぼる．この中1つの塩基配列のみがクローン化しようとする遺伝子と対応するが，アミノ酸配列から推定される多数のオリゴヌクレオチドの混合物を

PCRの系に加えると、この中鋳型DNAと完全に一致するオリゴヌクレオチドがプライマーとして最も有効に作用する。PCRでもIPCRでも2本のプライマーを使用するので、このプライマー効率も倍化され、目的とするDNA断片が優先的に増幅される。アミノ酸配列は最低5つのアミノ酸の配列がわかれば、この方法によってcDNAのクローニングができる。

5つのアミノ酸から推定される、塩基配列は、100をこえる。この混合物をプライマーとしてDNA増幅系に加えるので、プライマーが相補的な塩基配列を正しく認識するのに最適な温度条件を設定することがとくに重要となる。

cDNAライブラリーの中に探索している特定のクローンが入っているかどうかを上記の方法で検定し、もし探索している塩基配列が増幅されたらこの増幅産物をプローブとして使い、クローンを拾い出す。

gt11ライブラリーをスクリーニングする場合、 10^{12} ヶ程度までのファージ粒子を100 μ lのPCR反応液中で検定できるので、 10^6 に1ヶの独立クローンがあるとして、1クローン当り 10^6 ヶまでの鋳型DNAを反応液中に入れることができる。

増幅されたDNA断片には、非特異的な断片も含まれているので、さらにベクターに組み込んで純化する。ベクターに組み込む前に、ゲル電気泳動でDNAを分画したほうが純化しやすい。」(372頁左欄3行～右欄1行)

(エ) 試験管内で増幅したDNA断片のベクターへの組み込み

「...増幅したDNA断片がベクターへ組み込まれる方向を特定するために、制限酵素認識配列を5'末端につけた合成ポリペプチドをプライマーとしてDNAの増幅を行うこともできる。増幅されたDNA断片は対応する制限酵素で両端を切断し、ベクターに組み込む。この時、プラ

イマーの制限酵素認識配列の5'側にGGあるいはCTCをつけると...
制限酵素による切断が効率的に行われる。プライマーの5'側の制限酵素認識配列とGGないしはCTCは鋳型DNAと一致しなくても増幅反応を阻害しないが、3'側は鋳型DNAと完全に相補性を持つようにプライマーの配置を決めることは重要である。」(373頁左欄21行~33行)

(オ) 増幅過程での複製の誤り

「クローニングに関連する増幅反応のエラーは、

- (1) プライマーが鋳型DNAを誤って認識して、ねらいとする領域以外の部分を増幅してしまうこと、
- (2) DNAの複製過程で、誤った塩基を取り込むこと、の2つがあげられる。

(1)は、特異性の高いプライマーを選択し、PCRサイクルでのプライマーのアニーリングの温度を最適条件に調節して解決する。また、プライマーアニーリングとDNA合成の時間は必要最小限にして、誤ったプライミングによるDNA合成を抑制する。また、プライマーの量とDNA合成酵素の量も少なく抑えることが、誤りを抑制するポイントとなる。...

cDNAの場合にはタンパク質の分子量とアミノ酸配列から、増幅産物の長さが推定出来るので、増幅されたDNA断片の長さを電気泳動で正確に判定することで、上記のような誤認は避けることができるが、さらにサザーン法で、2つのプライマー間の配列が増幅産物上に含まれていることを確認する。」(373頁右欄18行~374頁左欄6行)

ウ 乙15 (猪子英俊「PCR法の発展とその医学応用」Biotherapy, Vol.4, No.6 [1990年6月発行] 1103頁~1113頁) には、次の記載がある。

(ア) 「... P C R (polymerase chain reaction) 法は，目的とする遺伝子領域を標的として 1 0 0 万倍以上増幅させることができる。」(1 1 0 3 頁左欄 4 行～ 7 行)。

(イ) P C R 法の原理とその発展例

a Standard P C R

「Standard P C R 法は，図 1 のように注目している標的遺伝子領域の両端の塩基配列に相当するオリゴヌクレオチド (1 7 ～ 2 3 塩基) を合成し，DNA ポリメラーゼのプライマーとして使用する。2 つのプライマーは，DNA 二本鎖の互いに異なる鎖に相当する塩基配列から合成するが，検索したい DNA 配列の変異あるいは遺伝的多型性領域が両プライマー間に位置するように工夫する。図 1 に示したように遺伝子 DNA と 2 つのプライマーを混ぜた後，まず 9 5 で 1 分間熱処理により DNA 二本鎖を一本鎖に分離，変性させる。続いて，5 5 ～ 6 2 で 2 分間プライマーと鋳型となる遺伝子 DNA のアニーリングを行い，プライマーを DNA 上の標的遺伝子領域に結合させる。その後，7 2 で 2 分間 T a q DNA ポリメラーゼ...により，プライマーからの DNA の伸長，合成を行い，これで 1 サイクルを終了する。ここまでの操作で標的遺伝子は 2 倍増幅されるはずである (図 2)。このサイクルを 2 0 ～ 3 5 回繰り返すことにより，約 1 0 0 万倍標的遺伝子は増幅される。ここで耐熱性の T a q DNA ポリメラーゼを用いるという卓抜なアイデアにより，従来の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントを用いた場合には 1 サイクル，すなわち 9 5 の変性と 5 5 ～ 6 0 のアニーリングごとに失活する Klenow フラグメントを補給するという面倒な操作が不要となり，自動機械化が可能となった。増幅できる遺伝子領域の大きさは，いまのところ最長 3 ～ 5 k b まで可能であるが，2 0 0 ～ 3 0 0 b p 前後が最も効率よく増

幅されるようである。」(1 1 0 4 頁左欄 1 1 行 ~ 1 1 0 5 頁左欄 8 行)

b Nested P C R

「Standard P C R 法で、特に長い領域を増幅した場合にみられる現象であるが、misprimingによる非特異的な増幅バンドが検出される場合、すなわち特異的なバンドのみを増幅させるために 1 回目の P C R 反応の後、増幅される領域内に相当する別の新しい両方のプライマー、あるいは片一方のみを新しいプライマーに代えて 2 回目の P C R 反応を行う(図 3)。この方法はnested P C R と呼ばれ、5' 末端 c D N A の増幅、塩基配列の決定、制限酵素による切断...などの特異的な領域のみの増幅が要請されるような場合に有用な方法である。」(1 1 0 5 頁左欄 1 0 行 ~ 右欄 4 行)

c Anchored P C R

「増幅したい領域のプライマーとして用いるべき一方の端の塩基配列が不明の時、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(T d T) による d A または d G の 3' 末端への付加、あるいは T 4 D N A リガーゼによるオリゴマーの付加など人工的塩基配列を賦与した後、この人工的なAnchorプライマーと既知のプライマーとの組み合わせで P C R 反応を行い、特異的な遺伝子増幅を行う(図 4)。特に 3' 末端が一本鎖の場合には(たとえば一本鎖 c D N A が適当な制限酵素で 3' 突出物を作製した場合)、T d T による d A (d G) の付加反応のほうが簡単に行える利点がある。」(1 1 0 5 頁右欄 6 行 ~ 1 1 0 6 頁左欄 1 行)

(ウ) P C R 反応産物の解析

「P C R 反応後増幅 D N A について直接塩基配列を決定するか... , M 1 3 あるいは p U C ベクターなどにサブクローニング後常法に従って塩

基配列を決定する。後者の場合あらかじめプライマーに適当な制限酵素部位を導入しておけばサブクローンの操作が簡便化される...。」(1109頁左欄下21行～下15行)

(エ) 基礎医学への応用

「...PCR反応により100万倍に増幅されたDNAはクローニングの必要がなく、直接塩基配列の決定が可能である。すなわち、増幅後³²Pで標識したプライマーと大腸菌DNAポリメラーゼI、Klenowフラグメント、逆転写酵素、T7DNAポリメラーゼまたはTaqDNAポリメラーゼを用いたDideoxy (Sanger) 法により、シングルコピーの遺伝子であってもDNA配列を決定できる。しかし...このdirect-sequencingはしばしば非特異的なバンドなどを生じることがあるので、M13やpUCベクターなどにサブクローンする...」(1110頁右欄下4行～1111頁左欄8行)

エ 乙18 (松橋通生, 大坪栄一監訳「ワトソン・組換えDNA」74頁～76頁 [昭和63年3月25日第3刷発行] 丸善株式会社) には、次の記載がある。

「ある特定のcDNAプラスミドをもつ大腸菌の同定。pBR322をベクターとして作製したcDNAライブラリーを大腸菌に形質転換法で入れる。生じたコロニーはレプリカしたニトロセルロースフィルター上に移すことができる。まず、ニトロセルロースの膜を大腸菌のコロニーに接して寒天プレートの上におく。フィルターをはがすときコロニーの中の細胞の大多数はプレートに残るが、いくらかはフィルター上へ移行する。したがって、フィルター上のパターンとプレート上のコロニーパターンは等しい。次いで、ニトロセルロースをNaOHで処理し、菌体を溶菌するとともにDNAを変性する。フィルターを真空オーブンで乾熱し、DNAをニトロセルロースフィルターに結合させる。精製したcDNAあるいはmR

N Aのプローブを³²Pで標識しフィルターとハイブリダイズさせる。プローブと相同な配列を含む組換えプラスミドをもつコロニーがそれとハイブリッドを形成し、オートラジオグラフィーで解析すると目印の標識を与える。レプリカのフィルター上で標識の現れたコロニーの位置をマスタープレートと比較し、コロニーを釣り上げ、増殖させる。」(76頁の「図6・7」の説明部分)

オ また、PCR法の適用例については、次のようなものがある。

(ア) 乙10 (GREGORIO GILほか「Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-コエンザイムAレダクターゼのプロモーターに結合する核因子1様蛋白質をコードする多重遺伝子]」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.85, 1988, p.8963-8967) には、レダクターゼプロモーター因子タンパク質A及びBにおいて一致するアミノ酸配列を基に作製された縮退プライマーを用いて、cDNAを鋳型としてPCR法により増幅し、増幅されたDNAをプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングして、レダクターゼプロモーター因子タンパク質BのcDNAをクローニングしたことが記載されている。

(イ) 乙11 (CHENG CHI LEEほか「Generation of cDNA Probes Directed by Amino Acid Sequence: Cloning of Urate Oxidase [アミノ酸配列で導かれたcDNAプローブの作成：尿酸オキシダーゼのクローニング]」Science, Vol.239, 1988, p.1288-1291) には、ブタ尿酸オキシダーゼのアミノ酸配列を基に作製した縮退プライマーを用いて、cDNAを鋳型としてPCR法により増幅し、増幅されたDNAをプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングして、尿酸オキシダーゼのcDN

Aをクローニングしたことが記載されている。

(ウ) 乙16 (MICHAEL STRATHMANNほか「Diversity of the G-protein family: Sequences from five additional subunits in the mouse [G蛋白質ファミリーの多様性：マウスの5つのさらなる サブユニットの配列] 」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.86, 1989, p.7407-7409) には、縮退プライマーを用いて、cDNAをPCR法により増幅し、得られたPCR生成物をベクターにクローニングしてから、すべてのクローンの塩基配列決定を行うことにより新たなグアニンヌクレオチド結合調節タンパク質 (Gタンパク質) のメンバーを五つ見出したことが記載されている。

(エ) 乙17 (ANDREW F.WILKS「Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction [ポリメラーゼ連鎖反応の適用により同定された2つの推定されるタンパク質チロシンキナーゼ] 」Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol.86, 1989, p.1603-1607) には、縮退プライマーを用いて、cDNAをPCR法により増幅し、得られたPCR生成物をベクターにクローニングしてから、すべてのクローンの塩基配列決定を行うことにより、新たなタンパク質チロシンキナーゼ (PTK) ファミリーのメンバーを二つ見出したことが記載されている。

カ 以上のア～オの記載によると、本願優先日 (1990年 [平成2年] 9月21日) 当時、既知のタンパク質のアミノ酸配列をもとに、5～7アミノ酸残基の二つの配列を選び、コドン表をもとにそのアミノ酸配列に対応するすべての可能なプライマーのヌクレオチドを決定し、このすべての可能なプライマーの混合物を用いて、mRNAから調製したcDNAを鋳型DNAとして、目的のcDNAを増幅させ、このようにし

て増幅したDNAを適宜分離してベクターにサブクローニングし、これを増幅させたDNAをプローブとしてスクリーニングして、目的のcDNAを得る方法は、「PCR法」の応用ないし変性として、一般的に用いられていた周知の方法であること、PCR法により十分な量のDNAが得られれば、この塩基配列を決定することも、通常のことであったこと、また、PCR法によって増幅したDNAをベクターにサブクローニングした後、すべてのクローンの塩基配列決定をすることも行われていたこと、増幅したい領域のプライマーとして用いるべき一方の端の塩基配列が不明の時には、Anchored PCR法が用いられること、クローニングの方法としてコロニーハイブリダイゼーションが周知の方法であったこと、以上の事実が認められる。

- (2) 前記2(1)ウ(イ)の本願明細書(甲11)の記載によると、本願発明1において、GAD₆₅(引用例1記載のラット59kDa GAD)のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析した手法は、成熟ラットの脳から全RNAを抽出し、逆転写酵素を用いて一本鎖合成を行う、引用例1(甲1)に引用されている乙2記載のネコGADのアミノ酸配列と引用例1(甲1)記載のラット59kDa GADのアミノ酸配列が共通する部分のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、末端に「5'st 及びHind」(5'末端オリゴ)又は「Sst 及びSst」(3'末端オリゴ)の制限酵素認識配列を付加し、これをプライマーとして、PCR法を行い、その結果得られた産物をベクターにサブクローニングし形質転換する、乙2記載のネコGADに特異的な5'-³²P末端標識化オリゴヌクレオチドでコロニーハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーションで陽性及び陰性であったコロニーを個々に取り上げて、液体培地中で一夜成長させ、DNAを単離し、配列決定を行う、PCR法で生じたラットの2種類のGAD cDNAをプローブとして用いて、ラムダZAPラット海馬ライブラリ

ーをスクリーニングし、サブクローニングした後、配列決定を行う、5'末端をクローニングするために、アンカー（anchored）PCRを行う、というものであると認められる。そうすると、本願発明1において、GAD₆₅（引用例1記載のラット59kDa GAD）のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析した手法は、上記(1)で認定した一般的に用いられていた方法によったもので、当業者が容易に想到することができる程度のものであると認められる。

また、前記2(1)ウ(ウ)の本願明細書（甲11）に記載されているとおり、GAD₆₇及びGAD₆₅cDNAが2個の異なるmRNAに由来することを確認することが行われているが、このうち、ノーザンブロットについては、上記(1)ア(カ)に記載があるなど、本願優先日（1990年〔平成2年〕9月21日）当時周知の方法であったと認められ、その他、GAD₆₇及びGAD₆₅cDNAが2個の異なるmRNAに由来することを確認することについて困難な点があったとは認められない。

(3) 原告の主張に対する補足的判断

ア 原告は、引用例1（甲1）からは、本願発明1のGAD₆₅cDNAの取得は容易でなかったとして、本願優先日（1990年〔平成2年〕9月21日）当時、GADの由来となる遺伝子の数が未解明であったこと、本願発明者らが1989年に発表した論文においても、ヒト及びラットのGADは、ただ一つの遺伝子であると記載されていること（甲8の1・2）、本願発明者らは、1990年に、二つのGAD遺伝子に関する論文を、雑誌「SCIENCE」に投稿したところ、最初は掲載を拒絶されたこと（甲13）、Jらは、マウスにおいて第2のGAD遺伝子を見い出していたが、それは偽遺伝子であったこと（甲6）、Lらの研究（甲7）は、彼らの研究によって得られたラットGADクローンが、引用例1によって報告されたものとよく一致し、違いは技術的な問題であることを示唆

していること， 1987年7月に引用例1が発表されてから，1991年に本願発明者らが論文でGAD₆₇とGAD₆₅のクローニングを報告するまでには4年が経過していることを主張する。

しかし，上記 については，引用例1（甲1）が，当業者に対し，ラット59kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析する動機付けとなることは，前記3（取消事由1）で判断したとおりであり，かつ，引用例1に周知技術を適用して，ラット59kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを解析することができたことは，上記(2)のとおりであって，GADの由来となる遺伝子の数が未解明であったことは，これらの認定を左右するものではない。

上記 については，甲8の1（F, G and A「TWO FORMS OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE(GAD), WITH DIFFERENT N-TERMINAL SEQUENCES, HAVE DISTINCT INTRANEURONAL DISTRIBUTIONS [N - 末端配列が異なるグルタミン酸塩デカルボキシラーゼ（GAD）の2つの形態は，異なるニューロン内分布を有する] 」 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, VOLUME 15, 1989, P. 487] 」及び甲8の2（G, H, F and A「IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES USING A NEW ANTISERUM AGAINST BACTERIALLY PRODUCED FELINE GLUTAMATE DECARBOXYLASE [細菌によって製造されたネコグルタミン酸塩デカルボキシラーゼに対する新たな抗血清を用いた免疫細胞化学的研究] 」 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, VOLUME 15, 1989, P. 488）は，いずれも本願発明者を共著者に含んでいるところ，甲8の1には「ヒト及びラットのゲノムは，ただ1つのGAD遺伝子を含む...」（487頁右欄下14行，訳は原告平成19年2月27日付け上申書9頁7行）などと記載され，甲8の2には，「これらの知見は，大きい方のGADポリペプチドが細胞体中に存在し，そしてそれは小さい方の形態に変換されて，軸索末端に濃縮されるという仮説を支

持している。」(488頁23行～26行, 訳は上記上申書10頁1行～3行)と記載されている。しかし, 本願発明者らが後に発表した甲5(I and A「The Structural and Functional Heterogeneity of Glutamic Acid Decarboxylase: A Review」Neurochemical Research, Vol.16, No.3, 1991, p.215-226)や甲13(本願発明の発明者の一人であるIの宣誓書)の記載に照らすと, 本願発明者らが, 1989年当時, ヒト及びラットのGADはただ一つの遺伝子であることについて確証を有していたわけではないと認められるのであるから, 甲8の1・2の記載も, 前記3及び上記(2)の認定を左右するものではない。

上記 については, 甲13には, GAD遺伝子が単一のものである旨の論文を掲載を雑誌に拒否されたことが記載されている(3頁下13行～下6行, 訳は上記上申書[甲13に関するもの]4頁18行～25行)ものの, 上記 に沿う事実の記載はなく, この事実を認めることはできない。

上記 については, 甲6(Jほか「Sequences Homologous to Glutamic Acid Decarboxylase cDNA Are Present on Mouse Chromosomes 2 and 10[グルタミン酸デカルボキシラーゼcDNAと相同な配列がマウスの染色体2及び10に存在する]」GENOMICS 6, 1990, P.115-122)には, マウスにおいて, 第2のGAD遺伝子を見い出したが, それは偽遺伝子であったことが記載されている。しかし, それは, 同論文の著者らが見い出した遺伝子が偽遺伝子であったということとどまるから, やはり前記3及び上記(2)の認定を左右するものではない。

上記 については, 甲7は, 前記3(2)で判示したとおりであって, 前記3及び上記(2)の認定を左右するものではない。

上記 については, 1987年7月に引用例1が発表されてから本願優先日(1990年[平成2年]9月21日)までは, 3年余りであるが, そのような期間があるからといって直ちに本願発明1の進歩性を認めるこ

とはできない。

イ 原告は、縮退プライマーをPCRに用いて同じ種の中の関連する遺伝子をクローニングする実験について、実験のために用いるプライマーはかなり縮退していたために、増幅された生成物を生産することができなかった、本願発明者らは、ネコGADのラット同等物のゲノム構造又は潜在的な第2のGAD遺伝子のゲノム構造を知らなかったから、もし、いくつかの大きなイントロンがあったなら、PCR生成物の長さは効率的に増幅できないほどに大きくなるため、否定的な結果をもたらした、設計されたプライマーに内在する制限部位が目的とするcDNAに内在していて、クローニングのために選択した酵素が、想定される第2GAD遺伝子の内部に存在する特異的な配列を切断してしまえば、想定される第2の遺伝子は排除されることになる、引用例1の配列を肯定的に選択する方法はなかった、1990年代の初期には、単一遺伝子の配列決定はいまだ非常に困難で費用のかかる仕事であった、と主張する。

上記 については、本願発明の実施例（甲11の図1）のように、引用例1（甲1）の表2に示された、一致した比較的長い配列から、10アミノ酸残基の部分から8アミノ酸の部分を選び、5アミノ酸残基の部分に3アミノ酸残基をつなげて8アミノ酸の部分を選んだ場合でも、被告が主張するとおり、それぞれ、6144個（ 3×2^{11} 個）と2048個（ 2^{11} 個）であり、上記(1)ア(イ)記載の「 2^{13-14} 」個よりも十分小さいから、縮退PCRクローニングの適用が困難なほど縮退が大きいということはない。

上記 については、PCR法において、鋳型DNAは、mRNAより合成したDNA又はcDNAライブラリーより調製したDNAを用いる（上記(1)ア(ウ)）から、イントロンは既に除去されており、イントロンは問題にならない。また、ネコGADのラット同等物のゲノム構造又は潜在的

な第2のGAD遺伝子のゲノム構造を知らないと、PCR法によってラット59kDa GAD全体のアミノ酸配列及び対応するcDNAを特定することができないとも認められない。

上記 については、制限酵素認識配列を末端に付加して使用することは、PCR法において周知の技術であった（上記(1)ア(イ)、イ(エ)、ウ(エ)）のであり、クローニングのために選択した酵素が、想定される第2 GAD 遺伝子の内部に存在する特異的な配列を切断するのであれば、適宜他の制限酵素認識配列を試すなどすればよいと考えられるから、この点も、PCR法を用いることができない理由にはならない。

上記 については、上記(2)の本願明細書（甲11）の実施例記載の方法は、否定的選択と肯定的選択を組み合わせて用いており、肯定的選択を用いることができなかったとはいえない。

上記 については、本願発明に費用や時間がかかることがあったとしても、そのことは直ちに本願発明の進歩性を基礎付けるものではない。

ウ 原告は、本願発明者らは、PubMedを用いて期間を区切った文献検索を行ったところ、「degenerate + primer + PCR + cloning」に関する1985年から1990年の時間枠でのPubMed検索では、たった4件の論文しかヒットせず、「mixed + primer」でPubMed検索をすると、1985年1月1日から1990年9月21日の時間枠では、26件の論文がヒットしたが、この中には、本願発明者らが採用した方法に関するものは1件もない、クローニングの技術は、1991年付近を境に大きく変わっており、1991年以前は、縮退PCR研究は極端に難しかった、縮退プライマーPCRを用いて遺伝子をクローニングするための詳細なプロトコルは1990年又はそれ以前には無かった、本願発明者らは、1990年又はその付近でPCRクローニングにおけるプライマーの縮退に関する「通常」の程度の定義を見い出すことはできなかった、と主張する。

しかし、本願優先日（１９９０年〔平成２年〕９月２１日）当時、ＰＣＲ法がその応用ないし変性も含めて周知技術であったことは、上記(1)認定のとおりであって、原告の上記の各主張は、この認定を左右するものではない。学術的な意味でのプロトコールや「定義」の存否と特許法における進歩性の判断とは異なるものである。

エ 原告は、上記(1)エ(ア)(イ)の乙１０及び１１と本願発明１の異なる点について主張するが、上記(2)のとおり、本願発明１において、 GAD_{65} （引用例１記載のラット 59 kDa GAD ）のアミノ酸配列及び対応する cDNA を解析した手法は、一般的に用いられていた周知な方法によったもので、当業者が容易に想到することができる程度のものであると認められるのであり、乙１０及び１１と本願発明１の違いは、この認定を左右するものではない。

(4) したがって、本願発明１は引用発明１から容易に発明することができたものといえることができる。

5 取消事由３（本願発明１及び６の格別の効果の看過）について

(1) 引用例２（Ｄほか「Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase」Nature, Vol.347,1990.Sep.13, p.151-156, 甲２）には、次の記載がある。

「相対分子量 64000（64K）の膵島細胞自己抗原は、インシュリン依存糖尿病（IDDM）の進行に関係する自己抗体の主要な標的であり、抑制神経伝達物質である GABA（ γ -アミノ酪酸）の生合成酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼとして同定された。」（１５１頁左欄１行～８行、訳は審決３頁下１２行～下９行）

「珍しいが深刻な神経疾患であるスティッフマン症候群（SMS）のほとんどの患者は、GABA分泌ニューロンに対する自己抗体を有している。グ

ルタミン酸から G A B A を合成する酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D) は、主な自己抗原である。驚いたことに、G A B A 分泌ニューロンに対する自己抗体に陽性であるほとんどすべての患者は、膵島細胞質抗原にも陽性であることが、膵臓部位の免疫蛍光によって示され、そしてかなりの割合で I D D M を有している。G A D は選択的に中枢神経系の G A B A 分泌ニューロンにおいて発現している。ニューロン以外では、G A D は膵臓細胞において高いレベルで見ついている。脳には、少なくとも 2 つの G A D アイソマーがあり、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりそれらの移動性に差があることが解析されている。それらの分子量は、59 - 66 K であるといわれている。

I D D M は、S M S と頻繁に関連する自己免疫疾患であり、G A D と 64 K 自己抗原の性質のいくつかは似ていることから、我々は、それらは同じタンパク質であると仮定した。ここで、我々は、I D D M の 64 K 自己抗原は膵臓細胞における G A D と同じであることを示す。」(151 頁右欄 14 行 ~ 152 頁左欄 8 行、訳は審決 3 頁下 7 行 ~ 4 頁 9 行)

「我々はまず、ラット脳 G A D に対する羊の抗血清である S 3 血清と、G A D 抗体に陽性な S M S 患者からの血清は、ラット膵島からの 64 K 自己抗原を免疫沈降するかどうか評価した。我々は、部分的に 64 K 抗原に富んだ、[35 S] メチオニン標識ラット膵島分画を使用した。G A D 抗体に陽性の血清 (抗 G A D 血清) は、I D D M 血清によって免疫沈降される 64 K

/ 自己抗原と同じ S D S - P A G E における移動性を有する [35 S] メチオニン標識タンパク質のダブレットを免疫沈降した。抗 64 K 血清と抗 G A D 血清によって認識されるタンパク質が同じものであるかどうか評価するため、抗 G A D 血清によって免疫沈降の結果生じた上清は、抗 64 K I D D M 血清によって再び沈降させた。同様に、抗 64 K I D D M 血清によって免疫沈降の結果生じた上清を、再び抗 G A D 血清で沈降させた。その結

果，抗 G A D 血清と抗 6 4 k 血清はそれぞれ，定量的に，血清の他のグループによって認識されるタンパク質を除去した。抗 G A D 血清と抗 6 4 K 血清は，完全な交差反応性を示し，6 4 K タンパク質はラット膵島の G A D と同じタンパク質であることが強く示唆される。」（152 頁左欄 10 行～右欄 1 行，訳は審決 4 頁 11 行～25 行）

「抗 G A D 血清と抗 6 4 K I D D M 血清は，ラット膵島由来の同じタンパク質を認識する。」（152 頁 Fig. 1 [図 1] 注釈 1 行～2 行，訳は審決 4 頁下 9 行～下 8 行）

「抗 6 4 K 抗体は，脳と膵島由来の G A D を免疫沈降する。」（153 頁 Fig. 2 [図 2] 1 行，訳は審決 4 頁下 7 行）

(2) 引用例 3（E ほか「64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes」THE LANCET, Vol.335, 1990 Jun., p.1357-1360, 甲 3）には，次の記載がある。

「インシュリン依存性糖尿病の進行に関連して，64,000 Mr（64 K A）の膵島細胞タンパク質の自己抗体の存在を検査をした。... I D D の臨床的発症前の 75 ヶ月の 28 患者を詳細に調べたところ 23 人において 64 K A は同定された。これらの 23 人の 64 K A 陽性プレ糖尿病被験者のうち，5 人は I C A に陰性であり，10 人は I A A を欠乏している。64 K A は，34 才以前に糖尿病になる人々において，最もその前兆となるものである。数人において，64 K A は他の自己抗体が出現する前に同定された。これらの発見は，64 K A は，早期にそして有益な I D D の予測マーカーであるかもしれないことを示唆している。」（1357 頁左欄 1 行～20 行，訳は審決 4 頁下 4 行～5 頁 5 行）

(3) 上記(1)(2)の記載によると，将来，糖尿病を発病する患者は，G A D である分子量 64 K の膵島細胞自己抗原又は膵島細胞タンパク質に対する，自己抗体をもっているということが出来るから，G A D を用意できれば，患

者が自己抗体をもっているかどうかを容易に検査できることは、当業者に自明である。

引用例 1（甲 1）には、ネコ GAD とラット GAD について記載されているものの、ヒト GAD については、記載されていない。したがって、引用例 1 から出発してアミノ酸配列及び対応する cDNA が解析されたラット GAD が、直ちにヒトの診断に有用かどうかは、必ずしも自明ではない。しかし、引用例 1 に記載されたラット 59 kDa GAD も、GAD（グルタミン酸デカルボキシラーゼ）であることに変わりはないから、引用例 1 から出発してアミノ酸配列及び対応する cDNA が解析されたラット GAD が、ヒトの IDDM の診断又は予知に使用できることは、当業者が予測できる範囲の事項と認められる。また、前記 2 (2) のとおり、本願明細書（甲 11）には、本願発明の GAD₆₅ ポリペプチドを IDDM の治療に用いることも記載されているが、これについても格別の効果とは認められない。

- (4) 原告は、GAD₆₇ と GAD₆₅ は、異なる酵素的動力学、細胞内分布を有しており、特に GAD₆₅ は I 型糖尿病における自己免疫応答の主たる標的である点で GAD₆₇ とは異なっている、と主張する。

前記 2 (1)ウ(ウ)(エ)のとおり、本願明細書（甲 11）においては、GAD₆₇ と GAD₆₅ が二つの別個の遺伝子によってコード化されていることを初めとして、GAD₆₇ と GAD₆₅ の違いについて記載され、最後に、GAD₆₅ が IDDM を予測するための診断ツールとして有用性が高いことが述べられている。しかし、GAD が IDDM を予測するための診断ツールとして有用であることは、上記のとおり、引用例 2（甲 2）及び引用例 3（甲 3）で述べられていたものであり、本願明細書（甲 11）に記載されている効果をもって顕著な効果ということはできない。

なお、本願出願後の後の検討によって、I 型糖尿病患者の自己免疫応答は、主に GAD₆₅ に向けられていることが確認されたとしても、そのこと

は、本願明細書（甲 1 1 ）には記載されていないから、これを考慮することができない。

(5) したがって、本願発明 1 に格別な効果があるとは認められない。

6 結論

以上のとおり、本願発明 1 についての原告主張の取消事由はいずれも理由がないから、本願発明 6 について判断するまでもなく、原告の請求は理由がない。

よって、原告の請求を棄却することとして、主文のとおり判決する。

知的財産高等裁判所 第 2 部

裁判長裁判官 中 野 哲 弘

裁判官 森 義 之

裁判官 澁 谷 勝 海

(別紙省略)