

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6188390号  
(P6188390)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D
<b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/577 B
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B
<b>CO 7 K 16/40 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/40
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08

請求項の数 15 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-82540 (P2013-82540)	(73) 特許権者	390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋二丁目1番3号
(22) 出願日	平成25年4月10日(2013.4.10)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(65) 公開番号	特開2014-206393 (P2014-206393A)	(72) 発明者	片岡 智恵 茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内
(43) 公開日	平成26年10月30日(2014.10.30)	(72) 発明者	浅見 麻里恵 茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内
審査請求日	平成28年1月6日(2016.1.6)	(72) 発明者	平山 明義 茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MMP-3の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の MMP-3 を測定する方法であって、

EDTA 共存下において EDTA 非共存下と同等の結合力を有する抗 MMP-3 モノクロナル抗体と試料中の MMP-3 を接触させる工程を含む、測定方法。

【請求項2】

EDTA 共存下において EDTA 非共存下と同等の結合力を有する抗 MMP-3 モノクロナル抗体が、2種以上の抗体である、請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】

2種以上の抗体が、MMP-3 に対する認識部位が互いに異なる抗体である、請求項2に記載の測定方法。

【請求項4】

2種以上の抗体が、以下の(1)及び(2)を満たす抗体である、請求項2又は3に記載の測定方法。

(1) EDTA 共存下におけるヒト MMP-3 との反応平衡定数(KD値)が、EDTA 非共存下における KD 値に対して 200% 未満

(2) EDTA 共存下におけるヒト MMP-3 との結合量を示す Rmax が、EDTA 非共存下での Rmax に対して 65% 以上

【請求項5】

2種以上の抗体が、寄託番号 FERMP-22219(82208)、FERMP-2

2 1 3 1 ( 8 2 2 1 1 )、 F E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、 F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1 6 )、 F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) からなる群より選ば  
れるハイブリド - マにより産生されるものである、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の  
測定方法。

【請求項 6】

試料が E D T A を含むものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の測定方法に用いられる、試料中の M M P - 3 を測定  
する測定試薬および測定試薬キット。

【請求項 8】

E D T A 共存下において E D T A 非共存下と同等の結合力を有することを特徴とする抗ヒ  
ト M M P - 3 モノクローナル抗体。

【請求項 9】

E D T A 共存下において E D T A 非共存下と同等のヒト M M P - 3 との結合力が以下の ( 1 )  
及び ( 2 ) を満たすことを特徴とする請求項 8 記載の抗 M M P - 3 モノクローナル抗体。

( 1 ) E D T A 共存下におけるヒト M M P - 3 との反応平衡定数 ( K D 値 ) が、 E D T A  
非共存下における K D 値に対して 2 0 0 % 未満

( 2 ) E D T A 共存下におけるヒト M M P - 3 との結合量を示す R m a x が、 E D T A 非  
共存下での R m a x に対して 6 5 % 以上

【請求項 10】

以下の工程を含む方法によって選択された請求項 8 又は 9 に記載の抗 M M P - 3 モノクロー  
ナル抗体。

工程 1 : M M P - 3 を免疫源として、非ヒト動物に免疫する工程

工程 2 : M M P - 3 に対する結合力が高い抗体を産生する免疫担当細胞を選択する工程

工程 3 : 工程 2 で選択した免疫担当細胞を使用してハイブリドーマを取得する工程

工程 4 : 工程 3 で取得したハイブリドーマを使用して抗 M M P - 3 モノクローナル抗体を  
取得する工程。

工程 5 : 前記工程 2 ~ 4 のいずれか一工程において、 E D T A 共存下と E D T A 非共存下  
それぞれの条件におけるヒト M M P - 3 に対する結合力を評価し、 E D T A 共存下と E D  
T A 非共存下で結合力が同等のクローンを選択する工程

【請求項 11】

寄託番号 F E R M P - 2 2 2 1 9 ( 8 2 2 0 8 )、 F E R M P - 2 2 1 3 1 ( 8 2 2 1  
1 )、 F E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、 F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1  
6 )、 F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) であるハイブリド - マにより産生される  
、モノクローナル抗体。

【請求項 12】

請求項 8 ~ 11 のいずれかに記載の抗 M M P - 3 モノクローナル抗体に由来する F a b 部  
位を含む、モノクローナル抗体断片。

【請求項 13】

請求項 8 又は 9 に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリド - マ  
。

【請求項 14】

F E R M P - 2 2 2 1 9 ( 8 2 2 0 8 )、 F E R M P - 2 2 1 3 1 ( 8 2 2 1 1 )、 F  
E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、 F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1 6 )、 F  
E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) である請求項 8 又は 9 記載の モノクローナル抗体  
を産生するハイブリド - マ。

【請求項 15】

以下の工程を含む請求項 8 又は 9 記載の抗 M M P - 3 モノクローナル抗体を製造する方法  
。

10

20

30

40

50

工程 1) ヒト MMP - 3 を免疫源として、抗 MMP - 3 抗体産生ハイブリド - マを取得する工程

工程 2) 工程 1 で取得したハイブリド - マが産生する抗体を、ヒト MMP - 3 と接触させて、結合力が強い抗体を産生するハイブリド - マを選択し、このハイブリド - マが産生する抗体を取得する工程

工程 3) 工程 2 で取得した抗体について、EDTA 共存下と EDTA 非共存下それぞれのヒト MMP - 3 に対する結合力を評価し、EDTA 共存下と EDTA 非共存下で結合力が同等のクローンを選択する工程

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ヒト MMP - 3 と特異的に反応し、かつ EDTA 共存下で EDTA 非共存下と同等のヒト MMP - 3 に対する反応性を有するモノクローナル抗体を使用する MMP - 3 の測定方法及び該測定方法に用いられる測定試薬・測定試薬キットに関する。また、前記モノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドマ、前記モノクローナル抗体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

MMP - 3 (マトリクスメタロプロテイナーゼ 3) は滑膜細胞や軟骨細胞で産生され、その特異的基質が軟骨を構成するプロテオグリカンであること、他の MMPs を活性化する作用も有することから、関節リウマチ (RA) 罹患時の関節組織破壊において中心的な役割を担っている酵素として知られている。

20

一般に慢性関節リウマチの病態の進展に伴い、滑膜は炎症反応を起こして増殖する。MMP - 3 は滑膜の増殖に伴い滑膜表層細胞で産生されて関節液中に貯留し、血管やリンパ管を經由して血中に移行すると考えられている。このことから、血中 MMP - 3 濃度は関節リウマチの診断補助や治療効果、疾患活動性、関節破壊の指標として、その臨床的有用性が広く知られている。ヒト MMP - 3 測定試薬、測定試薬キットとして、以下の非特許文献に示すような試薬が知られている。

【0003】

非特許文献 1 - 4 に示す試薬及びキットでは、EDTA 血漿では検出されるべき MMP - 3 濃度に対して、検出される MMP - 3 濃度が低値化するため、EDTA 血漿の使用は推奨しないと記載されている。さらに、非特許文献 5 では、非特許文献 4 記載のキットを用いて、各種採血管由来の試料測定値についての検討を実施し、EDTA を用いた場合に MMP - 3 測定値が低値化したという実験報告がなされている。

30

また、非特許文献 6 に示すキットでは、正常検体を測定したデータが記載されているが、8 項に記載されているように、EDTA 血漿測定値はその他検体種と比較すると、測定値が低値化する傾向にあることが明示されている。

このように、EDTA 血漿中の MMP - 3 濃度測定値の正確性に言及している例はこれまではなかった。しかしながら、慢性関節リウマチの診断補助や治療効果判定、疾患活動性、関節破壊の指標として MMP - 3 を用いるには、正確な測定値が得られることが極めて重要であり、そして検体の種類を問わずに正確な測定値が得られる臨床検査薬は極めて有用である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】パナクリア MMP - 3 プレ - ト添付文書 (第一ファインケミカル)

【非特許文献 2】パナクリア MMP - 3 ラテックス添付文書 (第一ファインケミカル)

【非特許文献 3】ELISA kit KAC1541 添付文書 (Invitrogen)

【非特許文献 4】Quantikine ELISA Human Total MMP -

50

## 3 Immunoassay (DMP300) (R&amp;D SYSTEMS)

【非特許文献5】Clinical chemistry 54:4 (2008) Impact of Blood Sampling on the Circulating Metalloproteinase 1,2,3,7,8, and 9

【非特許文献6】Amersham Matrix metalloproteinase - 3 Human Biotrack ELISA System (RPN2613) Product Booklet (GE Healthcare)

【非特許文献7】The Journal of Biological Chemistry Vol 261, No30 (1986) A Metalloproteinase from Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts that Digests Connective Tissue Matrix Components

10

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は、ヒトMMP-3と特異的に反応し、かつEDTA共存下でEDTA非共存下と同等のヒトMMP-3に対する反応性を有することを特徴とする抗MMP-3モノクロナル抗体、該モノクロナル抗体に由来する機能性断片、さらに該モノクロナル抗体を産生するハイブリド-マを提供することを課題とする。

また、本発明は、EDTAを含む試料中のMMP-3濃度を正確に測定するための免疫測定方法、免疫測定試薬及び免疫測定キットを提供することを課題とする。

20

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行ったところ、ヒトMMP-3に対するモノクロナル抗体の選別において、EDTA共存下とEDTA非共存下での抗体の反応性を指標とすることで、EDTA共存下とEDTA非共存下の反応性が同等のモノクロナル抗体を特別に選別できることを見出し、本発明を完成するに至った。このようにして得られたモノクロナル抗体は、EDTA共存下での反応性に着目したことがなかった従来の方法では特別に選別されることはなかった。

また、本発明者らは、上記で選別されたEDTA共存下でEDTA非共存下と同等の反応性を有するモノクロナル抗体同士を組み合わせることによって、EDTAを含む試料中でも測定値が低値化することなく、正確にMMP-3濃度を測定できることを見出した。したがって、本発明の別の目的は、抗原抗体反応を利用した免疫測定方法において、EDTA共存下でも強い反応性を有する抗体同士を組み合わせることにより、EDTAを含む試料中でもMMP-3濃度を正確に得られることを特徴とする免疫測定方法、測定試薬及び測定キットに関する。

30

具体的には、本発明は以下の構成を有する。

<1>試料中のMMP-3を測定する方法であって、

EDTA共存下においてEDTA非共存下と同等の反応性を有する抗MMP-3モノクロナル抗体と試料中のMMP-3を接触させる工程を含む、測定方法。

40

<2>EDTA共存下においてEDTA非共存下と同等の反応性を有する抗MMP-3モノクロナル抗体が、2種以上の抗体である、前記<1>に記載の測定方法。

<3>2種以上の抗体が、MMP-3に対する認識部位が互いに異なる抗体である、前記<2>に記載の測定方法。

<4>2種以上の抗体が、以下の(1)及び(2)を満たす抗体である、前記<2>又は<3>に記載の測定方法。

(1)EDTA共存下におけるヒトMMP-3との反応平衡定数(KD値)が、EDTA非共存下におけるKD値に対して200%未満

(2)EDTA共存下におけるヒトMMP-3との結合量を示すRmaxが、EDTA非共存下でのRmaxに対して65%以上

50

<5>2種以上の抗体が、寄託番号 F E R M P - 2 2 2 1 9 ( 8 2 2 0 8 )、F E R M P - 2 2 1 3 1 ( 8 2 2 1 1 )、F E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1 6 )、F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) からなる群より選ばれるハイブリド - マにより産生されるものである、前記<2>~<4>のいずれか一項に記載の測定方法。

<6>試料が E D T A を含むものである、前記<1>~<5>のいずれか一項に記載の測定方法。

<7>前記<1>~<6>のいずれか一項に記載の測定方法に用いられる、試料中の M M P - 3 を測定する測定試薬および測定試薬キット。

<8>E D T A 共存下において E D T A 非共存下と同等の反応性を有することを特徴とする抗ヒト M M P - 3 モノクロ - ナル抗体。

10

<9>E D T A 共存下において E D T A 非共存下と同等のヒト M M P - 3 との反応性が以下の ( 1 ) 及び ( 2 ) を満たすことを特徴とする前記<8>記載の抗 M M P - 3 モノクロ - ナル抗体。

( 1 ) E D T A 共存下におけるヒト M M P - 3 との反応平衡定数 ( K D 値 ) が、E D T A 非共存下における K D 値に対して 2 0 0 % 未満

( 2 ) E D T A 共存下におけるヒト M M P - 3 との結合量を示す R m a x が、E D T A 非共存下での R m a x に対して 6 5 % 以上

<10>以下の工程を含む方法によって選択された前記<8>又は<9>に記載の抗 M M P - 3 モノクロ - ナル抗体。

20

工程 1 : M M P - 3 を免疫源として、非ヒト動物に免疫する工程

工程 2 : M M P - 3 に対する反応性が高い抗体を産生する免疫担当細胞を選択する工程

工程 3 : 工程 2 で選択した免疫担当細胞を使用してハイブリド - マを取得する工程

工程 4 : 工程 3 で取得したハイブリド - マを使用して抗 M M P - 3 モノクロ - ナル抗体を取得する工程

工程 5 : 前記工程 2 ~ 4 のいずれか一工程において、E D T A 共存下と E D T A 非共存下それぞれの条件におけるヒト M M P - 3 に対する反応性を評価し、E D T A 共存下と E D T A 非共存下で反応性が同等のクローンを選択する工程

<11>寄託番号 F E R M P - 2 2 2 1 9 ( 8 2 2 0 8 )、F E R M P - 2 2 1 3 1 ( 8 2 2 1 1 )、F E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1 6 )、F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) であるハイブリド - マにより産生される、モノクロ - ナル抗体。

30

<12>前記<8>~<11>のいずれかに記載の抗 M M P - 3 モノクロ - ナル抗体に由来する F a b 部位を含む、モノクロ - ナル抗体断片。

<13>前記<8>又は<9>に記載のモノクロ - ナル抗体を産生することを特徴とするハイブリド - マ。

<14>F E R M P - 2 2 2 1 9 ( 8 2 2 0 8 )、F E R M P - 2 2 1 3 1 ( 8 2 2 1 1 )、F E R M P - 2 2 1 3 2 ( 8 2 2 1 3 )、F E R M B P - 1 1 4 8 6 ( 8 2 2 1 6 )、F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 ) である前記<8>又は<9>に記載のハイブリド - マ。

40

<15>以下の工程を含む前記<8>又は<9>に記載の抗 M M P - 3 モノクロ - ナル抗体を製造する方法。

工程 1 ) ヒト M M P - 3 を免疫源として、抗 M M P - 3 抗体産生ハイブリド - マを取得する工程

工程 2 ) 工程 1 で取得したハイブリド - マが産生する抗体を、ヒト M M P - 3 と接触させて、反応性が強い抗体を産生するハイブリド - マを選択し、このハイブリド - マが産生する抗体を取得する工程

工程 3 ) 工程 2 で取得した抗体について、E D T A 共存下と E D T A 非共存下それぞれのヒト M M P - 3 に対する反応性を評価し、E D T A 共存下と E D T A 非共存下で反応性が同等のクローンを選択する工程

50

## 【発明の効果】

## 【0007】

本発明のEDTA共存下でも非共存下と同等の反応性を有する抗MMP-3モノクロナル抗体を用いることで、EDTAを含む試料中のMMP-3濃度を正確に測定できる免疫測定試薬及び測定キットが提供可能になった。また、本発明のモノクロナル抗体の選択方法は、EDTA非共存下とEDTA共存下での抗体の反応性を指標に選択されるため、高精度に目的とするモノクロナル抗体を得ることができ、効率的である。本発明の免疫測定試薬及びキットを用いることで、EDTA血漿中のMMP-3濃度も正確に測定することができ、検体種を選ばないことから、慢性関節リウマチの臨床検査薬として用いるのに好適である。

10

## 【発明を実施するための形態】

## 【0008】

(抗ヒトMMP-3モノクロナル抗体)

本発明の抗ヒトMMP-3モノクロナル抗体は、ヒトMMP-3と特異的に反応する抗体である。抗ヒトMMP-3モノクロナル抗体を得るにあたって、ヒトMMP-3と抗原抗体反応を起こすことを指標とした選別はなされてきたが、EDTA共存下での反応性に注目した選別は例がなく、EDTA共存下でもEDTA非共存下と同等の反応性を有する本抗体はまったく新規である。

ここで、EDTA共存下でもEDTA非共存下と同等の反応性を有するとは、EDTA存在下でヒトMMP-3と反応させた場合と、EDTAを存在させずにヒトMMP-3と反応させた場合とで、反応性が同等であることをいい、反応性の指標としては、抗体のアフィニティの強さを示す反応平衡定数(KD値)、ヒトMMP-3との結合量を示すRmaxが挙げられる。また、固相抗体に対するヒトMMP-3との結合量、あるいは、抗体を結合させた担体の凝集度合いなどにより示すこともできる。

20

また、本発明の抗MMP-3モノクロナル抗体で反応性が同等である抗体とは、KD値とRmaxを指標とした場合、以下の特徴をもつ抗体をいう。

1) EDTA共存下での、ヒトMMP-3との反応平衡定数KD値が、EDTA非共存下での反応平衡定数KD値に対して200%未満

また、Rmaxを指標とした場合、以下の特徴をもつ抗体をいう。

30

2) EDTA共存下での、ヒトMMP-3との結合量を示すRmaxが、EDTA非共存下でのRmaxに対して70%以上

また、固相抗体に対するヒトMMP-3との結合量を吸光度として測定した場合、以下の特長をもつ抗体をいう

3) EDTA共存下における吸光度がEDTA非共存下での吸光度に対して80~120%。

抗体を結合させた担体同士の凝集度合いを指標とした場合、以下の特徴をもつ抗体をいう

4) 抗体を結合させた担体同士が凝集反応を起こすことによって凝集する反応性が、EDTA存在下における凝集シグナルがEDTA非存在下における凝集シグナルに対して80~120%。

40

なお、本発明の抗ヒトMMP-3モノクロナル抗体を作製する技術に関して特に制限はないが、マウスハイブリド-マを作製する方法が一般的である。また、本発明の抗ヒトMMP-3抗体調製後の遺伝子操作技術による構造改変や修飾に関して、該モノクロナル抗体のヒトMMP-3抗体のヒトMMP-3との反応特性を大きく損なわない限り特に制限はない。

## 【0009】

このような本発明の抗MMP-3モノクロナル抗体の具体例としてはFERMP-22219(82208)、FERMP-22131(82211)、FERMP-22132(82213)、FERMBP-11486(82216)、FERMP-22133(82245)であるハイブリド-マにより産生される、モノクロナル抗体が

50

挙げられる。

【 0 0 1 0 】

(モノクローナル抗体断片)

本発明には酵素的消化によって得られる該モノクローナル抗体のF a b部分を含む機能性断片や遺伝子組み換えによって作製される該モノクローナル抗体のF a b部分を含む機能性断片にかかわらず、該モノクローナル抗体に由来するF a b部分を含む機能性断片を有するものであれば利用できる。従って、本発明の機能性断片の「機能性」の意味は、具体的にはヒトMMP - 3との結合能を有することをいう。

【 0 0 1 1 】

(測定対象試料)

本発明で述べるEDTA(エチレンジアミン四酢酸)としては、一般に抗凝固剤として採血管に添加、塗布等され広く用いられている、ナトリウム塩やリチウム塩を挙げることができるが、これに限定されるものではない。また、本発明の免疫測定方法で測定可能な試料としては、従来法で測定できなかったEDTAを含有する試料、より具体的には抗凝固剤にEDTAを用いて採血されたEDTA血漿だけでなく、血液、血清、血漿、尿、関節液などの生体試料も測定可能である。

【 0 0 1 2 】

(ハイブリド-マ)

本発明の抗ヒトMMP - 3抗体を産生するために用いるハイブリド-マはヒトMMP - 3と特異的に反応し、かつEDTA共存下で高い反応性を有する抗MMP - 3抗体を産生できるハイブリド-マであればいずれでもよく、本発明の抗MMP - 3モノクローナル抗体は以下の工程1) - 4)を経て製造される。

工程1) 精製ヒトMMP - 3を免疫源として、抗ヒトMMP - 3抗体産生ハイブリド-マを取得する工程

工程2) 工程1)で取得したハイブリド-マが産生する抗体の中から、MMP - 3に対する反応性の高い抗体を選択する工程

工程3) 工程2)で取得した抗体について、EDTA共存下とEDTA非共存下それぞれのヒトMMP - 3に対する反応性を評価し、EDTA共存下とEDTA非共存下で反応性が同等のクローンを選択する工程。

工程4) 工程3)で選択されたハイブリド-マを取得する工程

このような選択工程を経て得られた抗体は、MMP - 3に特異的に反応し、かつEDTA共存下でもEDTA非共存下と同等の反応性を有する。

前記工程で選択された抗体として、例えばFERMP - 22219(82208)、FERMP - 22131(82211)、FERMP - 22132(82213)、FERMP - 11486(82216)、FERMP - 22133(82245)が産生する抗体が挙げられる。

【 0 0 1 3 】

(用途)

本発明のMMP - 3モノクローナル抗体を用いれば、試料中のEDTAの有無にかかわらず、MMP - 3濃度を正確に測定することが可能になる。

MMPファミリーは活性中心に亜鉛を配位し、構造の安定化にはカルシウムを必要とすることが知られている。MMP - 3にも4か所のカルシウム結合部位が存在し、カルシウムやEDTAが酵素活性に影響をおよぼすことが報告されている(非特許文献7)。これらの事実から、EDTAの影響を受けない抗MMP - 3抗体を作成することは不可能であると考えられており、実際にEDTAの影響を受けない免疫測定系は存在しなかった。

一価の抗原であるMMP - 3を、抗原抗体反応を用いたサンドイッチ法で定量するには少なくとも2種類の抗体を用いる必要があり、いずれか一方がEDTAの影響を受けやすかった場合、測定系としてもEDTAの影響を受けてしまう。EDTA共存下と、EDTA非共存下のヒトMMP - 3に対する抗体の反応性を評価する本発明によって、EDTA共存下でも非共存化でも同等の反応性を有する抗体を効率よく選別できるようになり、E

10

20

30

40

50

D T A 共存下で非共存化と同等の反応性を有する少なくとも2種類のクロ - ンのみを用いた測定系の構築が可能となった。このようにして、E D T A の影響を受けない免疫測定系を構築するに至った。

また本抗体を用いた免疫測定試薬では、E D T A 含有試料中のM M P - 3 濃度、たとえばE D T A 血漿も正確に測定することが可能となり、検体種を選ばないことから、慢性関節リウマチの臨床検査薬として用いるのに好適である。

【実施例】

【0014】

以下、抗M M P - 3 モノクローナル抗体の作製方法、該モノクローナル抗体のなかからE D T A の共存下でも非共存下でも同等の反応性を有する抗体の探索方法、及び、該抗体同士を組み合わせる免疫学的測定方法の例を挙げて本発明の一部を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0015】

【比較例1】

市販のヒトM M P - 3 測定キットを用いて、同一の健康人ドナ - より採取した血清、E D T A 血漿、ヘパリン血漿についてM M P - 3 濃度を測定した(表1)。使用したキットを以下に示す。

- 1 Enzyme linked Immunosorbent Assay Kit For Matrix Metalloproteinase 3 (USCN Life Science inc)
- 2 Blue Gene ELISA kits Human Stromelysin ST - 1 ELISA kit (Life Sciences Advanced Technologies Inc)
- 3 パナクリアM M P - 3 プレート(第一ファインケミカル株式会社)

【0016】

【表1】

<1>

検体No	Average		Max	Min	Range
	ng/mL	vs serum (%)			
Heparin plasma	60.0	102.6	135.4	23.7	111.7
EDTA plasma	31.4	53.7	77.8	8.9	68.9
Serum	58.4	100.0	87.1	28.2	58.9

<2>

検体No	Average		Max	Min	Range
	ng/mL	vs serum (%)			
Heparin plasma	43.2	113.2	54.7	33.5	21.2
EDTA plasma	54.8	143.7	62.7	42.8	19.9
Serum	38.2	100.0	42.0	31.4	10.7

<3>

検体No	Average		Max	Min	Range
	ng/mL	vs serum (%)			
Heparin plasma	66.1	94.6	117.1	22.5	94.6
EDTA plasma	36.1	51.6	68.2	10.6	57.6
Serum	69.9	100.0	131.4	23.6	107.8

キット 1、3 を用いた場合E D T A 血漿は低値化、キット 2 を用いた場合E D T A 血漿は高値化した。キット 1、3 は抗M M P - 3 抗体を用いたサンドイッチELISAを測定原理としており、抗体の反応性が低下すると、測定値が低値化すると考えられる。

一方キット 2 の測定原理は競合法であり、抗体の反応性が低下すると、測定値が高値化すると考えられる。



以上のことから、いずれのキットを用いても、EDTA血漿の値を正確に測定することはできないものと考えられた。

【0017】

〔比較例2〕既存試薬に使用している抗体での影響評価)

比較例1で測定値が低値化した試薬のうち、キット3 パナクリアMMP-3プレート(第一ファインケミカル)の製品キットを用いて、試薬中に用いられている固相抗体と標識抗体それぞれのEDTA共存下での反応性を以下の方法で検証した。

1) 固相抗体への影響評価

EDTA 0mM : MMP-3濃度既知試料を、製品キット中の緩衝液で(50、100、200 ng/mL)に希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。 10

EDTA 3mM : MMP-3濃度既知試料を、終濃度3mMとなるようEDTAを添加した製品キット中の緩衝液を用いて(50、100、200 ng/mL)に希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。

EDTA 30mM : MMP-3濃度既知試料を、終濃度30mMとなるようEDTAを添加した製品キット中の緩衝液を用いて(50、100、200 ng/mL)に希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。

上記サンプルを測定して得られた測定波長450nmの吸光度(OD450)について、下式に基づいてEDTA無添加に対するEDTA共存下での反応性(%)を算出し、抗体反応性を評価した(表2)。 20

EDTA共存下での抗体の反応性(%)

$$= \text{EDTA共存下でのOD450} \div \text{EDTA非共存下でのOD450} \times 100$$

EDTA共存下での反応性が非共存化での反応性に対して80%以上となった場合、同等と判断し、それ以下の場合はEDTAの影響を受けて反応性が低下すると判断した。

【0018】

【表2】

## 固相抗体への影響評価結果

固相抗体評価

MMP-3 濃度	EDTA濃度		
	0mM	3mM	30mM
50ng/mL	100.0	38.5	31.4
100ng/mL	100.0	31.4	25.7
200ng/mL	100.0	34.7	28.8

(%)

2) 標識抗体への影響評価

測定試料にはMMP-3濃度既知試料(50、100、200 ng/mL)を用い、製品キットの二次抗体を以下の手順で調製した以外は製品キットの添付資料記載の方法に従った。

EDTA 0mM : 酵素標識抗体液を、製品キット中の緩衝液で希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。

EDTA 3mM : 酵素標識抗体液を、終濃度3mMとなるようEDTAを添加した製品キット中の緩衝液を用いて希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。

EDTA 30mM : 酵素標識抗体液を、終濃度30mMとなるようEDTAを添加した製品キット中の緩衝液を用いて希釈し、そのほかの工程は添付文書記載の方法に従った。 40

上記二次抗体溶液を用いて測定して得られた測定波長450nmの吸光度(OD450)について、下式に基づいてEDTA無添加に対するEDTA共存下での反応性(%)を算出し、抗体反応性を評価した(表3)。

EDTA共存下での抗体の反応性(%)  
= EDTA共存下でのOD450 ÷ EDTA非共存下でのOD450 × 100  
EDTA共存下での反応性が非共存化での反応性に対して80%以上となった場合、同等と判断し、それ以下の場合はEDTAの影響を受けて反応性が低下すると判断した。

【0019】

【表3】

10

### 酵素標識抗体への影響評価結果

#### 酵素標識抗体 評価

MMP-3 濃度	EDTA濃度		
	0mM	3mM	30mM
50ng/mL	100.0	73.2	29.3
100ng/mL	100.0	70.9	23.1
200ng/mL	100.0	76.4	25.3

(%)

20

1)、2)の結果から、既存試薬に使用されている抗体は、EDTA添加によって、反応性は80%以下となり、いずれの抗体もEDTAの影響を受けて反応性が低下していることがわかった。

【0020】

(評価例1 MMP-3抗体の樹立)

1. 抗MMP-3モノクローナル抗体の作製

(1) ハイブリドーマの作製

a. 材料

- ・ヒトMMP-3: 正常ヒト線維芽細胞NB1RGB, 理研RCB, #RCB022 2の培養上清より精製
- ・フロインド完全アジュバント: 和光純薬工業社製, 014-09541
- ・ミエローマ細胞(SP2/O)
- ・RPMI1640, GlutaMAX: GIBCO社製, 61870-036
- ・Fetal Bovine Serum (FBS): BIOLOGICAL INDUSTRIES社製, 04-001-1A
- ・ポリエチレングリコール溶液(PEG): SIGMA, P7306
- ・HAT 培地: コスモバイオ社製, 16213004
- ・96穴プレート: NUNC, 167008
- ・HRP標識ヤギ抗マウスIgG( )抗体: Southern Biotech社製, 1030-05

30

40

【0021】

b. 方法

(動物への免疫)

ヒトMMP-3とフロインド完全アジュバントを等量ずつ混合して調製したエマルジョンを用い、オスのBALB/cマウスの腹腔もしくはフットパットに1匹あたり30μgを注射した。さらに、1週間の間隔で2~7回、該エマルジョンの注射を繰り返した。マウス眼底静脈より採血して得た抗血清中の抗体価を、後述する抗原固相化ELISA法にて測定した。

【0022】

50

(抗体価の確認(抗原固相化ELISA法))

上述のマウス抗血清中の抗MMP-3抗体の存在を、ヒトMMP-3を固相化したELISA法(抗原固相化ELISA法)で確認した。抗原固相化ELISA法の詳細は以下である。

まず、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようヒトMMP-3を、 $150\text{mM}$ 塩化ナトリウムを含む $10\text{mM}$ リン酸緩衝液( $\text{pH}7.2$ ;以下、PBSという)に溶解してMMP-3溶解液とし、該溶解液 $50\mu\text{L}$ を96穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、4で1晩静置した。

前記各ウェルを $0.05\%$  Tween(登録商標)20を含むPBS(以下、PBSTという) $300\mu\text{L}$ で3回洗浄した後、 $1\%$ 牛血清アルブミンを含むPBST(以下、BSA-PBSTという) $300\mu\text{L}$ を加え、室温で1時間ブロッキングを行った。

10

前記各ウェルをBSA-PBSTで3回洗浄した後、BSA-PBSTで10倍から100倍に希釈したマウス抗血清 $50\mu\text{L}$ を前記各ウェルに添加し、室温で1時間静置した。

前記各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、 $5000$ 倍希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG( )を $50\mu\text{L}$ 前記各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。

前記各ウェルをPBSTで3回洗浄した後、 $0.2\%$ オルトフェニレンジアミン及び $0.02\%$ 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液( $\text{pH}5.0$ ) $50\mu\text{L}$ を加え、室温で10分間放置後、 $4.5\text{N}$ 硫酸 $50\mu\text{L}$ を加えて酵素反応を停止させ、波長 $492\text{nm}$ における吸光度を測定した。測定の結果、抗体価の高かったマウスから、脾臓もしくはリンパ節を摘出して、脾臓由来細胞もしくはリンパ節由来細胞を調製し、細胞融合に用いた。

20

【0023】

(細胞融合)

前記脾臓由来細胞もしくはリンパ節由来細胞のいずれかとミエローマ細胞を細胞数で6対1の割合で混合し、PEGを添加して細胞融合させた。該融合させた細胞をHAT培地に懸濁し、 $\text{CO}_2$ インキュベータ内で $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ にて8日間培養して、融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。

【0024】

(2)ハイブリドーマの選別

(抗原固相化ELISA法での選別)

30

上述の抗原固相化ELISA法において、マウス抗血清の代わりに融合細胞の培養上清を用いた以外は、同様の方法を行った。測定の結果、吸光度の高いウェルを抗MMP-3抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル(陽性ウェル)として選択し、抗MMP-3抗体産生株を選抜した。

【0025】

(競合ELISA法での選別)

上述の抗原固相化ELISA法において、ヒトMMP-3を共存させて、競合ELISA法を行った。

測定の結果、吸光度の高いウェルを抗MMP-3抗体産生ハイブリドーマの存在するウェル(陽性ウェル)として選択し、抗MMP-3抗体産生株を選抜した。

40

上述の2種類の選別方法とともに抗MMP-3抗体産生株として選択されたハイブリドーマを用いて、ハイブリドーマの単クローン化とモノクローナル抗体の精製を行った。

【0026】

(3)モノクローナル抗体の精製

単クローン化は定法(限界希釈法)で行い、上述の2種類のELISA法と同様の方法で陽性ウェルを選別し、最終的に26種の抗MMP-3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。

各細胞の約 $10^5$ 個をプリスタン前処理したマウス腹腔に投与し、生成した腹水をそれぞれ採取した。採取した各腹水から遠心分離により不溶物を除去し、等量の飽和硫酸液を加え、攪拌しながら1晩放置後、遠心分離で沈殿を回収した。回収した沈殿を $20\text{mM}$

50

Tris 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、同緩衝液で透析した。透析内容物それぞれを同緩衝液で平衡化した DEAE-セファロースカラムに別個に吸着させた後、それぞれ同緩衝液中の塩化ナトリウム 0 ~ 300 mM の濃度勾配で溶出させて得た IgG 画分を 50 mM グリシン緩衝液で透析して、26 種の抗体を得た。

【0027】

(4) 抗体の組み合わせの評価

上記 26 種クローンのなかから、さらに以下の方法で、各抗体の組み合わせを評価した。

各クローンの抗 MMP-3 モノクローナル抗体を、2 µg/mL になるよう PBS に希釈して MMP-3 抗体液とし、該溶解液 50 µL を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、4 で 1 晩静置した。

前記各ウェルを PBST 400 µL で 3 回洗浄した後、BSA-PBST 100 µL を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。

BSA-PBST にて 100 ng/mL に希釈した抗原 50 µL を前記各ウェルに添加し、室温で 1 時間静置した。

前記各ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、あらかじめビオチン標識した各モノクローナル抗体を PBST で 1.5 µg/mL に希釈し、50 µL 前記各ウェルに分注して、室温で 1 時間静置した。

前記各ウェルを PBST で 3 回洗浄した後、0.2% オルトフェニレンジアミン及び 0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 5.0) 50 µL を加え、室温で 10 分間放置後、4.5 N 硫酸 50 µL を加えて酵素反応を停止させ、波長 492 nm における吸光度 (OD<sub>492</sub>) を測定した。このなかから OD<sub>492</sub> が 0.5 以上となる組み合わせが可能な 10 抗体を選別した。このとき吸光度を認めた組み合わせを表 4 に示す。

なお、各組み合わせについて、OD<sub>492</sub> が 0.2 以上: +、0.5 以上: ++、1.0 以上: +++ と判定した。

【0028】

【表 4】

樹立したモノクローナル抗体の組み合わせ評価結果

		液相									
		82201	82204	82205	82208	82209	82211	82212	82213	82216	82245
固相	82201	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
	82204	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
	82205	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	82208	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
	82209	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
	82211	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	82212	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
	82213	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
	82216	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	82245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0029】

(評価例 2 EDTA 共存下でも非共存下と同等の反応性を有する抗体の選別 (2 次抗体に市販ポリクローナル抗体を用いた評価))

2 µg/mL になるよう各クローンの抗 MMP-3 モノクローナル抗体を、PBS に希釈して MMP-3 抗体液とし、該溶解液 50 µL を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注して、4 で 1 晩静置した。

前記各ウェルを PBST 400 µL で 3 回洗浄した後、BSA-PBST 100 µL を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。

4000 ng/mL の抗原液を BSA-PBST、あるいは 3 mM EDTA を含む BSA-PBST で 400 ng/mL に希釈した抗原 50 µL を前記各ウェルに添加し、室温

で1時間静置した。

前記各ウェルをP B S Tで3回洗浄した後、0.2 μg/mLに調製したウサギ抗MMP-3ポリクローナル抗体(Santacruz sc6839-R)を50 μL前記各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。

3000倍希釈したHRP標識抗ウサギ抗体(BIO-RAD Laboratories, Inc Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate #172-1019)を50 μL前記各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。

前記各ウェルをP B S Tで3回洗浄した後、0.2%オルトフェニレンジアミン及び0.02%過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH5.0)50 μLを加え、室温で10分間放置後、1.5N硫酸50 μLを加えて酵素反応を停止させ、波長492 nmにおける吸光度OD492を測定した。

10

得られたOD492から、下式に基づいてEDTA共存下での抗体の反応性(%)を算出した。

$$EDTA \text{ 共存下での抗体の反応性 } (\%) = EDTA \text{ 共存下での } OD492 \div EDTA \text{ 非共存下での } OD492 \times 100$$

EDTA非共存下に対して80~120%の反応性の高い反応性を有したクローンは+、80%以下と反応性が低かったクローンは-と判定した(表5)。このなかでクローン82216、82245に関してはEDTA非共存下でも反応性を確認することができなかった。これらの抗体は市販のウサギポリクローナル抗体と抗原との反応性を妨害している可能性が考えられたため、該抗体を含め引き続き本発明のモノクローナル抗体同士を組み合わせたサンドイッチELISAにおけるEDTAの影響を評価した

20

【0030】

【表5】

各クローンに対するEDTAの影響評価結果(二次抗体に市販ポリクローナル抗体を用いた評価)

一次抗体	82201	82204	82205	82208	82209	82211	82212	82213	82216	82245
%	79.9	105.6	63.3	109.7	79.5	109.7	48.0	109.5	n.d.	n.d.
反応性	-	+	-	+	-	+	-	+	n.d.	n.d.

30

n.d. not detect

- + EDTA存在下で反応性が同等の抗体
- EDTA存在下で反応性が低下する抗体

【0031】

(評価例3 EDTA共存下でも非共存下と同等の反応性を有する抗体の選別(二次抗体にモノクローナル抗体を用いた評価))

) 固相状態でのEDTAの影響評価 一次スクリーニング 2

上記(評価例2)において、反応性を認めなかった抗体については、評価例1で示す、各モノクローナル抗体同士の事前検討で、サンドイッチELISAが成立した組み合わせの抗体を用いて再評価した。

40

具体的な方法としては、評価例2で用いたウサギ抗MMP-3ポリクローナル抗体を、評価クローンとサンドイッチが形成できるクローン(ここでは82208、82211、82213を使用した)に置き換えた以外は、(評価例2)と同様にした。

82216、82245はいずれもEDTA共存下で非共存下と同等の反応性を有することを確認した。

【0032】

## 【表6】

各クローンに対するEDTAの影響評価（二次抗体にモノクローナル抗体を用いた評価）

抗原濃度20ng/mL(400ng/mLを20倍希釈)  
評価抗体:82216

2次抗体	82208	82211	82213
%	85.2	97.3	95.5
反応性	+	+	+

抗原濃度200ng/mL  
評価抗体:82245

2次抗体	82208	82213
%	103.2	106.8
反応性	+	+

- + EDTA存在下で反応性が同等の抗体  
- EDTA存在下で反応性が低下する抗体

## 【0033】

〔実施例、比較例〕

以上の評価結果に基づき、サンドイッチが成立し、かつEDTAの影響を受けにくい抗体同士を組み合わせ、同一の健常人ドナ - から採取した血清、血漿（ヘパリン、EDTA）ペア検体を測定した。血清検体の測定値と、血漿検体の測定値から、次式に基づいて対血清測定値比（%）を算出した。なお、測定値比（%）が80%～120%の場合に測定が正確と判定した。

比較例1 82212抗体と82216抗体の組み合わせでは、対血清の測定値比（%）が26.8 - 71.3%と、いずれの検体でも血漿測定値が低値化していることがわかる。一方実施例1 - 6で示すように、EDTA共存下とEDTA非共存化で反応性が同等の抗体同士を組み合わせ、対血清の測定値比は80～120%となり、血漿検体が正確に測定できていることがわかった。

以上のことから、評価例1 - 4で評価した方法で、EDTA共存下でEDTA非共存下と同等の反応性を有する抗体を選別し、このクローンを組み合わせ、測定系を用いることで、EDTA含有試料でも正確に測定値が得られることが確認できた。

## 【0034】

【表7】

血清EDTA血漿ペア検体測定時のEDTA血漿の対血清測定値比  
実施例1 - 6、及び比較例

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	比較例1
1次抗体	82208	82211	82213	82216	82213	82245	82212
2次抗体	82216			82213	82245	82213	82216
検体1	82.3%	101.4%	81.7%	104.0%	103.7%	104.0%	71.3%
検体2	82.6%	94.7%	83.7%	114.2%	89.0%	112.8%	26.8%
検体3	100.0%	100.0%	101.9%	117.1%	101.2%	108.2%	42.9%
検体4	89.3%	104.1%	98.6%	112.4%	102.1%	106.9%	55.6%
検体5	87.1%	95.2%	96.7%	116.4%	105.7%	106.4%	48.5%

## 【0035】

〔評価例4〕 BIA法（Biacore）を用いた生体分子間相互作用の解析

上記実施例及び比較例に用いた抗体について、生体分子間相互作用解析法をもちいて、EDTA共存下及び非共存下での、各モノクローナル抗体とMMP - 3抗原とのアフィニティについて評価した

測定にはBiacore T100（GE Healthcare）を用いた。Hum

10

20

30

40

50

an Antibody Capture Kitの推奨プロトコルに従って、抗ヒトIgG抗体をSensor Chip CM5に固定化し、測定に使用した。

10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.005% Tween 20からなるHBS緩衝液、あるいは3mM EDTAを含むHBS緩衝液をランニングバッファとして、以下の方法で抗体のKD値を算出した。まず、HBSで5µg/mLに調製した各モノクローナル抗体マイクロ流路系に流し、固定化した抗IgG抗体にキャプチャさせた。

引き続きランニングバッファで0、2.5、5µg/mLに調製したMMP-3抗原をマイクロ流路系に流し、抗MMP-3抗体にキャプチャさせた。このときの表面プラズモン共鳴RUを測定、結合測定定数ka、Rmaxを測定した。引き続き、ランニングバッファのみを流し、キャプチャさせた抗原をしばらく遊離させ、解離速度定数kd値を算出した。描かれたセンサグラムから、抗体-抗原の解離定数KD値を次式に基づき算出した。

$$KD = kd / ka$$

なお、このka、kd、KD、RmaxはBiacore T100にて自動算出される。この際、必要となるMMP-3の分子量については、潜在型MMP-3の分子量57,000に設定した。その後再生バッファを流して、チップを再生し、チップは繰り返し使用した。

このようにしてえられた、EDTA非共存下とEDTA共存下でのそれぞれのKDとRmaxから、次式の通り、EDTA共存下での非共存下に対する割合を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{EDTA共存下での非共存下に対する割合} \% \\ & = \text{各EDTA濃度での値} \div \text{EDTA非共存下での値} \times 100 \end{aligned}$$

抗体のアフィニティの強さを示すKD値と、抗原の結合量を示すRmaxの、EDTA無添加に対するEDTA添加時の割合がそれぞれ200%未満、65%以上のとき、その抗体はEDTA共存下で同等の反応性を示すと判断した。結果を表8に示す。

【0036】

【表8】

EDTA無添加時に対するEDTA添加時のKD値とRmaxの相対比

	KD		Rmax		総合判定	評価例2、3 判定結果
	(対0mM%)	判定	(対0mM%)	判定		
82201	265.2%	-	47.1%	-	-	-
82204	178.8%	+	83.4%	+	+	+
82205	98.7%	+	27.6%	-	-	-
82208	112.4%	+	76.0%	+	+	+
82209	428.4%	-	67.0%	+	-	-
82211	90.5%	+	65.4%	+	+	+
82212	1193.9%	-	58.5%	-	-	-
82213	109.8%	+	78.5%	+	+	+
82216	77.6%	+	81.9%	+	+	+
82245	109.6%	+	84.1%	+	+	+

- + EDTA存在下で反応性が同等の抗体
- EDTA存在下で反応性が低下する抗体

この判定結果は評価例2、3での評価結果と合致する結果となり、EDTA非共存下とEDTA共存下で反応性が同等の抗体は、

- 1) EDTA共存下での、ヒトMMP-3との反応平衡定数KD値が、EDTA非共存下での反応平衡定数KD値に対して200%未満。
- 2) EDTA共存下での、ヒトMMP-3との結合量を示すRmaxが、EDTA非共存下でのRmaxに対して65%以上。

と特徴付けられることを確認した。

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明のモノクローナル抗体は、EDTA共存下におけるヒトMMP-3と反応性を指標に選択されるため、EDTA含有試料中でも正確にMMP-3濃度を定量することが可能となる。

また、本発明のモノクローナル抗体により、EDTA含有試料、たとえばEDTA血漿中のMMP-3濃度を正確に定量するヒトMMP-3の免疫凝集測定試薬及び測定キットを提供する。

本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫学的測定方法、免疫学的測定試薬、測定キットでは、1試薬で血清、ヘパリン血漿、EDTA血漿のMMP-3濃度を正確に測定することができるようになり、慢性関節リウマチの臨床診断薬としてより正確なMMP-3測定値を提供することが可能となる。

【受託番号】

【0038】

[寄託生物材料への言及]

(1) 82208抗体を産生するハイブリドーマ82208

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成24年1月27日(2012年1月27日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERMP-22219(82208)

(2) 82211抗体を産生するハイブリドーマ82211

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成23年6月16日(2011年6月16日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERMP-22131(82211)

(3) 82213抗体を産生するハイブリドーマ82213

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成23年6月16日(2011年6月16日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERMP-22132(82213)

(4) 82216抗体を産生するハイブリドーマ82216

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央6(郵便番号305-8566)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成22年4月27日(2010年4月27日)(原寄託日)

平成24年5月25日(2012年5月25日)(原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERMBP-11486(82216)

10

20

30

40

50



( 5 ) 8 2 2 4 5 抗体を産生するハイブリドーマ 8 2 2 4 5

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央 6 ( 郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6 )

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成 2 3 年 6 月 1 6 日 ( 2 0 1 1 年 6 月 1 6 日 )

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

F E R M P - 2 2 1 3 3 ( 8 2 2 4 5 )

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(72)発明者 高橋 弘至  
茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内  
(72)発明者 清水 知  
茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内  
(72)発明者 中村 靖  
茨城県龍ケ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2010/090079(WO,A1)  
特開平02-167097(JP,A)  
国際公開第2012/115221(WO,A1)  
米国特許出願公開第2003/0032164(US,A1)  
特表2007-528868(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )