

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-206393

(P2014-206393A)

(43) 公開日 平成26年10月30日(2014.10.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 4
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	4 B O 6 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	4 H O 4 5
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/40	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-82540 (P2013-82540)
 (22) 出願日 平成25年4月10日 (2013.4.10)

(71) 出願人 390037327
 積水メディカル株式会社
 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
 (74) 代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所
 (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
 (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
 (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) 【要約】

【課題】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。

【解決手段】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ー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ー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。

【選択図】なし

【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 非共存下と同等の反応性を有する抗 MMP - 3 モノクロー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 非共存下と同等の反応性を有する抗 MMP - 3 モノクローナル抗体が、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。

10

【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 - 22131 (82211)、FERMP - 22132 (82213)、FERMBP - 11486 (82216)、FERMP - 22133 (82245) からなる群より選ばれるハイブリドー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。

20

【請求項 6】

試料が EDTA 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 MMP - 3 を測定する測定試薬および測定試薬キット。

【請求項 8】

EDTA 共存下において EDTA 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 MMP - 3 モノクローナル抗体。

30

【請求項 9】

EDTA 共存下において EDTA 非共存下と同等のヒト MMP - 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請求項 8 記載の抗 MMP - 3 モノクローナル抗体。

(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

40

【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 MMP - 3 モノクローナル抗体。

工程 1 : MMP - 3 を免疫源として、非ヒト動物に免疫する工程

工程 2 : MMP - 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 MMP - 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、EDTA 共存下と EDTA 非共存下それぞれの条件におけるヒト MMP - 3 に対する反応性を評価し、EDTA 共存下と ED

50

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

【請求項 1 1】

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。

【請求項 1 2】

請求項 8 ~ 1 1 のいずれかに記載の抗 MMP - 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。

【請求項 1 3】

請求項 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

【請求項 1 4】

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 記載のハイブリド - マ。

【請求項 1 5】

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

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、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 MMP - 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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト MMP - 3 と特異的に反応し、かつ E D T A 共存下で E D T A 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 - 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 MMP s を活性化作用も有することから、関節リウマチ (R A) 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。

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、E D T A 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、E D T A 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

10

20

30

40

50

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。

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。

【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-3 Immunoassay (DMP300) (R&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, No 30 (1986) A Metalloproteinase from Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts that Digests Connective Tissue Matrix Components

【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。

【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

10

20

30

40

50

。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、E D T A 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、E D T A を含む試料中でもM M P - 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。

具体的には、本発明は以下の構成を有する。

<1>試料中のM M P - 3 を測定する方法であって、

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抗M M P - 3 モノクロナル抗体と試料中のM M P - 3 を接触させる工程を含む、測定方法。

<2>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抗M M P - 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、M M P - 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) 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

<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。

<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

<1 0>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。

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

<1 1>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。

10

20

30

40

50

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

<13>前記<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。

<14>FERMP-22219(82208)、FERMP-22131(82211)、FERMP-22132(82213)、FERMBP-11486(82216)、FERMP-22133(82245)である前記<8>又は<9>に記載のハイブリドマ。

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

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、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、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

【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モノクロー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、本発明のモノクロー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ー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。

【発明を実施するための形態】

【0008】

(抗ヒトMMP-3モノクローナル抗体)

本発明の抗ヒトMMP-3モノクローナル抗体は、ヒトMMP-3と特異的に反応する抗体である。抗ヒトMMP-3モノクロー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。

また、本発明の抗MMP-3モノクロー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。

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

10

20

30

40

50

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%。

なお、本発明の抗ヒトMMP-3モノクロー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、該モノクローナル抗体のヒト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モノクロー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、モノクローナル抗体が挙げられる。

【0010】

(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Fab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Fab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Fab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。

【0011】

(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。

【0012】

(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。

10

20

30

40

50

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

【0013】

(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、EDTA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種類のクロー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、EDTA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、EDTA含有試料中のMMP - 3濃度、たとえばEDTA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MMP - 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EDTA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MMP - 3測定キットを用いて、同一の健常人ドナ - より採取した血清、EDTA血漿、ヘパリン血漿についてMMP - 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MMP - 3プレ - ト(第一ファインケミカル株式会社)

【0016】

【表 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

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

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 EDTA 血漿は低値化、キット 2 を用いた場合 EDTA 血漿は高値化した。キット 1、3 は抗 MMP-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 0 mM : 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。

EDTA 3 mM : MMP-3 濃度既知試料を、終濃度 3 mM 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 30 mM : MMP-3 濃度既知試料を、終濃度 30 mM 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 450 nm の吸光度 (OD 450) 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)。

EDTA 共存下での抗体の反応性 (%)

$$= \text{EDTA 共存下での OD 450} \div \text{EDTA 非共存下での OD 450} \times 100$$

10

20

30

40

50

E D T A 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、それ以下の場合には E D T A の影響を受けて反応性が低下すると判断した。

【 0 0 1 8 】

【 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

(%)

10

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。

E D T A 0 m M : 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。

E D T A 3 m M : 酵素標識抗体液を、終濃度 3 m M となるよう E D T A 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。

E D T A 30 m M : 酵素標識抗体液を、終濃度 30 m M となるよう E D T A 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。

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

20

E D T A 共存下での抗体の反応性 (%)

= E D T A 共存下での O D 450 ÷ E D T A 非共存下での O D 450 × 100
E D T A 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、それ以下の場合には E D T A の影響を受けて反応性が低下すると判断した。

30

【 0 0 1 9 】

【 表 3 】

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

(%)

40

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

【 0 0 2 0 】

50

(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 NB 1 R G B , 理研 R C B , # R C B 0 2 2 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 , 0 1 4 - 0 9 5 4 1
- ・ミエローマ細胞 (S P 2 / O)
- ・R P M I 1 6 4 0 , G l u t a M A X : G I B C O 社製 , 6 1 8 7 0 - 0 3 6
- ・F e t a l B o v i n e S e r u m (F B S) : B I O L O G I C A L I N D U S T R I E S 社製 , 0 4 - 0 0 1 - 1 A
- ・ポリエチレングリコール溶液 (P E G) : S I G M A , P 7 3 0 6
- ・H A T 培地 : コスモバイオ社製 , 1 6 2 1 3 0 0 4
- ・9 6 穴プレート : N U N C , 1 6 7 0 0 8
- ・H R P 標識ヤギ抗マウス I g G () 抗体 : S o u t h e r n B i o t e c h 社製 , 1 0 3 0 - 0 5

10

【 0 0 2 1 】

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 B A L B / c マウスの腹腔もしくはフットパットに 1 匹あたり 3 0 μ g 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 E L I S A 法にて測定した。

20

【 0 0 2 2 】

(抗体価の確認 (抗原固相化 E L I S A 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 E L I S A 法 (抗原固相化 E L I S A 法) で確認した。抗原固相化 E L I S A 法の詳細は以下である。

まず、1 μ g / m L になるようヒト MMP - 3 を、1 5 0 m M 塩化ナトリウムを含む 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2 ; 以下、P B S という) に溶解して MMP - 3 溶解液とし、該溶解液 5 0 μ L を 9 6 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。

30

前記各ウェルを 0 . 0 5 % T w e e n (登録商標) 2 0 を含む P B S (以下、P B S T という) 3 0 0 μ L で 3 回洗浄した後、1 % 牛血清アルブミンを含む P B S T (以下、B S A - P B S T という) 3 0 0 μ L を加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った。

前記各ウェルを B S A - P B S T で 3 回洗浄した後、B S A - P B S T で 1 0 倍から 1 0 0 倍に希釈したマウス抗血清 5 0 μ 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 P B S T で 3 回洗浄した後、5 0 0 0 倍希釈した H R P 標識ヤギ抗マウス I g G () を 5 0 μ L 前記各ウェルに分注し、室温で 1 時間静置した。

40

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 . 0 2 % 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (p H 5 . 0) 5 0 μ L を加え、室温で 1 0 分間放置後、4 . 5 N 硫酸 5 0 μ L を加えて酵素反応を停止させ、波長 4 9 2 n m 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。

【 0 0 2 3 】

(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、P E G を添加して細胞融合させた。該融合させた細胞を H A T 培地

50

に懸濁し、CO₂インキュベータ内で37℃、5%CO₂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)

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。

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10⁵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20mM Tris緩衝液（pH8.0）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0~300mMの濃度勾配で溶出させて得たIgG画分を50mM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、2μg/mLになるようPBSに希釈してMMP-3抗体液とし、該溶解液50μL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PBST400μLで3回洗浄した後、BSA-PBST100μLを加え、室温で1時間ブロッキングを行った。

BSA-PBSTにて100ng/mLに希釈した抗原50μL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1.5μg/mLに希釈し、50μL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（pH5.0）50μLを加え、室温で10分間放置後、4.5N硫酸50μLを加えて酵素反応を停止させ、波長492nmにおける吸光度（OD492）を測定した。このなかからOD492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、OD492が0.2以上：+、0.5以上：++、1.0以上：+++と判定した。

【0028】

10

20

30

40

50

【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	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10

【 0 0 2 9 】

(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ナルの抗 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 PBST 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 (Santa Cruz 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 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、1.5 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 OD₄₉₂ を測定した。

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 共存下での抗体の反応性 (%)

$$= \text{EDTA 共存下での OD}_{492} \div \text{EDTA 非共存下での OD}_{492} \times 100$$

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ナルは +、80% 以下と反応性が低かったクローナルは - と判定した (表 5)。このなかでクローナル 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いサンドイッチ ELISA における EDTA の影響を評価した

【 0 0 3 0 】

50

【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.

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】

10

（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。

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。

20

【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	+	+	+

30

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】

40

〔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。

50

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 - ンを組み合わせた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。

【 0 0 3 4 】

【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%

10

【 0 0 3 5 】

(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 - 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

20

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

10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、0.005% Tween 20 からなる HBS 緩衝液、あるいは 3 mM 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 5 µg/mL に調製した各モノクロ - 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、5 µg/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 k_a 、 R_{max} 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 k_d 値を算出した。描かれたセンサ - グラムの形状から、抗体 - 抗原の解離定数 KD 値を次式に基づき算出した。

30

$$KD = k_d / k_a$$

なお、この k_a 、 k_d 、KD、 R_{max} 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。

40

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 R_{max} 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 R_{max} 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。

【 0 0 3 6 】

50

【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)

10

20

30

40

50

- 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
 F E R M P - 2 2 1 3 1 (8 2 2 1 1)
 (3) 8 2 2 1 3 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)
- 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) 10
- 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 2 (8 2 2 1 3)
 (4) 8 2 2 1 6 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)
- 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) 20
- 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 B P - 1 1 4 8 6 (8 2 2 1 6)
 (5) 8 2 2 4 5 抗体を産生するハイブリドーマ82245
- 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)
- 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
 F E R M P - 2 2 1 3 3 (8 2 2 4 5) 30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 2

(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

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB04 AC14 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	mmp-3的测量方法		
公开(公告)号	JP2014206393A	公开(公告)日	2014-10-30
申请号	JP2013082540	申请日	2013-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	片岡智恵 浅見麻里恵 平山明義 高橋弘至 清水知 中村靖		
发明人	片岡 智恵 浅見 麻里恵 平山 明義 高橋 弘至 清水 知 中村 靖		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/531 C07K16/40 C12P21/08 C12N5/10		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/531.B C07K16/40 C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/10 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
其他公开文献	JP6188390B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种免疫分析方法，免疫分析试剂和免疫分析试剂盒，用于准确测定含有EDTA的试样中的MMP-3浓度。解决方案：已经发现在EDTA存在下并且在不存在EDTA的情况下具有相同反应性的单克隆抗体可以通过在EDTA存在下和在不存在EDTA作为指标时使用抗体的反应性来具体选择并完成了本发明。通过组合在这样选择的EDTA共存下具有与不存在EDTA相同的反应性的单克隆抗体，可以准确地测定MMP-3可以测量浓度。

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