

平成 26 年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「血管炎バイオマーカー測定キット ANCA-Fast の開業医むけ普及品開発」

研究開発成果等報告書

平成 28 年 11 月

担当局 関東経済産業局
補助事業者 国立大学法人千葉大学

目 次

第1章 研究開発の概要

| | | |
|-----|------------------|----|
| 1-1 | 研究開発の背景・研究目的及び目標 | 1 |
| 1-2 | 研究体制 | 8 |
| 1-3 | 成果概要 | 9 |
| 1-4 | 当該研究開発の連絡窓口 | 11 |

第2章 本論

| | | |
|-----|-----------------------------|----|
| 2-1 | 抗原と標準抗体の調製 | 12 |
| 2-2 | 抗原プリントライン制御により検出シグナル視認性の最適化 | 15 |
| 2-3 | キットのハウジングの最適化設計 | 16 |
| 2-4 | 販路拡大の推進 | 17 |

| | | |
|-----|------|----|
| 最終章 | 全体総括 | 18 |
|-----|------|----|

| | | |
|----------|--|----|
| 専門用語等の解説 | | 19 |
|----------|--|----|

第1章 研究開発の概要

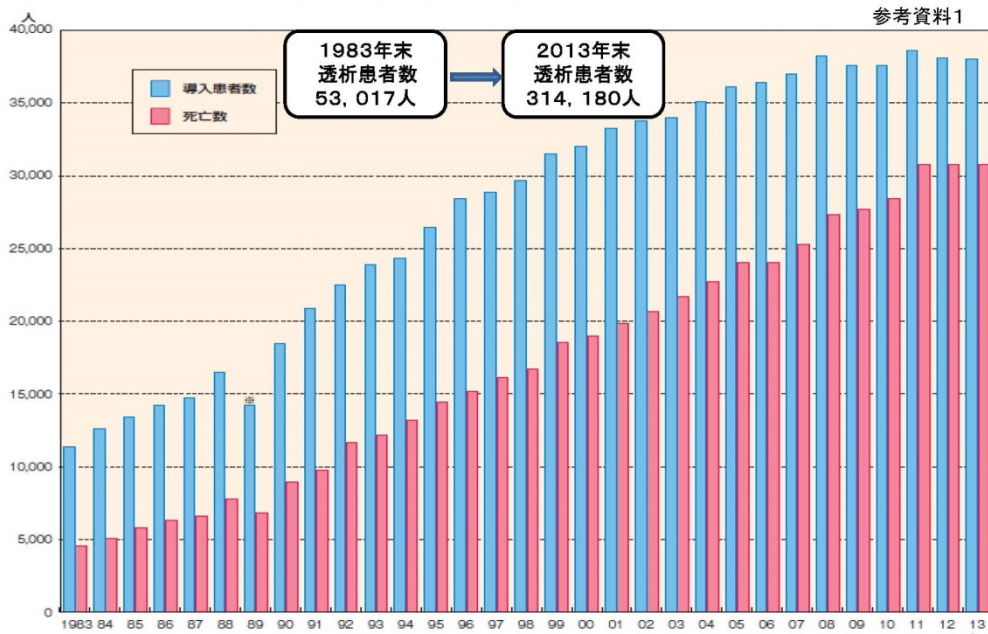
1-1 (1) 研究開発の背景・研究目的及び目標

【研究開発の背景】

難治性血管炎は「川崎病」、「高安動脈炎」、「側頭動脈炎」、「ビュルガー病」、「結節性多発動脈炎」、「顕微鏡的多発血管炎」、「多発血管炎性肉芽腫症（旧名：ウェジナー肉芽腫症）」、「好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（旧名：アレルギー性肉芽腫性血管炎）」、「悪性関節リウマチ」、「抗リン脂質抗体症候群」等多数の疾患を含む一部の臓器の血管が炎症を起こす疾患で、障害される臓器も多岐に渡るため、臨床からは腎臓専門医、リウマチ膠原病専門医、呼吸器専門医、循環器専門医、皮膚専門医、耳鼻咽喉専門医等、各専門医の診断によらなければ診断が難しい疾患である。中でも顕微鏡的多発血管炎は高齢者に多く発症し重篤な急速進行性糸球体腎炎（RPGN）となる。この病気は一般に馴染みがなく、罹りはじめの風邪様症状や微熱、手足のしびれなど市中の掛かり付け近医ではなかなか診断を付けることが困難な病気であり、診断がつかないまま数ヶ月すると重症化し最終的には人工透析の処置が必要となってしまう。重要なことは発病初期に現れる症状から直ちに確定的な診断が可能になれば、早期の対処が可能であり、重症化を防ぐことが出来る。現状では専門医が検査会社に検査を依頼して疾患マーカーを測定しており、数日から1週間を要し、患者負担も高額である。本開発研究では難治性血管炎の疾患マーカーである抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体、抗 moesin 抗体、抗 GBM 抗体の 4 種の自己抗体を簡便迅速に検出できるキットを安価に一般普及価格で生産することを目的としている。

わが国における人工透析患者の推移（厚生労働省 HP 資料より転載）

透析患者数、新規透析導入患者数、死亡患者数について



出典：我が国の慢性透析療法の現状（日本透析医学会）

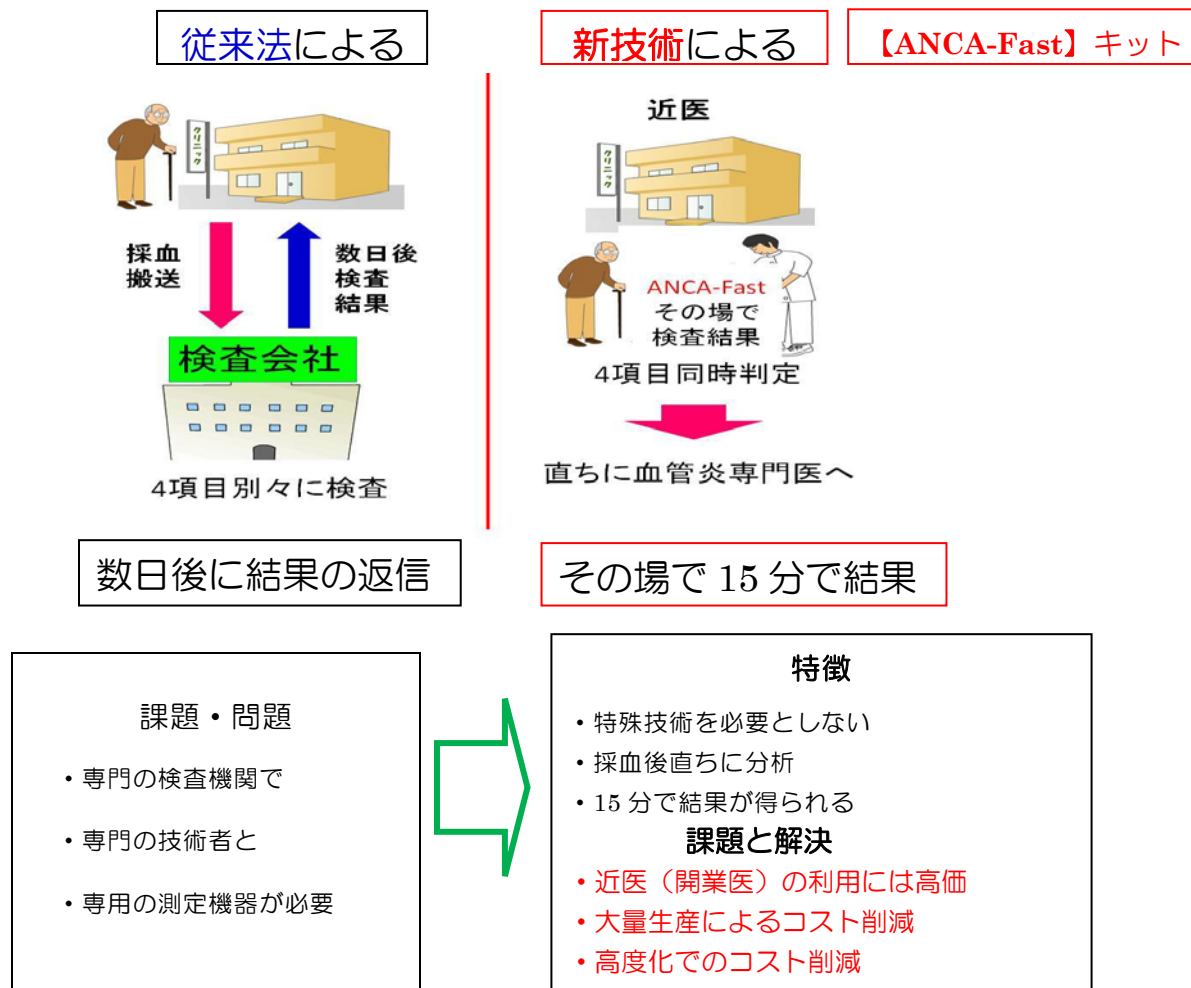
※：1989年の減少はアンケート回収率が86%と例外的に低かった事による見かけ上の影響（2013年は回収率99%）

現在、人工透析の患者は 35 万人に達しており、人工透析の処置は年間で一人 500 万円の医療費を必要とする高額医療で、人工透析に移行する患者を減らすことは医療経済上重要な課題である。高齢化社会を迎え高齢者の割合が増加している中で高齢者の生活の質の維持向上は社会的課題であり、これに貢献することを目標として本開発研究を行った

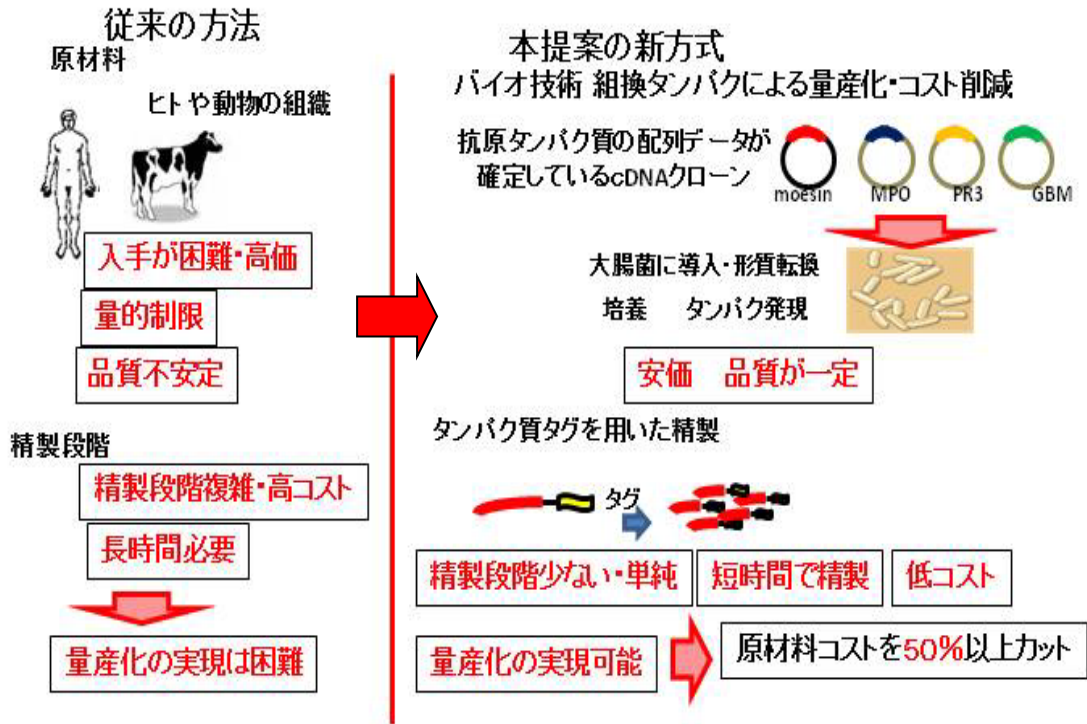
【研究目的及び目標】

当社が開発してきた難治性血管炎のバイオマーカー迅速測定法の 4 抗原(MPO, PR3, GBM, モエシン)を【バイオ】技術により組換えタンパクの大量生産と、高精度タンパクプリント技術により、0.1mm 幅のライン状に固定する。これにより、搭載抗原量を可視化判定できる最低量に最適化し、大量に安定供給することで、安価な普及価格で「開業医用普及型製品」として開発・製品化する。

血管炎のバイオマーカーについて】：従来法との比較



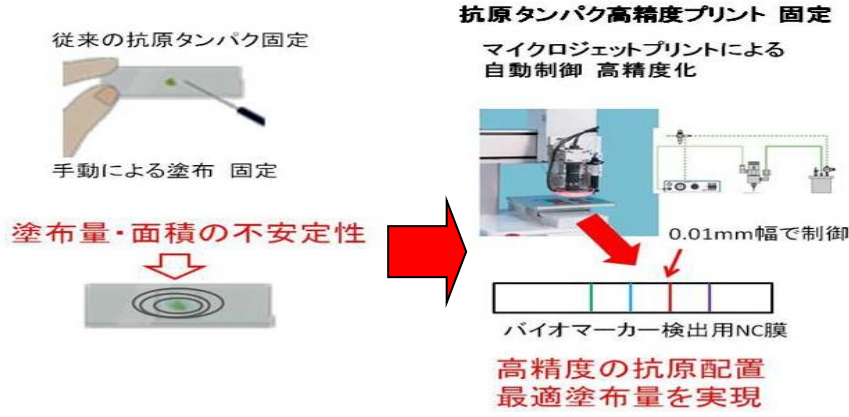
【1. 抗原と標準抗体の大量精製】：従来法との比較



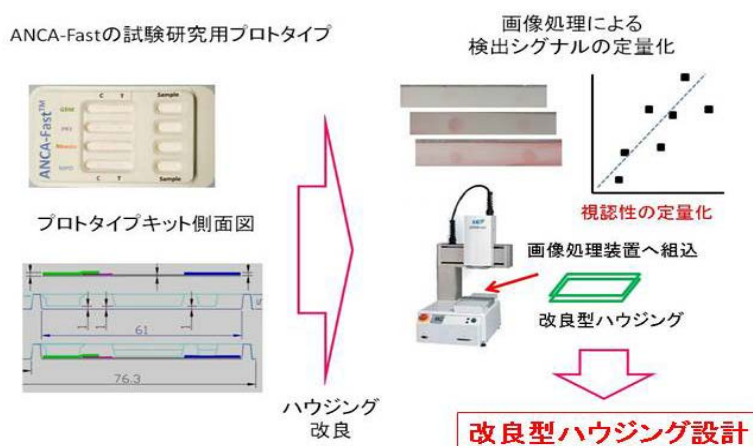
ヒト由来生体材料は入手が困難であり原材料として大量に使うことはできない。動物由来材料ではヒトと同一タンパクではないので結果の信頼性に欠ける。

組換タンパクを用いることによりヒト由来材料と全く同じ配列を持つタンパクを大量発現により安価に作成でき、精製段階も簡便化・低コスト化ができる。

【2. 高精度タンパクプリント技術による抗原タンパク質の検出膜へのプリント固定】：従来法との比較



【3. キットのハウジングの最適化設計】：従来法との比較



当社が開発してきた難治性血管炎のバイオマーカー迅速測定法の 4 抗原(MPO, PR3, GBM, モエシン)を【バイオ】技術を用いた組換えタンパク生産により大量生産し、原材料のコスト削減を図るとともに、高精度タンパクプリント技術により、0.1mm 幅のライン状に可視化判定を容易にできる最低量を固定する。これにより原材料のコスト削減、大量に安定供給することをめざし、安価な普及価格で「開業医用普及型」製品キットとして開発・製品化する。

【4. 販路開拓】：従来との比較

従来は医師を中心とした知人、友人の口コミを中心としていたが、関連学会などへの積極的に出展や、医師への啓発活動を通じて、販路開拓を狙う。

1-1 (2) 実施内容

1. 抗原と標準抗体の大量精製

【バイオ】技術である組換えタンパク生産による抗原タンパク質の大量生産と精製。モエシンなど4抗原の検出系の精度向上、抗モエシン抗体などなど4抗体の精製と実証試験抗原特異的標準抗体の作成および精製

2. 高精度プリント技術による抗原タンパク質の検出膜へのプリント固定

高精度高解像度プリント技術による検出膜への抗原プリント固定

3. キットのハウジングの最適化設計

病態マーカー検出に最適化された普及型ハウジング形成のための設計

4. 販路開拓

関係学会での展示、医師対象の啓発会議でのデモや宣伝で販路開拓をめざした。

5. プロジェクトの管理・運営（実施：国立大学法人：千葉大学大学院医学研究院）

事業管理機関・国立大学法人千葉大学大学院医学研究院において、本プロジェクトの管理を行う。プロジェクトの研究経緯と成果について取りまとめ、成果報告書 1 部及び電子媒体（CD-ROM）一式を作成する。

本研究の実用化に向けた到達の度合いを検証するとともに、事業化に向けての課題等について研究実施者と調整を行う。

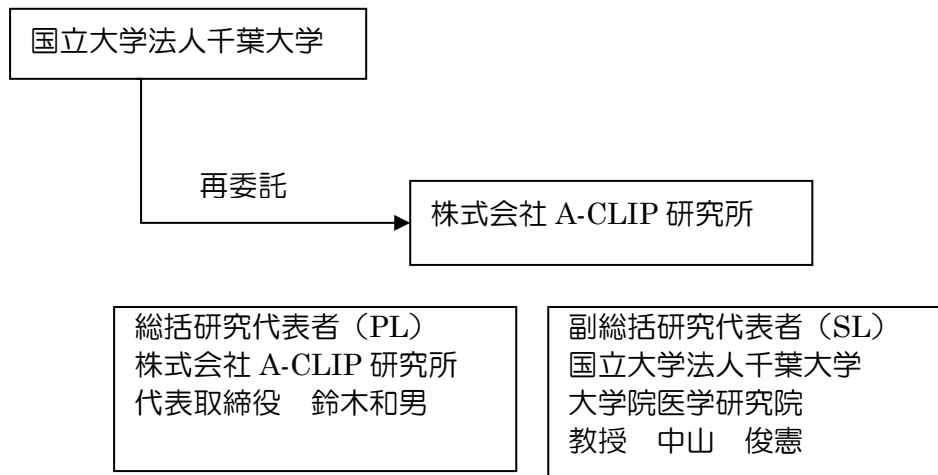
再委託先事業者が作成する証憑書類について、指導・確認を行う。

プロジェクト推進委員会を委託契約期間内に 年 1 回開催する。

1-2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

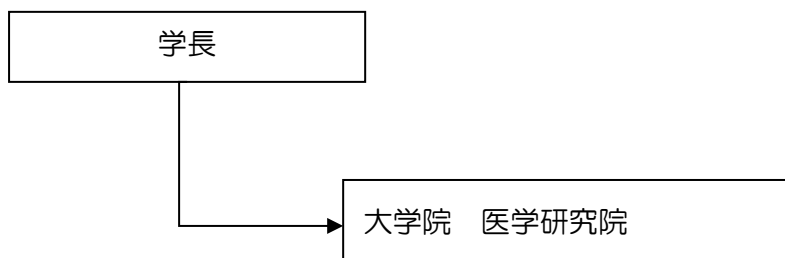
1) 研究組織 (全体)



2) 管理体制

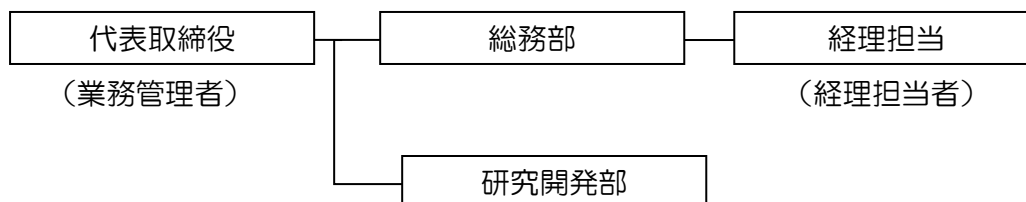
①事業管理機関

[国立大学法人 千葉大学]



②再委託先

[株式会社 A-CLIP 研究所]



(2) 研究員及びプロジェクト管理員 (実施内容(番号)は1-1 (3) 項参照)

【事業管理者】 国立大学法人千葉大学

①管理員

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容（番号） |
|-------|---------------------------|----------|
| 吉田 毅郎 | 学術国際部 研究推進課・ 競争的研究資金係長 | 5 |

【再委託先】

①研究員

株式会社 A-CLIP 研究所

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容（番号） |
|-------|--------------|----------|
| 鈴木 和男 | 研究開発部・代表取締役 | 4、統括 |
| 亀岡 洋祐 | 研究開発部・中央研究所長 | 1, 2, 3 |
| 山川 芳夫 | 研究開発部・研究員 | 1 |
| 長澤 呂良 | 研究開発部・研究員 | 1, 3 |
| 岡田 幸子 | 研究開発部・研究員 | 3 |

国立大学法人 千葉大学

| 氏名 | 所属・役職 | 実施内容（番号） |
|-------|-------------|----------|
| 中山 俊憲 | 大学院医学研究院・教授 | 2, 3 |

(3) 他からの指導・協力者

表1-2-1に示すプロジェクト推進委員、アドバイザー（指導・協力者）が参加する委員会を適宜開催した。

| 氏名 | 所属・役職 | 備考 |
|-------|--|----|
| 鈴木 和男 | 株式会社 A-CLIP 研究所・代表取締役 | PL |
| 中山 俊憲 | 国立大学法人千葉大学医学研究院・教授 | SL |
| 岡田 弘 | 独立行政法人中小企業基盤整備機構 関東本部 地域振興課 ものづくり支援チーフアドバイザー | |
| 湯村 和子 | 一般社団法人腎臓血管加齢医療研究機構 理事長 | |
| 牛田 雅之 | 国際医療福祉大学病院 教授 独立行政法人中小企業基盤整備機構千葉大 鼻インキュベーションプラザ・チーフイン キュベーションマネージャー | |

| | | |
|--------|-------------------------|--------|
| 亀岡 洋祐 | (株) A-CLIP 研究所・中央研究所長 | アドバイザー |
| 山川 芳夫 | (株) A-CLIP 研究所研究開発部・研究員 | |
| 長澤 呂良 | (株) A-CLIP 研究所研究開発部・研究員 | |
| 岡田 幸子 | (株) A-CLIP 研究所研究開発部・研究員 | |
| 久保河内 豊 | (株) A-CLIP 研究所・業務執行役員 | |
| 大下 幹登 | (株) A-CLIP 研究所・業務執行役員 | |
| 岡崎 富雄 | (株) A-CLIP 研究所・業務執行役員 | |
| 吉田 晋 | (株) A-CLIP 研究所・広島営業所長 | |

(注) PL : Project Leader、SL : Sub Leader

プロジェクト推進委員会開催状況

平成 26 年 9 月 19 日 (金)
 第一回プロジェクト推進委員会

平成 27 年 9 月 28 日 (月)
 第二回プロジェクト推進委員会

1-3 成果概要

- 1-1 バイオ技術による 4 抗原 (MPO、PR3、GBM、モエシン) の大量生産
MPO、PR3、GBM、モエシンの組換えタンパクの生産量 (従来 1L 培養から 1mg 以下) 達成目標を 1L 培養から 10mg を設定。
発現ベクター、標識タグの選定の組み合わせを最適化することにより、組換えタンパク発現条件を最適化することにより、10mg 以上を達成。
精製組換えタンパク回収 12.5mg/1L 培養 を実現。
- 1-2 大量生産された組換えタンパク質の高度精製
タンパク精製度 (従来 85%) の目標を 99.5%以上に設定
キレートクロマト、HPLC クロマトを組み合わせることにより、目標精製度を達成。
精製度を 85%から 99.5%に高精度を実現した。
- 1-3 4 抗原に対する標準抗体の細胞培養による大量精製
4 抗原に対する特異抗体の大量精製 (従来 0.01mg/10 万円) を目標 0.01mg/1000 円に設定。細胞培養からの抗体精製により、原価低減化を達成。0.01mg/10 万円をコスト 1 万円を達成した。
- 1-4 大量精製した 4 抗原および標準抗体の品質評価
品質評価 (従来 検出限界 200EU) 目標を検出限界 50EU/assay に設定。
高度精製タンパクの必要量搭載による特異抗体での検出限界を 200EU/assay を 50EU/assay にすることを達成。
- 2-1 抗原プリントライン制御により検出シグナル視認性の最適化
プリント精度 (従来 プリント精度 0.1mm) を 0.01mm 制御に設定。マイクロジェットプリンタを用いることにより高精度化。目標値ライン制御を 0.01mm を達成。
- 2-2 500 キット用のシートを作製 (大量化)
大量化 (従来 プリントシート 1 枚 70 キット分) の目標を 1 バッチでのプリントを 8 シートプリントに設定。
抗原タンパク大量精製実現により、1 バッチ目標シート数 8 枚 560 キット分を作成。
70 キット/1 回 を 8 シート作成に効率化し 560 キット/1 回を実現。
- 2-3 4 種抗原の検出膜上の配置による視認性向上 (高精度化)
視認性の向上 (従来 任意の抗原配置)
目標 抗原ラインの位置決定を改善し、高原ラインの位置を 0.01mm の制度で決めることにより視認性を向上した。ライン配置の最適化により視認性を 50%向上することを達成。
- 3-1 予備的パッケージングと検出シグナル目視確認の実証試験
パッケージ内でのシグナル目視試験 (従来 未実施) であたものを抗原ライン視認確認試験を実施。パッケージ内での検出試験を行い、視認性向上を確認実証した。
- 3-2 改良型ハウジングによる目視確認実証
改良型パッケージでの視認性確認 (従来 未実施) を行うことにより抗原ライン視認確認試験での視認性向上を実証した。

3-3 改良した普及型ハウジングの品質評価

改良型パッケージでの品質管理（従来 未実施）、パッケージセット 20 キットでの検出試験を実施。改良型パッケージで製品の組み上げを行い測定試験 20 回の品質評価。検出性能試験による品質管理試験の適合性を確認した。

4 販路拡大の推進

4-1 関係医学会系学会での展示

関係学会での製品モデルの展示（従来 未実施）を推進。日本リウマチ学会、腎臓学会に出展することを実現。

日本リウマチ学会、東部腎臓学会、MPO 研究会で開発中製品展示紹介した。

4-2 医師対象の啓発会議の開催

医師対象の啓発会議での製品開発発表（従来 未実施）を開催することを計画し、関係する専門医師を対象とした啓発会議を開催し、開発中製品の発表を年 2 回実施した。

* 特許出願： 1 件

出願番号：特願 2016-030085

出願日：平成 28 年 2 月 19 日

名 称：血管炎の検査方法

出願人：国立大学法人千葉大学、株式会社 A-C L I P 研究所、長村俊彦

発明者：鈴木和男、亀岡洋祐、山河芳夫、中山俊憲、長村俊彦

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 研究者

所属：株式会社 A-CLIP 研究所

役職・氏名：代表取締役 鈴木和男

連絡先：TEL:043-221-0831 FAX:043-221-0832

E-mail : officei@a-clip.jp

(2) 事業管理者

所属：国立大学法人千葉大学

役職・氏名：学術国際部 研究推進課 競争的研究資金係長 吉田毅郎

連絡先：TEL: 043-290-2042 FAX: 043-290-2038

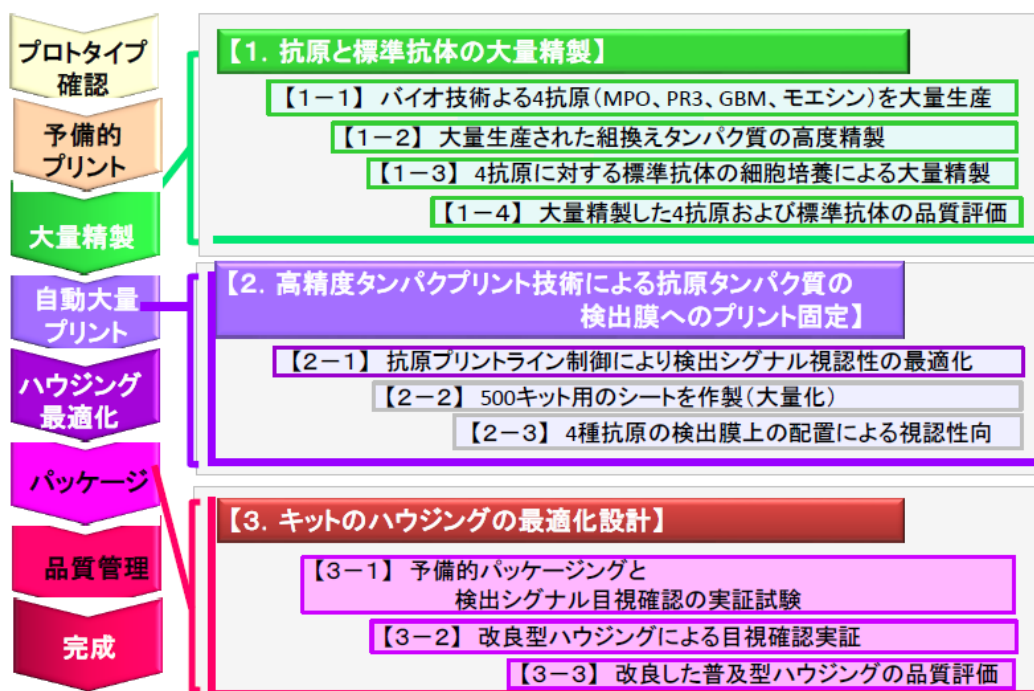
E-mail : kyoso@chiba-u.jp

第2章 本論

2-1 研究開発のフロー

本研究開発における研究開発課題のフロー図を以下に示す。

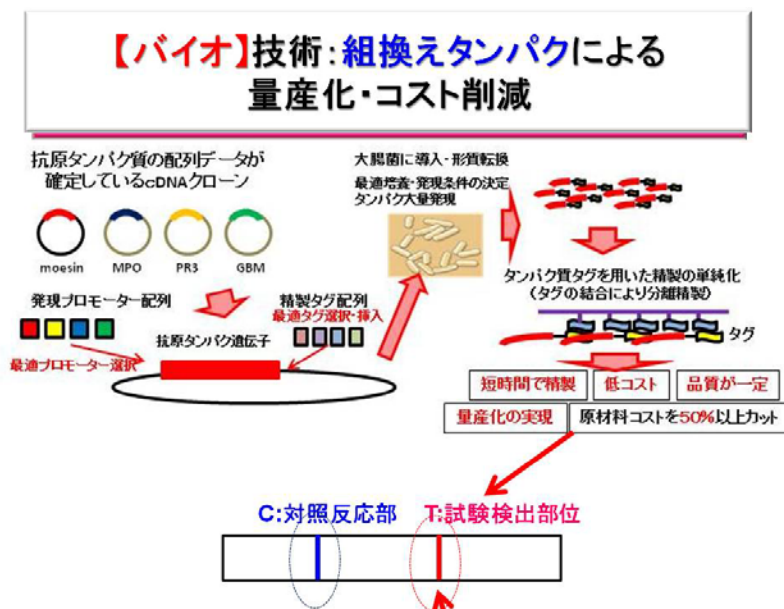
ANCA-Fast:「開業医用普及型の開発」フロー図



2-2 抗原と標準抗体の調製

【1. 抗原と標準抗体の大量精製】

宿主ベクター系の最適化、タンパク精製タグの最適化構築により MPO、PR3、GBM、モエシンの大量生産系を構築した。



【1-1】タンパク発言系最適化によるコスト低減化の実証を以下に示す。

低コスト化の実現 組換え抗原 生産原価計算

| | |
|-------------------|---------------|
| MPO HW 10mg | 生産原材料: |
| 培地1L | 200円 |
| グアニジン塩酸 | 500円 |
| 8M尿素 | 30円 |
| Nilレジ | 200円(装置減価償却含) |
| HPLCカラム | 25円(装置減価償却含) |
| 人件費(2人x3日) | 48000円 |
| 純度分析費用 (ゲル、抗体) | 3000円 |
| 機材消耗品 | 500円 |
| 合計 | 52530円 |
| 生産原価 | 1mgあたり 5253円 |

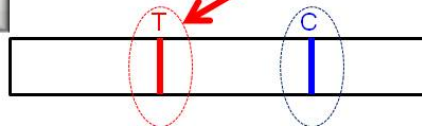
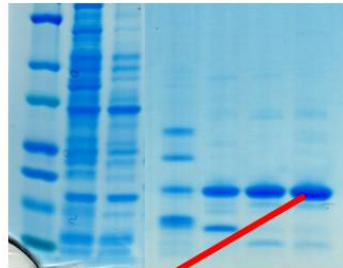
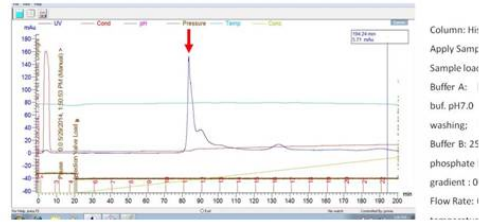
市販類似品(US)1mgあたり\$5000(600000円)
約100分の1に原材料調達費用削減を実現

【1-2】 精製方法の改善、簡便化によるコスト削減を実現し精製の高度化を実現した。

組換え体の精製の簡便化

- ・精製過程の単純化
- ・迅速な精製
- ・精製費用の低コスト実現

自動分取装置HPLCを利用した
高度化・簡素化



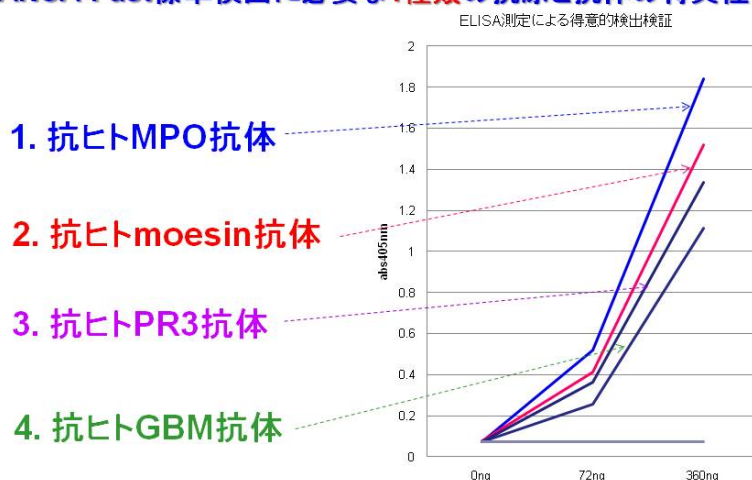
【1-3】 4 抗原に対する標準抗体の細胞培養による大量精製

MPO、PR3、GBM、モエシンに対する抗体の大量培養による生産を行い生成を行った。各抗原に対する標準抗体の目的収量を達成した。

【1-4】 大量精製した 4 抗原および標準抗体の品質評価

MPO、PR3、GBM、モエシンに対する抗体の反応性、抗原検出の評価を行い適正に検出できることを実証した。

ANCA-Fast標準検出に必要な4種類の抗原と抗体の特異性検証



2-1 抗原プリントライン制御により検出シグナル視認性の最適化

【2-1】 抗原プリントライン制御により検出シグナル視認性の最適化

検出抗原のメンブレン上への塗布量、密度の検証を行い適正化を実現した。塗布の方法、条件、液量、組成等は機密事項であるため記載できない。

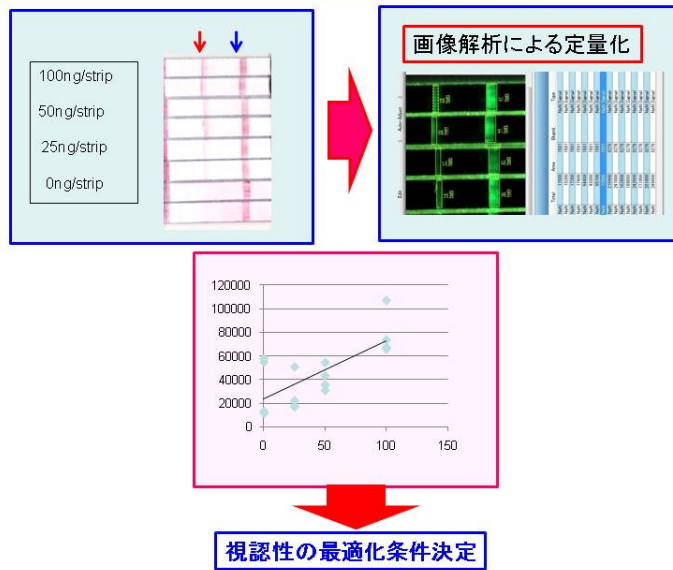
【2-2】 500 キット用のシートを作製（大量化）

大量化（従来 プリントシート 1 枚 70 キット分）の目標を1バッチでのプリントを 8 シートプリントに設定。抗原タンパク大量精製実現により、1バッチ目標シート数 8 枚 560 キット分を作成。70 キット/1回 を8シート作成に効率化し 560 キット/1回 を実現。

【2-3】 4 種抗原の検出膜上の配置による視認性向上（高精度化）

抗原ラインの位置決定を改善し、高原ラインの位置を 0.01mmの制度で決めることにより視認性を向上した。ライン配置の最適化により視認性を50%向上することを達成。

研究開発項目【2-3】4種抗原の検出膜上の配置による視認性向上(高精度化)
4種抗原の検出膜上の配置による視認性向上(高精度化)



【3-1】 予備的パッケージと検出シグナル目視確認の実証試験

パッケージ内でのシグナル目視試験（従来 未実施）であたものを抗原ライン視認確認試験を実施。パッケージ内での検出試験を行い、視認性向上を確認実証した。

【3-2】 改良型ハウジングによる目視確認実証

改良型パッケージでの視認性確認（従来 未実施）を行うことにより抗原ライン視認確認試験での視認性向上を実証した。

【3-3】 改良した普及型ハウジングの品質評価

改良型パッケージでの品質管理（従来 未実施）、パッケージセット 20 キットでの検出試験を実施。改良型パッケージで製品の組み上げを行い測定試験 20 回の品質評価。検出性能試験による品質管理試験の適合性を確認した。

研究開発項目【3-3】改良した普及型ハウジングの品質評価

ANCA-Fast普及型ハウジングの品質評価



【4-1】関係医学会系学会での展示

関係学会での製品モデルの展示（従来 未実施）を推進。日本リウマチ学会、腎臓学会、BioJapanに出展することを実現。
日本リウマチ学会、東部腎臓学会、MPO 研究会で開発中製品展示紹介した。

研究開発項目【4-1】関係医学会系学会での展示

ANCA-Fastの販路開拓・啓発活動

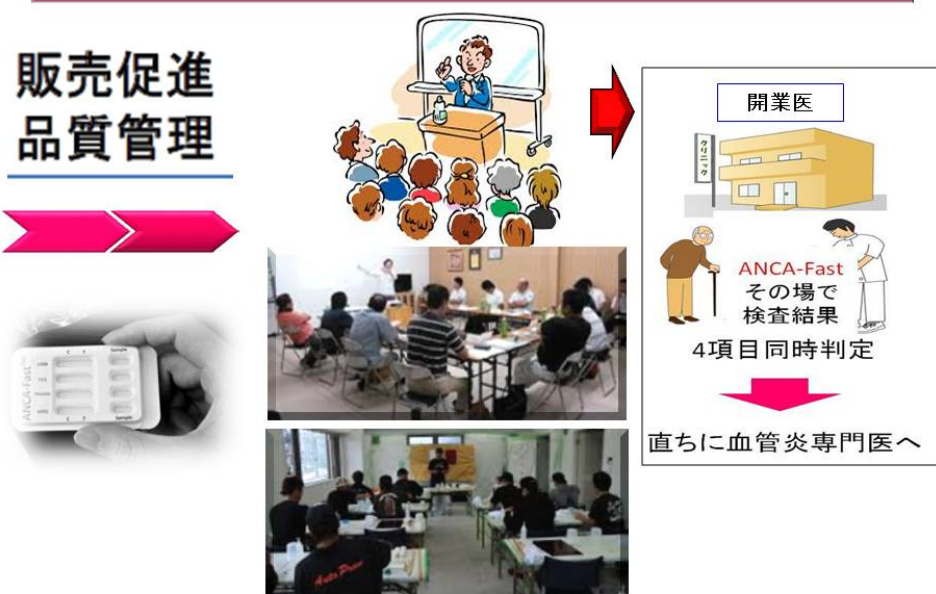


【4-2】医師対象の啓発会議の開催

医師対象の啓発会議での製品開発発表（従来 未実施）を開催することを計画し、関係する専門医師を対象とした啓発会議を開催し、開発中製品の発表を年2回実施した。

研究開発項目【4-2】販路開拓: 医師対象の啓発活動

ANCA-Fastの販路開拓・啓発活動



最終章 全体総括

株式会社 A-CLIP 研究所が開発した難治性血管炎バイオマーカー迅速検出キット「ANCA-Fast[®]」のコスト削減による一般普及製品の実現に向けて、国立大学法人千葉大学大学院医学研究院中山俊憲教授の指導協力により、搭載する 4 種の組換えタンパク抗原の生産精製技術の改良高度化を実現、宿主ベクター系、タンパクタグの最適化を行い高精度の液体クロマトグラフィーシステムを用いることによる精製過程の高度化・簡便化・低コスト化を目指した。その結果、従来法に比べて、検出キットに搭載する組換え抗原タンパクの生産コストを 100 分の 1 に低減化することを実現した。

研究開発テーマ 2 の検出メンブレンへの抗原タンパクの高精度の塗布条件を決定し、診断キットとして備えるべき検出性能の構築を達成することができ、大量生産の試験生産に十分な条件を実証した。

研究テーマ 3 では製品化の重要なポイントであるパッケージの形態と性能についての検討を重ね、キットの性能を左右するバイオマーカー検出時の検出判断が適正となる条件探索に成功し、その最適化を実現した。

研究テーマ 4 は製品化後の市場を確保するため市場拡大の取り組みとして、関係学会、BioJapan などの展示会での開発商品の紹介普及活動を行い、製品の知名度向上を図った。専門医、一般医師を対象とした川下ユーザーに直接製品を紹介する啓発会議を開催し診断薬として認可後の市場の実態を把握するとともに宣伝を行い、川下ユーザーの意見聴取もを行い、今後の製品開発に有効な助言等を収集することができた。

今後、難治性血管炎バイオマーカー迅速検出キット「ANCA-Fast[®]」の診断薬としての製品化及び事業化を進める基盤が十分に整った。

専門用語等の解説

1. 【ANCA】

白血球の一種の好中球に対する抗体（抗好中球抗体）。自己のタンパク質に対する数種類の自己抗体の略号で、難治性血管炎のバイオマーカーとして臨床検査に利用されている。

2. 【難治性血管炎】

全身のさまざまな血管に炎症が起こり、血管の流れが障害されて起こる特殊な病気の総称。様々な独立した疾患が含まれ、主に障害を受ける血管のサイズに関連している。大型血管炎としては巨細胞動脈炎（側頭動脈炎）、高安動脈炎、中型血管炎として結節性多発動脈炎、川崎病、小型血管炎として肉芽腫性多発血管炎（ウェゲナー肉芽腫）、チャージ・ストラウス症候群、顕微鏡的多発血管炎などが含まれる。

3. 【バイオマーカー】

病気の診断をする際に指標となる生体物質、血液検査項目に示されるものや、自己のタンパク質に対する抗体などの総称。

4. 【MPO】

ミエロペルオキシダーゼの略号。好中球の中に含まれ殺菌作用を示すときに働く酵素。

5. 【PR3】

プロテアーゼ3の略号。好中球が持っているタンパク質分解酵素で好中球の殺菌作用を示す時に働く酵素。

6. 【GBM】

腎臓の糸球体の基底膜タンパク質で 4 型コラーゲン A3 と同一タンパク、このタンパク質に対する自己抗体は糸球体腎炎のバイオマーカーとなっている。

7. 【モエシン】

血管内皮細胞に多く発現するタンパク質で細胞骨格を支えるタンパク質と考えられている。モエシンに対する自己抗体も血管炎のバイオマーカーとなっている。

8. 【ハウジング】

簡易検査キットなどで診断用の部材（血清を浸み込ませて反応させる等）を収納する容器。