

平成29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

「磁気分離法による大容量ペプチドライブラリー対応

自動ファージディスプレイ技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 関東経済産業局

補助事業者 よこはまティーエルオー株式会社

## 目 次

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	1
1-2 研究体制	6
1-3 成果概要	7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8
第2章 本論	9
2-1 高磁気応答性FGビーズの開発とモデルリガンドの固定化	9
2-2 $10^{13}$ スケールファージライブラリーの作製	10
2-3 濃縮条件の検討、最適化	10
2-4 自動化装置の開発	11
2-5 自動化装置の評価	18
第3章 全体総括	22
3-1 成果の総括と事業化・製品化への課題	22
3-2 事業化・製品化の見通し	23
3-3 新技術の展開	24
3-4 工業所有権の取得状況	24

## 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) 研究の背景

##### 【医薬品を取り巻く環境とバイオ医薬品】

従来、医薬品は有機合成により作製される比較的低分子量の合成化合物である飲み薬が中心であった。このような医薬品により高い治療効果が得られる疾患領域がある一方で、治療効果の得られない領域があるのも事実であり、低分子医薬にとどまらず、様々な範疇の医薬候補が提案され、有効性や安全性等の検証が行われた。そのひとつがバイオ医薬品である。世界の大型医薬品50品目に占めるバイオ医薬品の比率は5.6%（2005年）から34.0%（2011年）に上昇していることから明らかな様に、近年の医薬品開発はバイオ創薬が主流になってきている。またバイオ医薬品の中でも癌やアレルギー等の難治性疾患向けとして抗体医薬品やペプチド医薬品は副作用の少ない効果的な治療薬として注目されている。

##### 【抗体医薬品開発段階における抗体作製技術の推移】

抗体医薬品開発過程で、医薬品となる抗体の作製は重要であるが、その技術のひとつとして「モノクローナル抗体作製技術」があり、下記の手順でおこなわれる。

- ① マウスに抗原を投与し、脾臓より抗体産生細胞を分離する。
- ② この細胞はこのままでは長期培養することができないため、不死化させるためにミエローマと細胞融合する。
- ③ 融合したハイブリドーマから産生された抗体を精製し、モノクローナル抗体として使用する。

モノクローナル抗体は一つの細胞由来の抗体が得られるため、単一の抗体を大量に得ることができ、抗体を医薬品にするために最も適した手法であった。この画期的手法が開発されたことで、数多くのモノクローナル抗体の臨床応用が試みられたが、抗体を患者に投与するとマウス由来の抗体に対する抗体が作られ、人体に重篤な副作用が起きかねないことがわかった。

しかし、この問題はキメラ抗体若しくはヒト化抗体作製技術で解決された。抗体中に含まれるマウス由来の部位はそれぞれ、キメラ抗体では33%、ヒト化抗体では更に少ない10%となっており、投与された抗体に対する抗体の出現率が極めて低くなった。現在、上市されている抗体医薬品はこれら、キメラ抗体、ヒト化抗体である。

さらに、近年、完全にヒト由来のタンパクで構成された抗体を作製する技術が開発された。この技術により作製された抗体は、もちろんマウス由来の部位は0%である。完全ヒト抗体を作製する方法が「ファージディスプレイ法」である。この手法はマウス由来の部位は0%である抗体医薬品を、倫理的に問題となる動物を用いずに安価で短期間に作製することができる。また困難とされていた膜タンパクにも対応可能であることが特徴である。（表1）

表 1 抗体作製技術の比較

	従来の個体免疫法による抗体医薬品	ファージディスプレイ法による医薬品	
		抗体医薬品	ペプチド医薬品
用いる系	マウス	ファージ	ファージ
生命倫理的問題	高い	低い	低い
開発費用	高い(受託で1クローンあたり100万円)	安い(自前で1万円程度)	安い(自前で1万円程度)
クローン取得までの時間	長時間(最低で5ヶ月)	短時間(数週間)	短時間(数日~数週間)
合成難易度	高(動物細胞)	高(動物細胞) 中(大腸菌)	中(大腸菌) 低(化学合成)
その他	膜タンパクなどは抗体ができにくい	膜タンパクなどは抗体ができにくい	膜タンパクに対応可

【ファージディスプレイ法】

ファージディスプレイ法は、ランダムに生合成させたペプチド断片を、ファージの頭部に融合させ提示(ディスプレイ)したファージライブラリー(ペプチドライブラリー)の中から抗原(標的分子)に特異的に結合するペプチドを擁したファージを選択し、それを大腸菌で増殖させ濃縮する技術である。(図1)

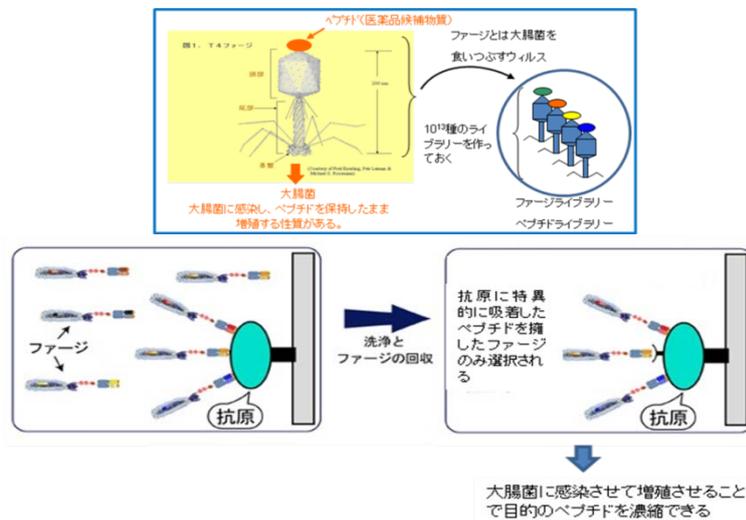


図1：ファージディスプレイ法の原理

7つのアミノ酸の配列を全てランダム化した場合のライブラリーサイズは  $10^9$  以上となることから、抗体の多様性に匹敵する程の多様性を確保することができる。このことは、従来の化合物ライブラリーの多様性が数万程度 ( $\sim 10^5$ ) であることから比較にならないほどの数と言える。そのことから、従来の化合物医薬品では困難とされていた癌やアレルギー等の難治性疾患の医薬品候補(標的分子に結合する特異性、親和性が高いペプチド)が獲得できる。ま

た、スクリーニング操作にかかる時間も化合物スクリーニングに比べて圧倒的に速く、数日あれば標的分子に結合するペプチドを同定することができる。

近年の創薬においてより良い標的分子を特定することが重要であり、そのためプロテオミクス解析が盛んに行われている。プロテオミクス解析には抗体が不可欠であり、本研究のファージディスプレイ法の自動化により従来に比べ良い抗体が早く入手でき、創薬研究のスピードアップが可能になる。

なお、ファージディスプレイ法によるペプチドの濃縮は、あくまで探索（オミックス情報収集）の範疇である。抗体医薬品の製造は、濃縮されたペプチドから得られた情報に基づき特定の抗体を作製し細胞培養により大量に製造し、ペプチド医薬品においては濃縮されたペプチドから得られた情報を基にペプチドを合成して製造する。（図2、3）

### ○抗体医薬品開発におけるファージディスプレイ法

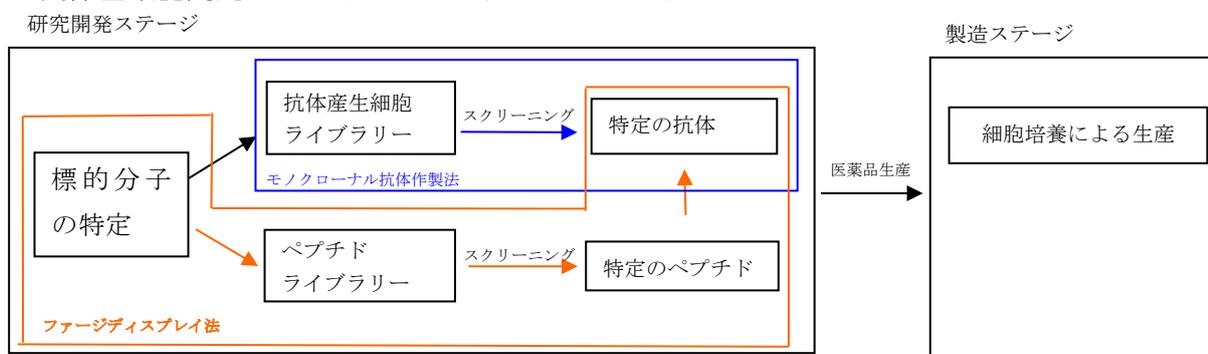


図2 抗体医薬品開発・製造工程

### ○ペプチド医薬品開発におけるファージディスプレイ法

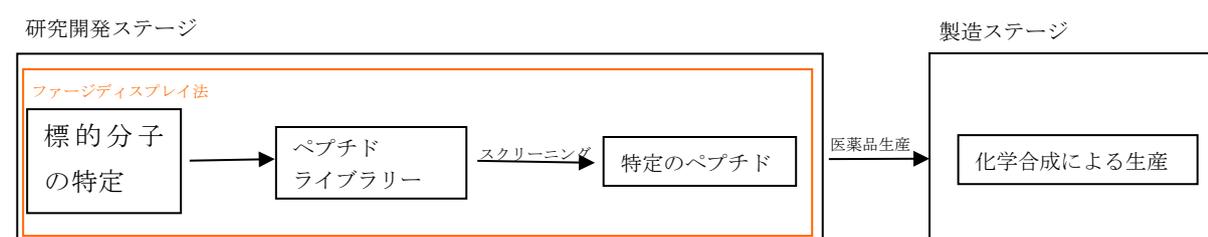


図3 ペプチド医薬品開発・製造工程

## 【ファージディスプレイ法の課題】

ファージディスプレイ法の課題として以下が挙げられる。

- ① 容器が密閉されておらず外部から混入する不要なファージも濃縮されてしまうため、目的のファージの純度が上がらない、
- ② プレートに非特異吸着が有り、不要なファージを除去しきれない。それらを除去するため、洗浄を何度も行う必要があり時間短縮できない。
- ③ 1回の処理量が100マイクロリットルと微量なため、一度に大量のライブラリーを扱うことができなかった。ライブラリーサイズが大きくなる程、出発材料の容量が大きくなる。7個のアミノ酸の配列を全て無作為化する場合はライブラリーサイズが $10^9$ に相当し、ファージの溶液は100マイクロリットルと少量であるが、ランダムアミノ酸配列が10個になるとサイズは $10^{13}$ に相当し、容量は1リットルまで膨れ上がる。現在のところ、大容量の出発物質を用いたスクリーニングはプレートを用いる方法ではほとんど不可能である。

## (2) 研究開発の高度化目標及び技術的目的値

### 【高度化目標】

ファージディスプレイ法における濃縮工程の効率化を目的に、従来の抗原が固相化されたプレートによる濃縮プロセスの代替として高機能性磁性微粒子（FGビーズ）を利用した濃縮プロセスを開発する。FGビーズならびに大量のファージを濃縮することに適した新規の磁気分離機構を用いることにより、濃縮工程の大容量化と時間短縮を実現する。具体的には、従来の抗原が固相化されたプレート（100マイクロリットル）によるスクリーニングと比較した場合、濃縮工程はほぼ同じ時間で、一度に10000倍（1リットル）のライブラリーを出発物質として扱うことを目標とする。前述の通り、FGビーズを用いたファージディスプレイ法における濃縮工程は非常に有効であるが、目的のファージを大量に濃縮する場合、次の2つの大きな課題を抱えており、それぞれ新技術を投入し改善を図る。

### (1) コンタミネーションによる非特異的ファージの増殖

一般的に開放系で無菌操作を行うには、無菌フード内やガスバーナーによる上昇気流下での作業であるが、それでもファージや大腸菌のコンタミネーションが起りやすいことが知られている。特にファージは感染力が高いため、無菌フード内に過去の濃縮工程で使用したファージが残存すると、コンタミネーションによる非特異的ファージが増殖する。これらを解決することができればファージディスプレイ法が広く普及すると考えられる。

コンタミネーション防止のもっとも有効な手段は、全工程における密閉化と人的作業を極力減らすことである。そこで本研究では、一連の濃縮工程を完全自動化密閉系流路に置き換えることにより、全工程で人的作業の介在をなくし、コンタミネーションを排除する。

## (2) 大スケールでの FG ビーズの磁気分離方法

リットル単位の大スケールの処理において、100 マイクロリットルの液量しか入らないプレートは何枚も使う方法は現実的ではない。大スケールに対応するためには、それに適した容量の容器を使うとともに、他社の磁性微粒子と比較して非特異的吸着が低く、単位重量あたりの表面積の大きな FG ビーズを利用することが有効な手段となり得る。

但し粒径が小さい故に内包されている磁性体の量も少ないことから磁気分離時間を要する。また従来法と比較し大スケールになり、使われる FG ビーズの量も増えるため、強力な磁気分離用の磁石が必要である。また単に強力な磁石で磁気分離するのみならず、洗浄の際には洗浄液の水流で短時間に分散させる必要があり、その上では磁気フィルターの構造にも工夫が必要である。本研究ではそれらを加味して磁気分離装置を開発する。

### 【技術的目標値】

#### 【1. 大容量ファージディスプレイ自動化装置の仕様検討】

一連の自動化工程で、非特異的なファージを最大限除去し、抗原（標的分子）に特異的に結合するファージを効率よく回収できる条件検討と最適化を行う。

- ① モデルリガンド（抗原）を選定する。
- ②  $10^9$ （100 マイクロリットルスケール）のペプチドライブラリーにて、モデルリガンド（抗原）を使って従来の用手法で濃縮を行い、以降の自動化装置検証の際の比較対象とする。
- ③ ②の濃縮工程を自動化装置で行うためのプロトコルを作成する。
- ④  $10^{13}$ （1 リットルスケール）のペプチドライブラリーを自動化装置で行うためのプロトコルを作成する。

具体的な目標値としては、 $10^9$ 、 $10^{13}$ のそれぞれのペプチドライブラリーに対し、反応、洗浄後のファージの回収効率（Out/In）を初回反応時で  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ 、3サイクル目までに  $10^{-3}$ ~ $10^{-1}$  まで濃縮されるよう反応時間、洗浄時間、洗浄液量を調整する。

#### 【2. 大容量ファージディスプレイ自動化装置の開発】

密閉流路、電磁石と磁気フィルターによる磁気分離装置を用いた大容量ファージディスプレイ自動化装置を開発する。

最終的に①従来法（100 マイクロリットルスケール）の 10000 倍である 1 リットルのライブラリーを出発物質として扱うこと、②1 リットル中の磁性微粒子を 30 分以内に回収する、③一連の濃縮工程を 16 時間以内に行うことを目的とする。

【3. 大容量ファージディスプレイ自動化装置の評価】

2項で製作した自動化装置の評価を実施する。2項に記載した目標値を達成すると共に、1項のモデルリガンド(抗原)と $10^{13}$ ペプチドライブラリーを用いて、小スケール( $10^9$ 種類)のペプチドライブラリーからの濃縮との差異を確認する。

表2 新技術、従来技術仕様比較

	従来技術	新技術	備考
対応ライブラリー量	$10^9$ 種	$10^{13}$ 種	10000倍
処理スケール	100 マイクロリットル	1 リットル	10000倍
処理時間	1667時間	16時間以内	1リットルの処理に要する時間

1-2 研究体制

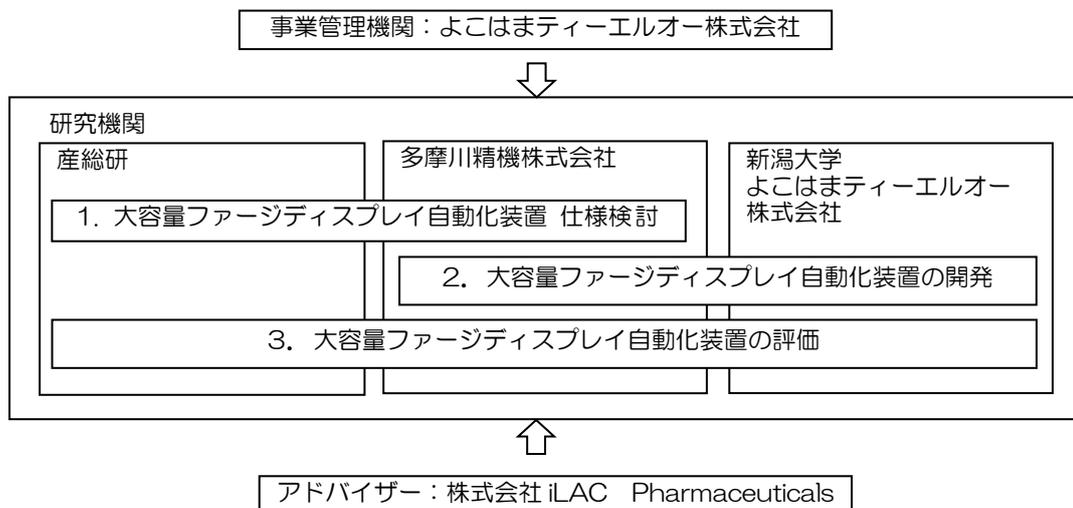


図4 研究開発体制

### 1-3 成果概要

ファージディスプレイ法における大スケールでの濃縮工程の効率化と、コンタミネーションによる非特異的ファージの低減を目的に、従来の抗原が固相化されたプレートによる濃縮プロセスの代替として高機能性磁性微粒子（FG ビーズ）を利用した濃縮プロセスの開発、FG ビーズならびに大量のファージを濃縮することに適した新規の磁気分離機構と自動化装置を開発し、濃縮工程の大容量化と時間短縮を実現することができた。

#### ① 高磁気応答性 FG ビーズの開発

- 処理時間の短縮に向け、高磁気応答性 FG ビーズの開発を行なった。粒子に含有するフェライト粒子の量を増加させ、またポリマー被覆を薄くすることで、FG ビーズの基本性能を保ったまま、従来の磁気分離時間 5 分を 1 分まで短縮することができた。

#### ② モデルリガンドの選定

- 8 アミノ酸残基のトリマーオリゴライブラリーにより作製した T7 ファージライブラリーにストレプトタグ II を陽性対象としてスパイクインしたのから、ニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズを使って濃縮実験を実施した。
- 中間評価ヒアリングにおいて、評価委員より抗体医薬という観点で抗体ライブラリーについても評価を行なったほうが良いとのアドバイスを頂き、ヒト Lysozyme 固定化ビーズを用い、Nanobody による抗体ライブラリーの評価を実施した。

#### ③ 密閉流路、電磁石と磁気フィルターによる磁気分離装置を用いた大容量ファージディスプレイ自動化装置の開発

- 1 リットルスケールに対応するための密閉流路を用いた自動化装置を開発した。
- 前記自動化装置と組合せて使用する電磁石を用いた磁気分離装置と磁気フィルターを開発した。
- 1 リットルスケール自動化装置の条件検討用に 1 ミリリットル対応自動化装置を開発した。

#### ④ 中スケール自動化装置の開発

- 川下企業である製薬メーカーより、現状では 1 ミリリットルスケールの実験がほとんどであり、いきなり 1 リットルまでのスケール UP はライブラリーの確保含めて困難である。また数十 ml スケールの自動化システムは見たことが無く、試してみたい、とのコメントがあり、50 ミリリットルの自動化装置を開発し、同装置を用いて評価を行なうこととした。

#### ⑤ 自動化プロトコルの作成

- 用手法や 1 ミリリットルの自動化装置を用いた条件検討を重ね、短時間に高純度にファージを濃縮する条件（ビーズ濃度、バッファー組成、洗浄回数など）を確立した。

#### ⑥ 10<sup>13</sup>ペプチドライブラリーの作製

- 通常の縮重オリゴではなく、一種類のアミノ酸に対して一種類のコドン割り当てる Trinucleotide cassettes 技術（トリマーオリゴ法）を用いて 10<sup>13</sup>ペプチドライブラリーの作製を完了した。

#### ⑦ 自動化による評価

- 8 アミノ酸残基のトリマーオリゴライブラリーにより作製した T7 ファージライブラリーにストレプトタグⅡを陽性対象としてスパイクインしたものから、ニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズを使って、用手法による濃縮実験を実施した。結果として、ニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズ共に特異的と見られるペプチドが濃縮でき、特にストレプトアビジンを使ったペプチドの濃縮は SN 比が高い結果となった。なおストップコドンの出現率が低く、トリマーオリゴ法を使用して作製したこのライブラリーは品質が良いものとなっていることが確認できた。
- 50 ミリリットルスケールの自動化装置とヒト Lysozyme 固定化ビーズを用いて、Nanobody による抗体ライブラリーからの濃縮実験を実施した。結果として、6回の濃縮において、段階を経るほどにいくつかのペプチドが濃縮された。なお濃縮されたペプチドがヒト Lysozyme に対して特異的に結合されたものかの解析は継続中である。

#### ⑧ プロジェクトの管理・運営

- 事業管理機関における本プロジェクトの管理と実用化・事業化に向けた到達度合いの検証と課題について、研究実施者と調整を行なった。

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

#### ① 研究開発機関

多摩川精機株式会社 バイオトロンニクス研究所

研究所長・技監 羽生 尚広

TEL : 0265-21-0501 FAX : 0265-21-1896

E-mail : [naohiro-hanyu@tamagawa-seiki.co.jp](mailto:naohiro-hanyu@tamagawa-seiki.co.jp)

#### ② 事業管理機関

よこはまティーエルオー株式会社

プロジェクト推進部門 部門長 岡林 光志

TEL : 045-339-4441 FAX : 045-340-3541

E-mail : [okabayashi-terushi-tp@ynu.ac.jp](mailto:okabayashi-terushi-tp@ynu.ac.jp)

## 第2章 本論

多摩川精機は、アフィニティ精製用 FG ビーズとそれを用いた自動化装置の製造・販売を行っており、製薬メーカーや大学・研究機関にて主に薬剤標的タンパク質を精製する目的で使用されている。

本事業では、①多摩川精機において、これまでに培った新たな官能基を有したビーズ開発やビーズへの新規リガンド固定化方法の開発の経験を活かして、ファージディスプレイ用途の各種磁性微粒子を開発、②大スケールのファージライブラリーから目的のペプチドを短時間に高純度で濃縮するため、新潟大学と多摩川精機との共同で電磁石を利用した磁気分離装置を内蔵した自動化装置を開発、③産総研にてトリマーオリゴ法を用いた  $10^{13}$  ファージライブラリーの製造方法を確立した。

### 2-1 高磁気応答性 FG ビーズの開発とモデルリガンドの固定化

濃縮工程の時間短縮を目指し、通常より磁気応答性の高い「高磁気応答性 FG ビーズ」を開発した。ポリマー内に含有させるフェライト粒子の量を増加させること、ポリマー被覆を薄くすること（図5）により、従来のFGビーズの特徴はそのまま、従来の5分から0.5分まで磁気分離時間を短縮することができた。（図6）

FG ビーズの大量合成系の確立については、従来からの単純スケールアップはもちろんのこと、第二段階として、反応系を濃縮させることで装置の大型化、新規導入をせずとも目的の量を製造できることに目処が立った。

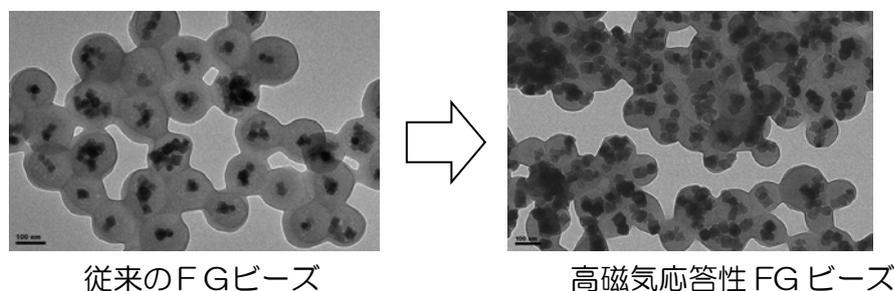


図5. 磁気応答性の高いビーズの開発

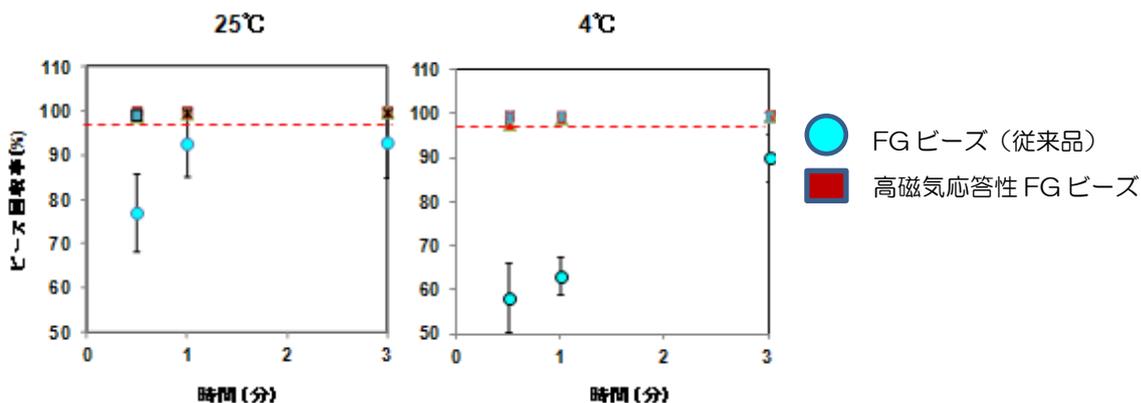


図6. 磁気分離率比較

既存の 7 アミノ酸残基をランダム化したペプチドライブラリーをスクリーニングする（配列の濃縮が見られるか検証）目的で、モデル分子として結合ポケットをもつ分子であるニュートラアビジンおよびストレプトアビジンを固定化した FG ビーズ（図 7）を作製した。

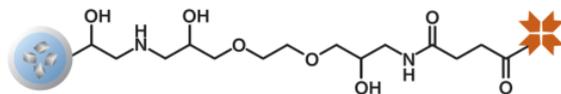


図 7. ニュートラアビジン（ストレプトアビジン）固定化 FG ビーズ

また Nanobody による抗体ライブラリーの評価用にヒト Lysozyme 固定化ビーズを作製した。リガンド固定化技術開発については、上記 3 種類だけでなく、他の分子ポケットを有する分子（イムノグロブリン、タマビジンなど）の固定化について様々な官能基及び固定化条件（バッファ、pH、塩濃度など）についても検討を行い、技術を蓄積することができた。

## 2-2 10<sup>13</sup>スケールファージライブラリーの作製

通常の縮重オリゴではなく、一種類のアミノ酸に対して一種類のコドン割り当てた Trinucleotide cassettes 技術（トリマーオリゴ法）を用いて高品質なライブラリーを作製した。

通常の縮重オリゴを使ったライブラリーでは、1 アミノ酸あたり最大 NNN=64 通りの塩基の組み合わせがあるので、8 アミノ酸残基のライブラリーでは  $64^8 = 2.8 \times 10^{14}$  通りとなる（バリエーションは  $20^8 = 2.56 \times 10^{10}$  種）。通常オリゴのライブラリーでは、バリエーションを担保するライブラリーを作製するにはパッケージングを 10000 回繰り返す必要がある。一方、トリマーオリゴを使用した 8 アミノ酸残基のライブラリー（システイン抜き）は、 $19^8 = 1.7 \times 10^{10}$  のバリエーション=塩基の組み合わせとなる。

現在入手できるキットで作製できるトリマーオリゴによるライブラリーは、パッケージングの性能に大きく依存するものの、10 回繰り返すことで  $10^8 \sim 10^9$  pfu（増幅後  $10^{10}$  pfu/mL（ $10^{13}$  pfu/L））クラスを作製できる。これまでの通常オリゴを使ったライブラリーと比べ、10000 倍のポピュレーションを担保しており、本案件での目的の対応ライブラリー 10000 倍を達成している。またこの時、増幅を 10 回行っているので 5 リットルのファージ液が生産され、本案件の目的の 1 リットルスケールの自動化装置の対象となる。

以上のことから、期初の目的である 10<sup>13</sup> スケールのファージライブラリーが作製できると考え、トリマーオリゴ法を用いて 10<sup>13</sup> スケールファージライブラリーを作製した。

## 2-3 濃縮条件の検討、最適化

### ① 用手法による濃縮実験

8 アミノ酸残基のトリマーオリゴライブラリーにより作製した T7 ファージライブラリーにストレプトタグ II を陽性対象としてスパイクインしたことから、ニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズを使って、用手法による濃縮実験を実施した。以下にプロトコールを示す。

## 【プロトコル】

- ・8 アミノ酸残基のトリマーオリゴライブラリーにより T7 ファージライブラリーを作製。
- ・ストレプトタグⅡの配列をスパイクインし陽性対照とする。
- ・ニュートラアビジン FG ビーズとストレプトアビジン FG ビーズを使用（5、50 $\mu$ L）。
- ・反応液（ファージ増殖液）は NaCl 500mM に調整（総計 1mL）。
- ・洗浄工程では、洗浄液中の NaCl 濃度を 500mM  $\rightarrow$  1M  $\rightarrow$  2M と増加させる。
- ・洗浄回数：用手法 500mM  $\times$  3 回、1M  $\times$  3 回、2M  $\times$  3 回 合計 9 回
- ・最終洗浄ビーズに大腸菌培養液を 1mL 投入、37 $^{\circ}$ C 4 時間培養しファージを増殖。
- ・ファージ増殖液を次のビーズ結合実験に使用。
- ・合計 3 回のビーズ結合、洗浄、増殖を繰り返す。
- ・最終ファージ増殖液を次世代シーケンサーのテンプレートとして配列解析を実施。

表3. 用手法による濃縮条件結果

Neutravidin 50 $\mu$ L 用手法	個数	Neutravidin 5 $\mu$ L 用手法	個数	Streptavidin 50 $\mu$ L 用手法	個数	Streptavidin 5 $\mu$ L 用手法	個数
WSHPQFEK	1311	WSHPQFEK	81	WSHPQLEK	1812	WSHPQFEK	188581
WSHPQLEK	1189	YTMKSHPD	28	WSHPQFEK	359	WSHPQLEK	1031
ATTLKAYH	441	WSHPQLEK	20	ATTLKAYH	231	*SHPQFEK	626
YTMKSHPD	417	ATTLKAYH	7	YTMKSHPD	211	RSHQFEK	566
KMNLKAFH	119	KFELRKYH	5	HPQQNWEL	61	*ATLSSKN	476
QDQHVNYL	96	KMNLKAFH	4	WSHPAAAL	51	WSQPQFEK	355
IWNHAKSK	52	*SHPQFEK	3	KQKKAHPY	50	WRHPQFEK	337
SMPLTAKN	49	INRSHPOI	3	WSHPKFEK	41	WNHPQFEK	303
HPQQNWEL	46	HPQQNWEL	3	WSHPQIEK	35	WSNPQFEK	273
*SHPQFEK	42	IQKLPSKF	3	*SHPQFEK	34	YTMKSHPD	212
MHKLKDYH	36	PMHMKSR	3	MSVPPQVN	34	WSHPQFEN	192
LQAHPVMD	32	NWPSIDNL	2	QDQHVNYL	33	WSHPQFKK	190
KFELRKYH	32	MHKLKDYH	2	KMNLKAFH	31	SSHQFEK	185
IWNHLDTD	31	KHEELVPF	2	WSHPQK*K	27	WSHPQFAK	181
AKSVPKKA	31	HIKRPVSM	2	WSQPQFEK	26	WSHTQFEK	178
*ATLSSKN	30	WSHPQFEE	2	*ATLSSKN	23	WSLPQFEK	175
KSALKAYH	28	WSHPQIEK	2	IQKLPSKF	20	WSHPQFEE	174
IQKLPSKF	26	DILLKIGH	2	KFELRKYH	18	IQKLPSKF	162

結果としてニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズとも、特異的と見られるペプチドが濃縮でき、特にストレプトアビジンを使った標的の濃縮は SN 比が高い結果となった（表3）。なおストップコドンの出現率が低く、トリマーオリゴを使用して作製したこのライブラリーは品質が良いものとなっていることが確認できた。但しスパイクインしたストレプトタグⅡ配列（表3中 WSHPQFEK）は、本来ニュートラアビジンには結合しないペプチドである。これは洗浄が不十分なため、非特異物質として濃縮されている可能性がある。

## 2-4 自動化装置の開発

### ① 小スケール自動化装置

大スケール（1リットルスケール）自動化装置の条件検討用として、小スケール（1ミリリットル）に対応した自動化装置を開発した。（図8）



小スケール自動化装置

(1ミリリットル、24 サンプル)



小スケール自動化装置

(1ミリリットル、16 サンプル)

図8 小スケール自動化装置外観

## ② 中スケール自動化装置

川下企業である製薬メーカーより、現状では 1 ミリリットルスケールの実験がほとんどであり、いきなり1リットルまでのスケールUPはライブラリーの確保含めて困難である。また数十 ml スケールの自動化システムは見たことが無く、試してみたい。とのコメントがあり、50ミリリットルの自動化装置を開発し、同装置を用いて評価を行なうこととした。

(図9)



中スケール自動化装置

(50ミリリットル、6 サンプル)

図9 中スケール自動化装置外観

### ③ 磁気分離装置（1リットルスケール版）

1 リットルスケールに対応した電磁石を用いた磁気分離装置と自動化装置の製作のために、以下の研究を行った。

#### （1）磁気分離条件の同定

まず、球形磁性体（ビーズ内の磁性粒子）と円形磁性体（磁性細線）の二つの磁気飽和条件を考慮し、一様に磁化された磁性体の磁化と外部磁界の関係は、バルクとしての磁性体の磁化率を $\chi_p$ 、有限の大きさの磁性体の磁化率を $\chi_{ep}$ 、反磁界係数(減磁率)を $N_d$ とすると、以下のように書ける。

$$\frac{\mathbf{M}}{\chi_p} = \mu_0 \mathbf{H}_{ex} - N_d \mathbf{M} \Leftrightarrow \mathbf{M} = \frac{\chi_p}{1 + N_d \chi_p} \mu_0 \mathbf{H}_{ex} \quad (1)$$

$$\frac{\chi_p}{1 + N_d \chi_p} = \chi_{ep} \quad (2)$$

球形磁性体の場合、どの方向にも反磁界係数は $N_d = \frac{1}{3}$ となる。よって式(2)から、

$$\mathbf{M}_p = \frac{\chi_p}{1 + \frac{1}{3} \chi_p} \mu_0 \mathbf{H}_{ex} = \frac{3\chi_p}{3 + \chi_p} \mu_0 \mathbf{H}_{ex} \quad (3)$$

また、強磁性体から $\chi_p \gg 1$ より

$$\frac{3\chi_p}{3 + \chi_p} \approx \frac{3\chi_p}{\chi_p} = 3 \quad (4)$$

式(3)、(4)から飽和磁化の $\frac{1}{3}$ 程度の外部磁界を印加すれば、磁性粒子は磁気飽和することがわかる。つまり、マグネタイトの飽和磁化を 1.8T 程度と考えると、外部磁界は 0.6T 程度必要である。

次に、磁気フィルター内の磁性細線を考えると、円形磁性体の場合、長手方向に垂直な反磁界係数は $N_d = \frac{1}{2}$ となる。よって式(3)から、

$$\mathbf{M}_w = \frac{\chi_p}{1 + \frac{1}{2} \chi_p} \mu_0 \mathbf{H}_{ex} = \frac{2\chi_p}{2 + \chi_p} \mu_0 \mathbf{H}_{ex} \quad (5)$$

また、強磁性体から $\chi_p \gg 1$ より

$$\frac{2\chi_p}{2 + \chi_p} \approx \frac{2\chi_p}{\chi_p} = 2 \quad (6)$$

式(5)、(6)から飽和磁化の $\frac{1}{2}$ 程度の外部磁界を印加すれば、磁性粒子は磁気飽和する。つまり、SUS430（磁性ステンレス）の飽和磁化を 1.6T 程度と考えると、外部磁界は 0.8T 程度必要である。

磁気力、ドラッグ力を計算し、流速とフィルター線径との関係を計算し、磁気分離に必要なパラメータ（流速、流量、フィルター半径）を評価する。解析では、図10のモデルのように多数ある磁性細線のうちの1本だけを考え、粒子に働く磁気力を計算する。表4に計算パラメータを示す。図11に流量と流速の関係、図12に磁気力とフィルター線径、及びドラッグ力と流速の関係を示す。図11から、処理時間を3分とした場合、流速は5.5mm/s、流量は334mL/minとなる。ここで、磁気分離を行うためには $|F_m| > |F_D|$ である必要があり、+

分な分離を行うための条件は $F_m > 3 \sim 5 \times F_D$ と想定すると、図12から、流速5.5mm/sのときのドラッグ力より、3~5倍の大きさの磁気力を発生させるフィルター線径（直径）は50~60 $\mu\text{m}$ と見積もることができる。

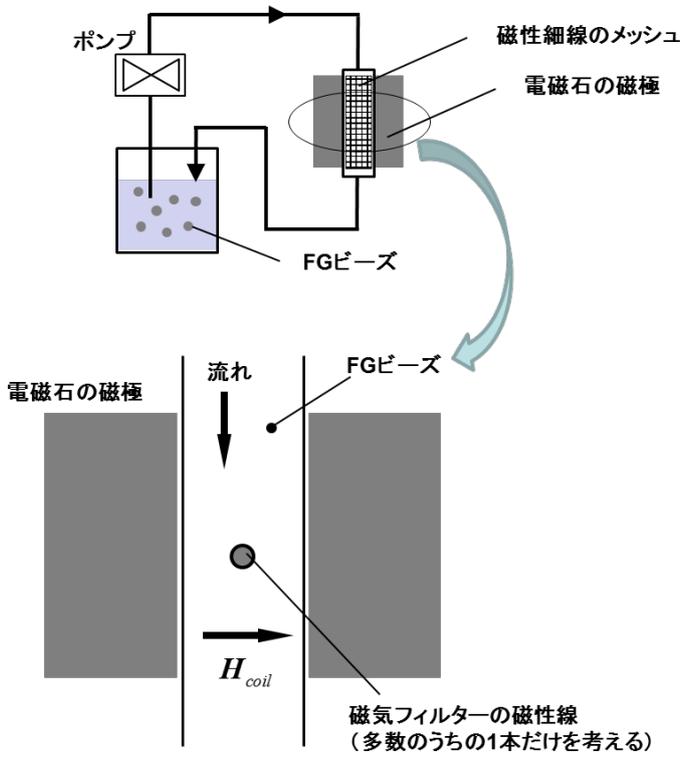


表4. 計算パラメータ

分離チャンネルの寸法	
断面高さ D	10mm
断面幅 W	100mm
長さ L	200mm
磁性粒子半径 $r_p$	20nm
ビーズ半径 $r_{FG}$	100nm
流体の粘性率 $\eta$	0.001Pa·s
磁性粒子の個数 N	4
磁性粒子の磁化 $M_p$	1.8T
磁性細線の磁化 $M_w$	1.6T
外部磁界 $B_{coil}$	1T

図10. 分離条件評価のモデル

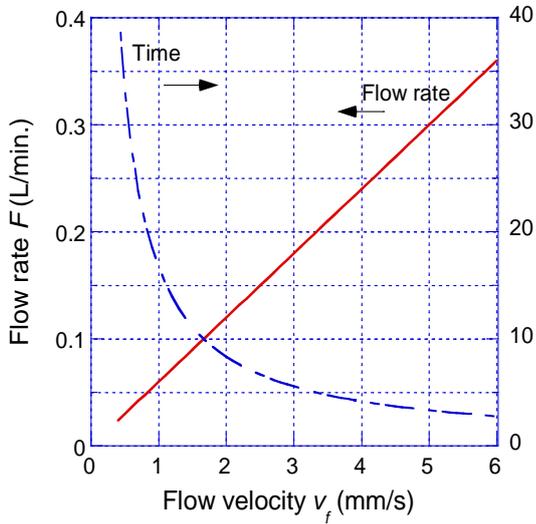


図 1.1. 流速と流量の関係

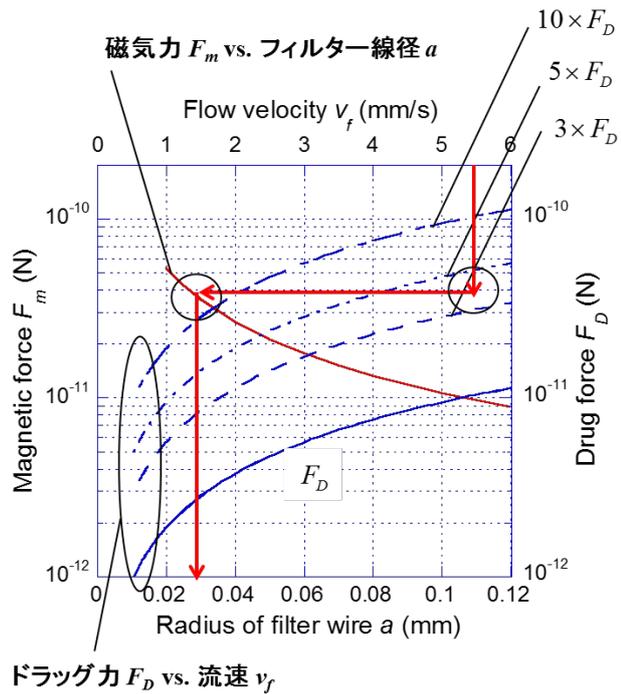


図 1.2. 磁気力とフィルター線径, 及びドラッグ力と流速の関係

(2) 磁気分離マグネットの磁界解析

図 13 に磁気分離マグネットの概略モデルを示す。分離流路を配置するギャップ部分は x 方向に 114mm、y 方向に 10mm、z 方向に 200mm とする。コイルは 990T で電流密度 2.5A/mm<sup>2</sup>、平角線コイル 1t×4mm から電流は 10A とする。図 14 と図 15 に磁束密度 (絶対値) 分布のコンター図、図 16 と図 17 にギャップの z 方向ごとの各断面 (xy 平面) の磁束密度 (絶対値) 分布をそれぞれ示す。

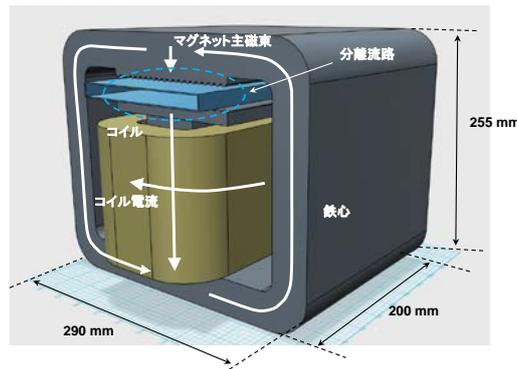


図 13. 磁気分離マグネットの概略図

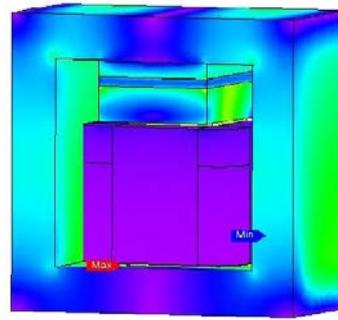
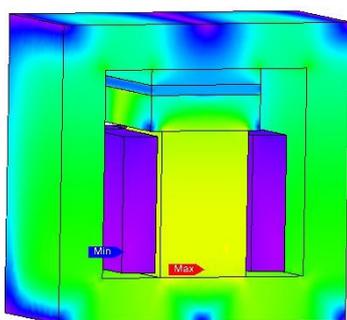


図 14. 磁束分布のコンター図（中央断面）

図 15. 磁束分布のコンター図（端部）

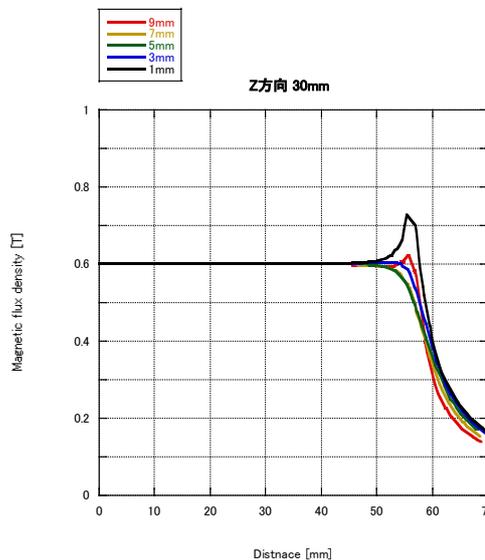
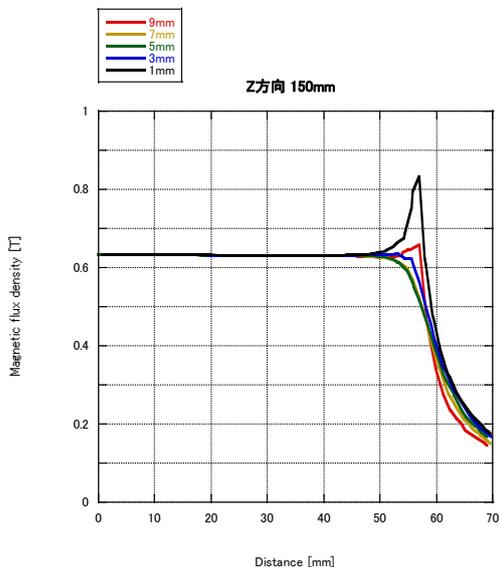


図 16. ギャップの磁束密度分布図  
（中央部：z 方向 150mm の断面）

図 17. ギャップの磁束密度（絶対値）分布  
（端部：z 方向 30mm の断面）

上記検討に基づいて2タイプ（試作品 1,2、試作品 3）の磁気分離装置試作機を製作した。

試作品 3（最終品）は試作品 1,2 に対して、①総重量の低減（200kg 超 →150kg）、②標準品の巻鉄心を流用することによる製作容易性の確保、③性能向上を実現した。（図 18, 19）

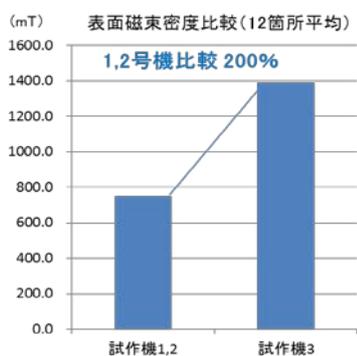


図 18 表面磁束密度比較

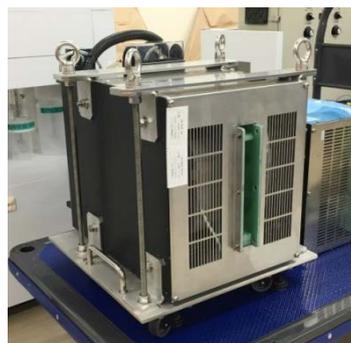


図 19 試作品 3（最終品）外観

#### ④ 大スケール自動化装置、磁気フィルター

自動化装置において最も重要なのは、如何に FG ビーズを迅速かつ高収率で磁気分離し、さらに磁気分離された FG ビーズを洗浄液中に再分散させることで不純物を取り除くことである。

自動化装置は、目標性能として4サイクルの濃縮工程を 16 時間以内に完了させることを定

めており、磁気分離工程、洗浄液への再分散工程をそれぞれ3分以内に行なう必要がある（図20）。それを実現させるため、およそ340ml/minの流速で磁気分離、洗浄液への再分散ができるよう、磁力、送液方法、フィルター形状を検討した。（図21）

### 自動化装置の目標性能

・処理時間 4サイクル:16時間 → 1サイクル:4時間

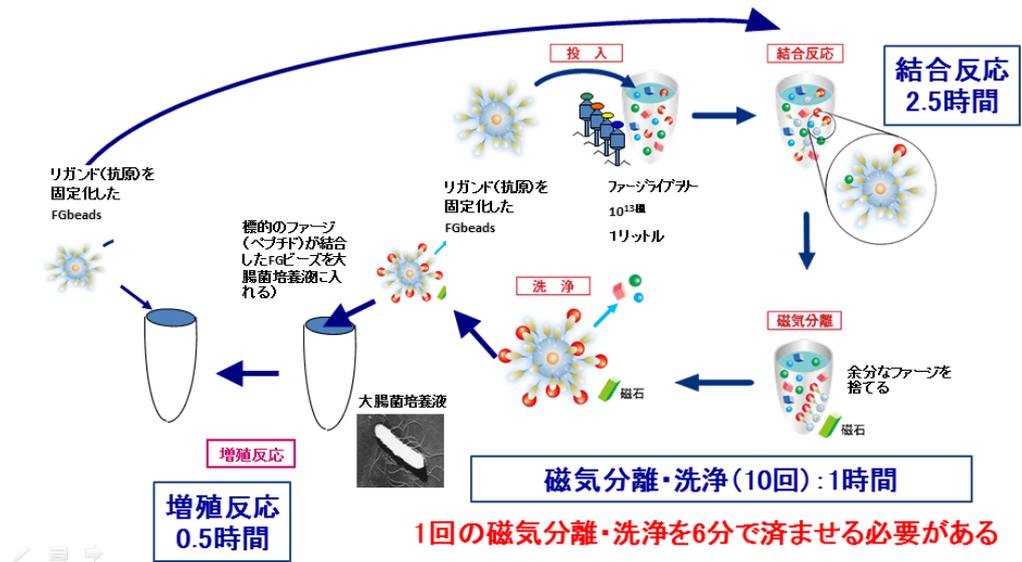


図20 自動化装置目標性能

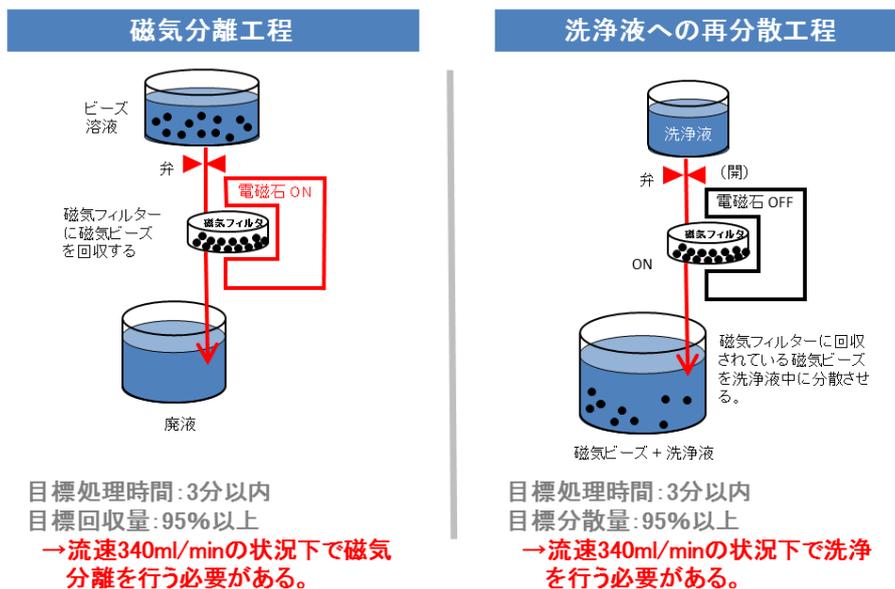


図21 磁気分離工程、洗浄液への再分散工程モデル図

試作品1, 2においては、磁気分離における目標回収率 95%に対して 66%、洗浄再分散における洗浄液への目標回収量 95%に対して 25.7%と大幅に未達であったが、①フィルター材、②送液方法、③洗浄方法を検討、最適化したことにより、最終的に磁気分離にお

ける回収率 97.4%、洗浄再分散における洗浄液への回収率 90.1%まで改善することができた。(図22、23、24)

なお、検討したフィルターの洗浄方法について特許を出願した。(3-4 項参照)

### 磁気分離・洗浄再分散性能(改良前)

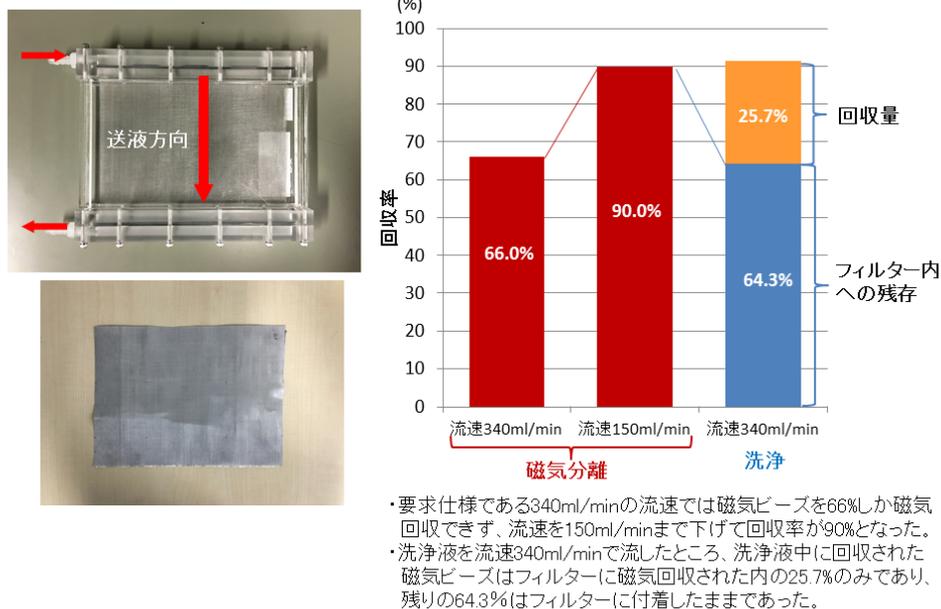


図22 磁気分離・洗浄再分散性能改良前

### 磁気分離・洗浄再分散性能(改良後)

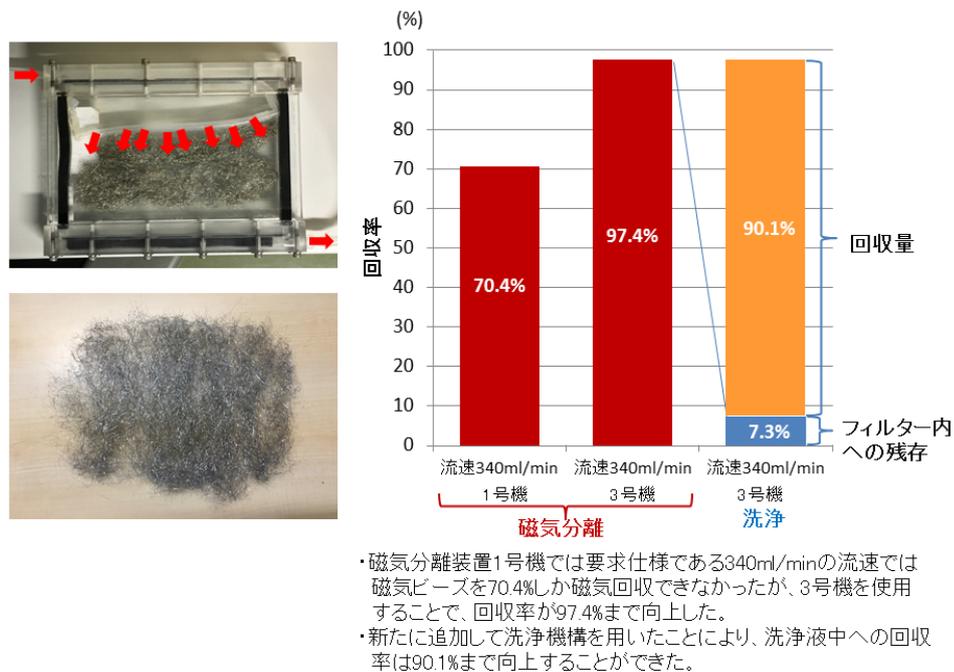


図23 磁気分離・洗浄再分散性能(改良後)



図24 ファージディスプレイ自動化装置大スケール版外観

2-5 自動化装置の評価

① 1ml スケール自動化装置の評価

1 ミリリットルスケールの自動化装置を使って、既知のペプチドを入れ込んだライブラリーからニュートラアビジン固定化 FG ビーズ、ストレプトアビジン固定化 FG ビーズを使って自動化濃縮実験を実施し手法との比較を行った。以下にプロトコールを示す。

【プロトコール】

- ・8 アミノ酸残基のトリマーオリゴライブラリーにより T7 ファージライブラリーを作製。
- ・ストレプタグ II の配列をスパイクインし陽性対照とする。
- ・ニュートラアビジン FG beads とストレプトアビジン FG ビーズを使用 (5、50uL)。
- ・反応液 (ファージ培養液) は NaCl 500mM に調整 (総計 1mL)。
- ・洗浄工程では、洗浄液中の NaCl 濃度を 500mM → 1M → 2M と増加。
- ・洗浄回数：自動化装置 500mM x 3 回、1M x 4 回、2M x 4 回 合計 11 回
- ・最終洗浄ビーズに大腸菌培養液を 1mL 投入、37°C 4 時間培養しファージを増殖。
- ・ファージ増殖液を次回のビーズ結合実験に使用。
- ・合計 3 回のビーズ結合、洗浄、増殖を繰り返す。
- ・最終ファージ増殖液を次世代シーケンサーのテンプレートとして配列解析を実施。

表5 1 ミリリットルスケール自動化装置による濃縮条件結果

Neutravidin 50uL 装置	個数	Neutravidin 5uL 装置	個数	Streptavidin 50uL 装置	個数	Streptavidin 5uL 装置	個数
DILDGPGF	7111	DILDGPGF	6337	WSPQLEK	214556	WSPQFEK	1116545
IQKLPSKF	6369	IQKLPSKF	6190	YTMKSHPD	90311	WSPQLEK	6578
RSDILTPF	5456	NDKKDKKK	3871	ATTLKAYH	46819	RSHQFEK	6124
DILLKIGH	3971	QNKVPRFA	3559	SMPLTAKN	14385	*SHQFEK	5484
LTEIPYTH	3405	EADIPKFA	3476	WSPQFEK	13337	*ATLSSKN	4567
GDPLLKGF	3370	KQQKAHPY	2803	KMNLKAFH	10331	WSQPQFEK	2820
EADIPKFA	2557	GDPLLKGF	2641	MPLAAMTN	9893	SSHQFEK	2281
VMELPPTH	2118	DKLLKQAF	2022	AKSVPKKA	5819	SHQFEK*	2031
DNLLANGF	2054	DILLKIGH	1657	*SHQFEK	5734	WNHPQFEK	2013
DKLLKQAF	1917	LTEIPYTH	1623	MSVPPQVN	5265	WSPQFEE	1842
QNKVPRFA	1908	KAGIPKFA	1458	*ATLSSKN	5232	WRHPQFEK	1725
DLLLQSTM	1429	KKGGLVPE	1392	QDQHVNYL	5069	GSHQFEK	1701
KKGGLVPE	1354	NRGTPKFA	1242	LQAHPVMD	4607	WSNPQFEK	1638
MNPDIPAF	1191	DNLLANGF	1123	HPQQNWEL	4442	WSPQFAK	1323
NREDLIPF	1077	RSDILTPF	1018	IWNHAKSK	3850	WSTQFEK	1249
EHKEIFKF	1054	DLLLQSTM	946	WSPKFKEK	3815	WSPQFEN	1233
RDMDMHAF	900	VMELPPTH	708	MHKLKDYH	3074	LSHPQFEK	1207
TQKEPFPE	895	MNPDIPAF	700	MSHLADMH	2538	WSPPFKEK	1131

結果として、スパイクインしたストレプトタグⅡ配列（表5中WSHPQFEK）が、ストレプトアビジン FG ビーズで効率良く回収できている。また本来ストレプトタグⅡ配列に対して結合するはずのないニュートラアビジン FG ビーズでは、用手法では濃縮され上位にあったものが、この自動化実験では無くなっている。このことから自動化装置の方が十分に洗浄が行われていることがわかる。なおストレプトアビジン FG ビーズを使った実験において、ビーズ量を変えた比較を行ったが、ビーズ量が少ない方がS/N比が高い結果となっている。今後の中で適正なビーズ量の検討を行う。

## ② 50ml スケール自動化装置の評価

50 ミリリットルスケールの自動化装置を使って、ヒト Lysozyme を認識する nanobody の CDR3 領域の 15 アミノ酸をランダム化したライブラリーを作成し、ヒト Lysozyme を固定化した FG ビーズを用いて nanobody ライブラリーをスクリーニングした。以下にプロトコールを示す。

### 【プロトコール】

- ヒト Lysozyme を認識する nanobody の CDR3 領域の 15 アミノ酸をランダム化した T7 ファージライブラリーを作成。
- ヒト Lysozyme を FG beads に固定化。
- 反応液（ファージ培養液）は NaCl 150mM に調整（総計 10mL）し、4 本準備。
- ヒト Lysozyme 固定化 FG beads をサンプルあたり 500 $\mu$ L (20mg/mL) 使用。
- 洗浄液 10mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1% Tween20
- 洗浄回数：自動化装置 5 回/スクリーニング
- 最終洗浄ビーズに大腸菌培養液を 10mL 投入、37 $^{\circ}$ C 2 時間培養しファージを増殖。
- ファージ増殖液を次回のビーズ結合実験に使用。
- 合計 5 回のビーズ結合、洗浄、増殖を繰り返す。
- 最終ファージ増殖液を用いて plaque lift 法により、陽性プラークを選択。
- 4 つのサンプルから 3 個ずつ、計 12 個の Phage を増殖、ヒト Lysozyme 結合活性を ELISA 法および QCM 法で評価。

結果として、10mL の反応液  $\times$  4 サンプルのスクリーニングで得られたファージはばらつきはあるが、図25に示すように ELISA 法によってヒト Lysozyme に対する結合活性を示した。12 個のファージのうち 2 つを QCM 測定に供したところ、2 つともヒト Lysozyme に結合する反応を示した（図26）。このうち No.8 のライブラリー部分のアミノ酸配列はオリジナルの TEVAGWPLDIGIYDY とは異なった配列であった（特許出願予定のため非開示）。他のサンプルの QCM 測定とアミノ酸配列決定を順次行う予定である。

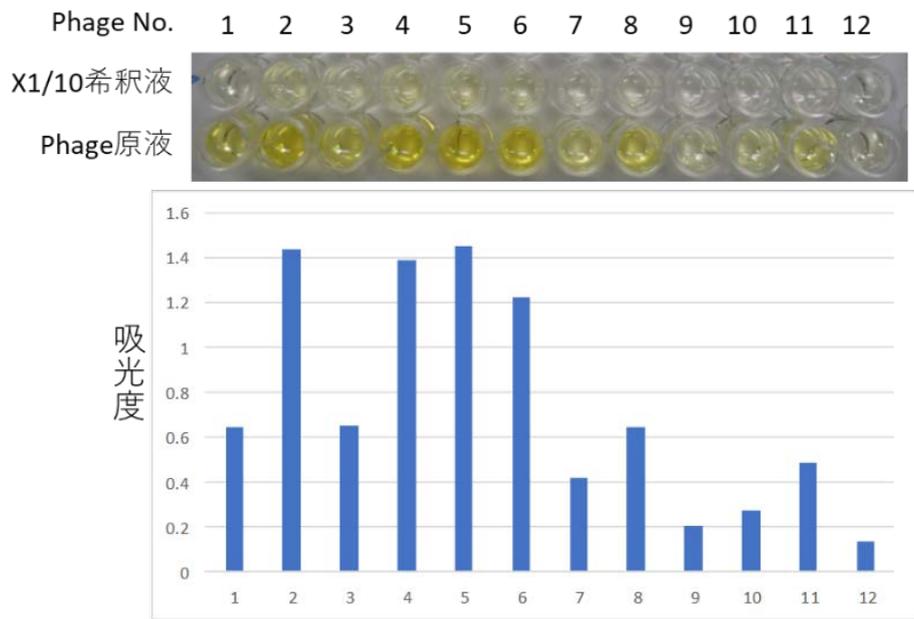


図25 ELISA 測定結果

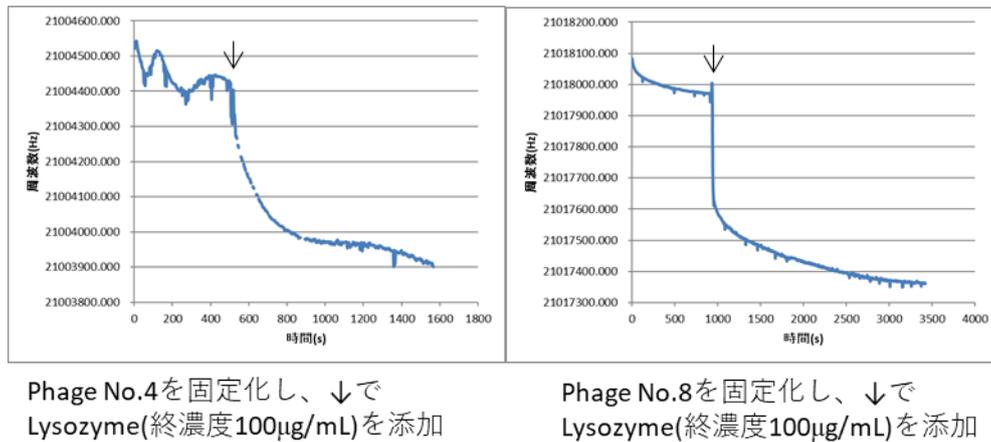


図26 QCM測定結果

これらの結果から、中スケール装置によるスクリーニングは機能していることが確認できた。この装置を用いれば一日2回のスクリーニングが可能であり、5回のスクリーニングは準備も含め一週間で終了することができる。中スケール装置がうまく機能したことから大スケール装置においても機能する目処が立った。

### 第3章 全体総括

#### 3-1 成果の総括と事業化・製品化への課題

3年間のサポイン事業の成果として、当初目標に対する実績と課題を以下にまとめた。高磁気応答性 FG ビーズ、大中小3タイプの自動化装置と大スケールに対応した磁気分離装置と磁気フィルター、トリマーオリゴ法を用いた  $10^{13}$  フェージライブラリーが完成し、一連の濃縮工程の時間短縮を実現できた。今後事業化に向けて各課題の検討を行っていく。

##### ① 高磁気応答性 FG ビーズ

成果：従来の FG ビーズに対して、性能はそのまま、磁気分離時間 5 分を 0.5 分まで短縮した「高磁気応答性 FG ビーズ」を完成した。

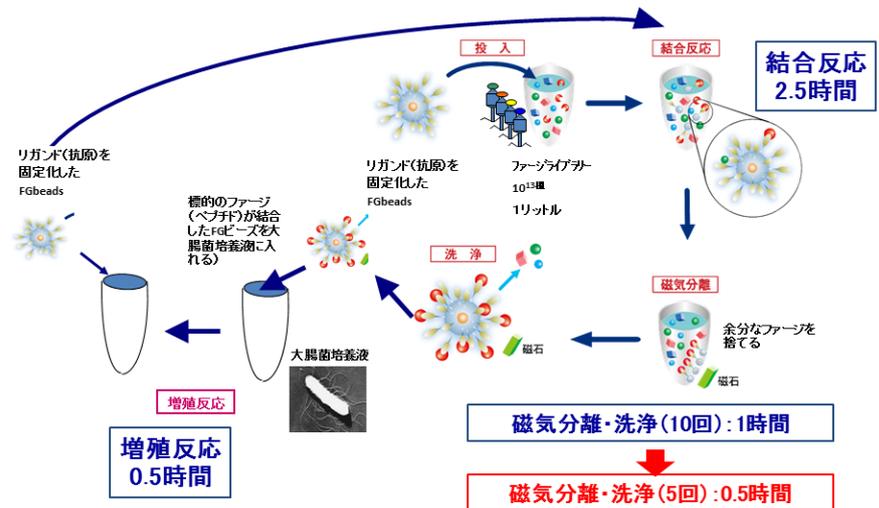
課題：多くのユーザーへの販売を目指して、表面官能基のラインナップ拡大と更なる大量合成の検討を行う。

##### ② 自動化装置（磁気分離装置、磁気フィルター含む）、自動化プロトコール

成果：1 ミリリットル、50 ミリリットル、1 リットル 3 タイプの自動化装置を完成した。

自動化プロトコールにおける最適な磁気分離、洗浄再分散方法を見出すことができ、また高磁気応答性 FG ビーズを組み合わせることにより、当初設定した「4 サイクル濃縮の目標時間 16 時間以内」に対して、14 時間で処理できる目処が立った。

(図 27)



FGビーズが非特異吸着が無く結果洗浄回数を減らすことができました。

**目標値** 4サイクル:16時間 → 1サイクル:4時間

**開発成果** 4サイクル:14時間 → 1サイクル:3.5時間

図27 ファージディスプレイ自動化装置の目標性能と開発成果

課題：1ミリリットル自動化装置は、すぐに販売できる形態となっているが、50 ミリリットル、1リットルに関しては、更なる評価が必要である。そのためには、現在本システムに関心を頂いている複数の製薬メーカーでの評価を重ね、早期に商品化を目指す。

### ③ 10<sup>13</sup>ファージライブラリー

成果：トリマーオリゴ法を用いた 10<sup>13</sup>ファージライブラリーの製造方法を確立した。

課題：今後1リットルスケールのファージディスプレイを拡販するためには 10<sup>13</sup>ファージライブラリーの供給も必要であり、多摩川精機で担うことを検討している。但し現時点ではファージを扱う社内設備が無いので、早期に構築を行っていく。その他拡販用データ取得、特許出願・論文投稿、海外販売体制の構築など拡販に向けて取り組む。(図28)

事業年度	平成30年度	平成31年度	平成32年度	平成33年度	平成34年度
海外保守販売体制構築	→				
	・海外では装置の販売実績が無いため、保守を含めた対応が可能な商社・代理店探しを行う。				
特許・論文	特許	論文	論文	論文	論文
	・カートリッジを含めた装置関連の特許を検討中。 ・論文からの引き合いが多い。年一報の論文を目標とする。				
拡販用データ取得	→				
	・川下企業となる製薬会社、大学、公的研究機関にて取得したデータを拡販に用いる。 ・必要に応じて共同研究契約を締結する。				
事業化体制	国内			海外	
製造体制	・販売目標に沿ったFGビーズの量産化 ・ファージ、大腸菌取扱いに伴う社内設備の構築 ・大スケール自動化装置の製造			当面、海外での製造の予定はない。	
販売体制	・当面は現在の体制(社内営業、商社)にて拡販を行う。			・装置以外は現在の商社で拡販を行う。 ・装置については海外での販売実績は無い。 保守対応ができる商社、代理店を探す。	
保守体制	・当面は現状の社内体制で対応 ・状況に応じて協力会社で対応を検討			・装置については海外での販売実績は無い。 保守対応ができる商社、代理店を探す。	

図28 事業化戦略（課題解決・事業化体制）

3-2 事業化・製品化の見通し

事業化・製品化の見通しを図29に示す。

事業年度	平成30年度	平成31年度	平成32年度	平成33年度	平成34年度
大スケール装置 商品化開発	商品化開発 ユーザ評価・聞き取り	商品化			
・試薬や磁気フィルターのカートリッジ化、磁気分離装置との一体化、ソフトウェアを含めた操作性など試作機をベースに商品化検討を行う。 ・商品化に向けて製薬企業での評価や意見の聞き取りを行う。					
FGビーズ 量産化検討		10g製造体制		50g製造体制	
・FGビーズの売上目標に沿ってFGビーズの量産体制を検討する。					
受託サービス 社内設備構築					
・受託サービスや性能評価等でファージや大腸菌を取り扱う上で必要な社内設備の構築を行う。					

図29 事業化戦略（事業化・製品化の見通し）

3-3 新技術の展開

① ファージディスプレイ自動化装置（大・中・小 スケール：3タイプ）

自動化により作業員の作業レベルのばらつきを無くすることができることから、経験を問わず誰にでも簡便に目的のファージを濃縮する環境を提供できる。本事業において、大（1リットルスケール）、中（50ミリリットルスケール）、小（1ミリリットルスケール）の3タイプの自動化装置を開発したが、小スケール装置は製薬メーカー、大学、公的研究機関に対して即販売可能である。中スケール装置は関心を示す製薬メーカーが複数有り、デモ機での評価を足がかりに販売に結びつける。1リットルスケールのファージディスプレイは、ファージライブラリーの確保含めて実現は数年先となる見通しである。小、中スケールで実績を重ね、そこで得た知見に基づいて大スケール自動化装置のブラッシュアップを行なう。

② ファージライブラリー

特に1リットルスケールに用いる  $10^{13}$  ライブラリーは、一般的に入手、作製が困難であり、大スケール化が進まない一因でもある。本プロジェクトで試みたトリマーオリゴ法を用いて  $10^{13}$  ライブラリーを商品化することで大スケールへの移行を早める取り組みを行なう。

③ 受託サービス

自動化装置の導入が困難なユーザに対して、一連のファージの濃縮作業を受託するサービスを行う。また煩わしいとされる FG ビーズへの抗原の固定化も必要に応じて受託する。この FG ビーズへの抗原の固定化の受託は装置を納入したユーザに対しても有効である。ファージディスプレイの受託は、今回開発する自動化装置を使うことで低コストに抑える。

#### ④ FG ビーズ・関連試薬（キット化）

自動化装置の消耗品として、FG ビーズを含めた試薬類をまとめた試薬キットを製品化する。また装置向けには磁気フィルターを含めたカートリッジにすることで簡便に装着でき、コンタミネーションの排除にも貢献できる。

FG ビーズに関しては、自動化装置での使用に限らず、既にファージディスプレイを行なっているユーザ全般に対して拡販を行なう。特に本事業で開発した高磁気応答性 FG ビーズは、既存の FG ビーズユーザからの要望が多く、また磁気分離時間がかかることで使ってもらえなかった磁性微粒子のユーザも数多く有り、それらの置き換えを狙う。

### 3-4 工業所有権の取得状況

下記に示す 2 件の特許を出願した。

- ① 特願 2017-026568 ポリマー被覆強磁性微粒子
- ② 特願 2018-034822 磁気フィルタ洗浄方法及び磁気フィルタ洗浄機構