

平成31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

「第4のがん治療法、免疫チェックポイント阻害剤
適応・適量決定システムの高度化」

研究開発成果等報告書

令和2年 5月

担当局 東北経済産業局
補助事業者 公益財団法人あきた企業活性化センター

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
- 1-2 研究体制
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論一(1)

抗PD-1抗体病理組織染色用人工キャリブレーター

- 【1-1】人工キャリブレーターの開発
- 【1-2】抗PD-L1抗体人工キャリブレーター用電界攪拌免疫組織染色システムの試作開発
- 【1-3】人工キャリブレーターと既存診断法の相関試験

抗PD-1抗体ELISA対応アナライザー

- 【2-1】抗PD-1抗体ELISAに適する電界攪拌技術を用いた迅速アナライザーの試作開発
- 【2-2】抗PD-1抗体ELISA用自動電界攪拌迅速ELISAアナライザーの開発
- 【2-3】抗PD-1抗体ELISAによる血中濃度測定試験

最終章 全体総括

- 1 研究開発成果と課題
- 2 研究開発後の事業化展開

研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

【社会的・経済的な背景】

現在最も注目を集めるがん治療法に第4の抗がん剤と呼ばれる免疫チェックポイント阻害剤があり、次々と目覚ましい効果が報告され、この広汎な普及が訴求されている。免疫チェックポイント阻害剤の治療において、現行の問題点として医療費や検査費用が高額であることが挙げられる。従来法の適応検査では、それぞれの薬剤に対して異なる体外診断薬が適用され、PDL1免疫組織化学染色の精度を保証し、臨床試験で得られた結果と同等の結果を再現するためには同一の抗体を用いて、同一の工程で検査が行われる必要があるこれを一本化させる検査薬のハーモナイゼーションや共通の診断基準が求められている。また、治療効果や今後明らかになると考えられる副作用発現メカニズム等の重要な指針を得るためにも低侵襲な血中薬物濃度が測定可能な装置開発が望まれている。即ち、治療時の血中薬物濃度測定技術の課題を解決するためにも検査技術の高度化による効率的な治療へ誘導することが求められる。

【技術的な背景と課題】

・薬剤適応決定について

従来、薬剤有効性を診断するための「適応決定」については、患者様の検体から病理医の指導の下、臨床検査技師が高額な専用装置にて、2時間程度の時間を要する免疫組織染色を行い、薬の適応を判断している。現在、免疫チェックポイント阻害剤の主タイプである「抗PD-1抗体」は、異なるメーカーより2種類「オプシーボ（ニボルマブ）、キイトルーダ（ペムプロリズマブ）」が、それぞれ別の抗体試薬とメーカー指定の専用装置を用いて検査を行う必要がある。このため医療機関は検査会社に外注する 경우가多く、その場合結果が判明するために7-10日前後を要することが課題となっている。

さらに、オプシーボ（ニボルマブ）、キイトルーダ（ペムプロリズマブ）、両抗体ともに同じPD-1を標的とする抗体医薬品でありながら、感度（抗体検査の定量的有効性・抗体の力価の差）が異なるため、2種類各々の免疫染色抗体による適応決定検査が必要になっているのが課題である。

・薬剤適切投与量決定について

従来、最適な薬剤投与量を診断するための「適切投与量決定」については、液体クロ

マトグラフィー等の大型分析装置を用いて長時間検査が必要なため、検査自体を行わない場合が多く、最適な投与量の検討が、課題となっている。 適応疾患や、患者数の増加は、見込まれるが、免疫チェックポイント阻害剤における適切投与量決定が簡便に出来る技術開発が求められている。得られる技術によって患者様ごとに投与量を決定する個別化医療を実現し、副作用を抑制し、かつ治療効果を最大にする。

• 電界攪拌技術

秋田県産業技術センターは、電界攪拌技術を独自に開発してきた（図1）。これはマイクロリットルオーダーの微小液滴に対して、非接触に電界を与えると、これまで困難であった液滴内の攪拌を行う技術。本技術はすでに、国立大学法人秋田大学と共同で、従来2時間以上要する免疫組織染色を30分以内で行える技術として開発、平成26年度に電界攪拌染色装置として上市済みである。

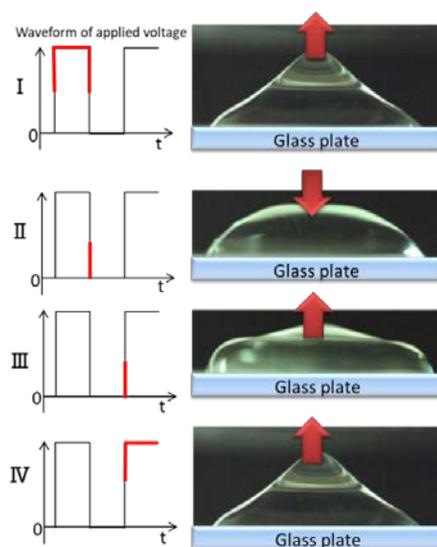


図1 電界攪拌技術

【研究目標】

本事業は、免疫チェックポイント阻害剤の治療の普及を加速させるべく、従来の煩雑な抗体適応決定検査を一本化させ、患者のQOLを確保する簡便な投与量決定検査時間を1/4に迅速化し、各々の機能要素である抗PD-1抗体病理組織染色用人工キャリブレーターと電界攪拌機能を与えた抗PD-1抗体ELISA対応アナライザーを開発する。

本事業は、第4の抗がん剤と呼ばれる免疫チェックポイント阻害剤の普及を加速させるために、治療管理における新たな社会的訴求を踏まえて、検体処理、染色工程や診断

基準の異なる 2 つの PDL1 免疫組織化学染色の相互互換を図るための技術開発を行う。初めに PD-L1 病理組織染色用人工キャリブレーターを用いて電界攪拌迅速免疫組織染色装置によって「適応決定」を行う。さらに、ベッドサイトで抗 PD-1 抗体適切投与量を“迅速”に決定するための電界攪拌を用いた ELISA 向け血中抗 PD-1 抗体濃度アナライザーへとそれぞれの機能性の高度化を図る。

本技術の高度化は、免疫チェックポイント阻害剤の適応決定検査を従来の薬剤ごとから、1 回へ一元化させること、さらに血中濃度測定時間を従来の 4 時間から 60 分以内へと迅速化を可能にする。現在、新薬のため適切投与量についての知見が蓄積されていないという課題が存在し、免疫チェックポイント阻害剤における薬剤適切投与量の決定が簡便になされる技術開発が求められている。本事業により得られた技術によって、体外診断の簡略化、患者のQOLの向上に貢献する。

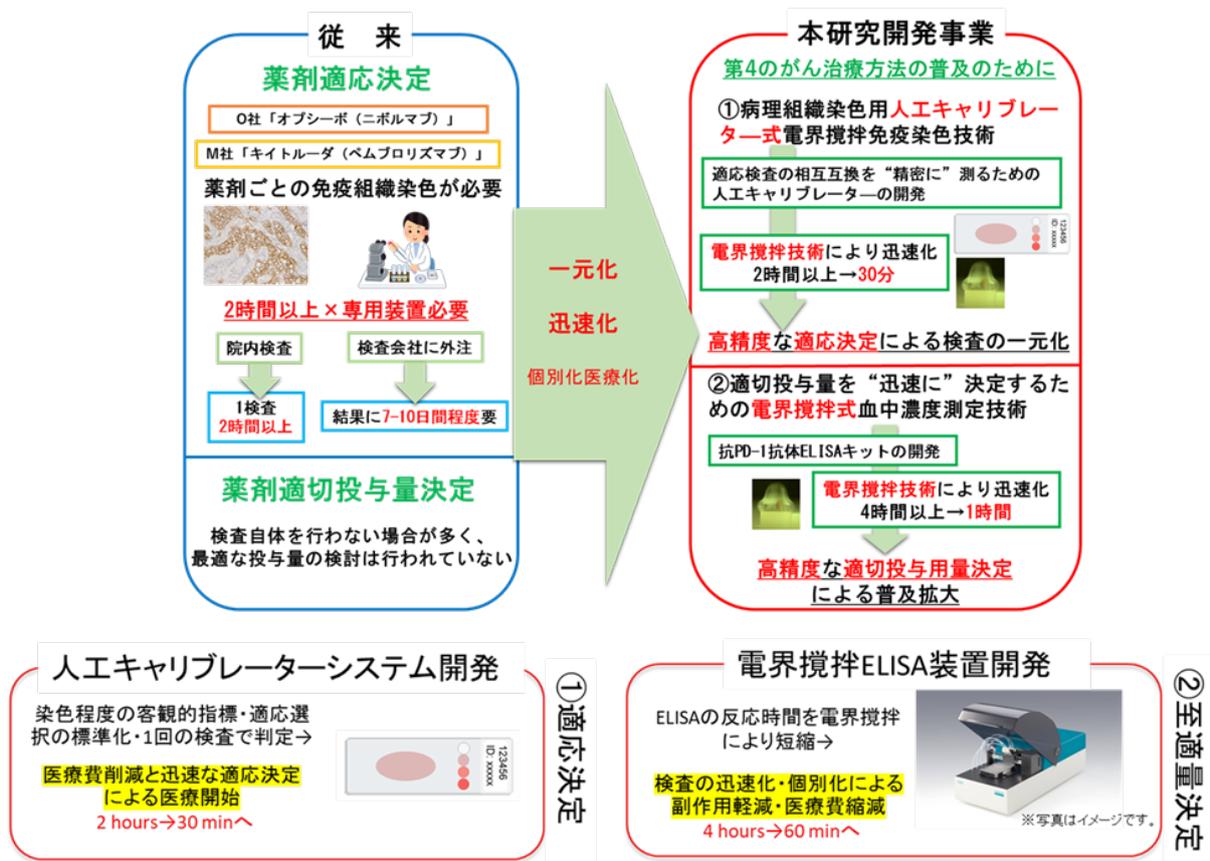


図2 本事業の概要

【新技術を実現するために解決すべき研究課題】

(十二) 測定計測に係る技術に関する事項

1 測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標

(3) 川下分野横断的な共通の事項

①川下製造業者等の共通の課題及びニーズ

ア. 高機能化

カ. 低コスト化

ア. 高機能化

薬剤適応決定：同じPD-1を標的とする免疫チェックポイント阻害剤は、薬剤によって個々に感度（抗体検査の定量的有効性）が異なり、各々に検査が必要。現状、共通の病理診断基準を利用することが可能であるが、常に同じ染色性を示す定量的有効性が担保された人工キャリブレーターが存在しない。また、検査に2時間以上要しており、迅速性も課題である。

薬剤適切投与量決定：現状、複雑な血中濃度の標準検査法に委ねられている。臨床現場においては迅速かつ精緻な検査技術の確立が求められている。

カ. 低コスト化

薬剤適応決定：オブジーボ、キイトルーダの適応を診断するための煩雑な免疫組織染色作業のため外注に出すことも多いため、それぞれの検査毎に費用が掛かるという課題が存在する。

薬剤適切投与量決定：免疫チェックポイント阻害剤は現状、医療費が高額であることが課題となっている、一方、医療面での重要性に富んでいることから、経済性への追求が看過されている。これまで、患者様個人個人の投与量が容易に得られる技術開発がなされていないため、本技術開発によって、多くの患者様の血中濃度を測定することで副作用が抑制され、かつ治療効果が最大となる適切投与量が分かるようになり、将来、低コスト化に繋がる。

1-2 研究体制

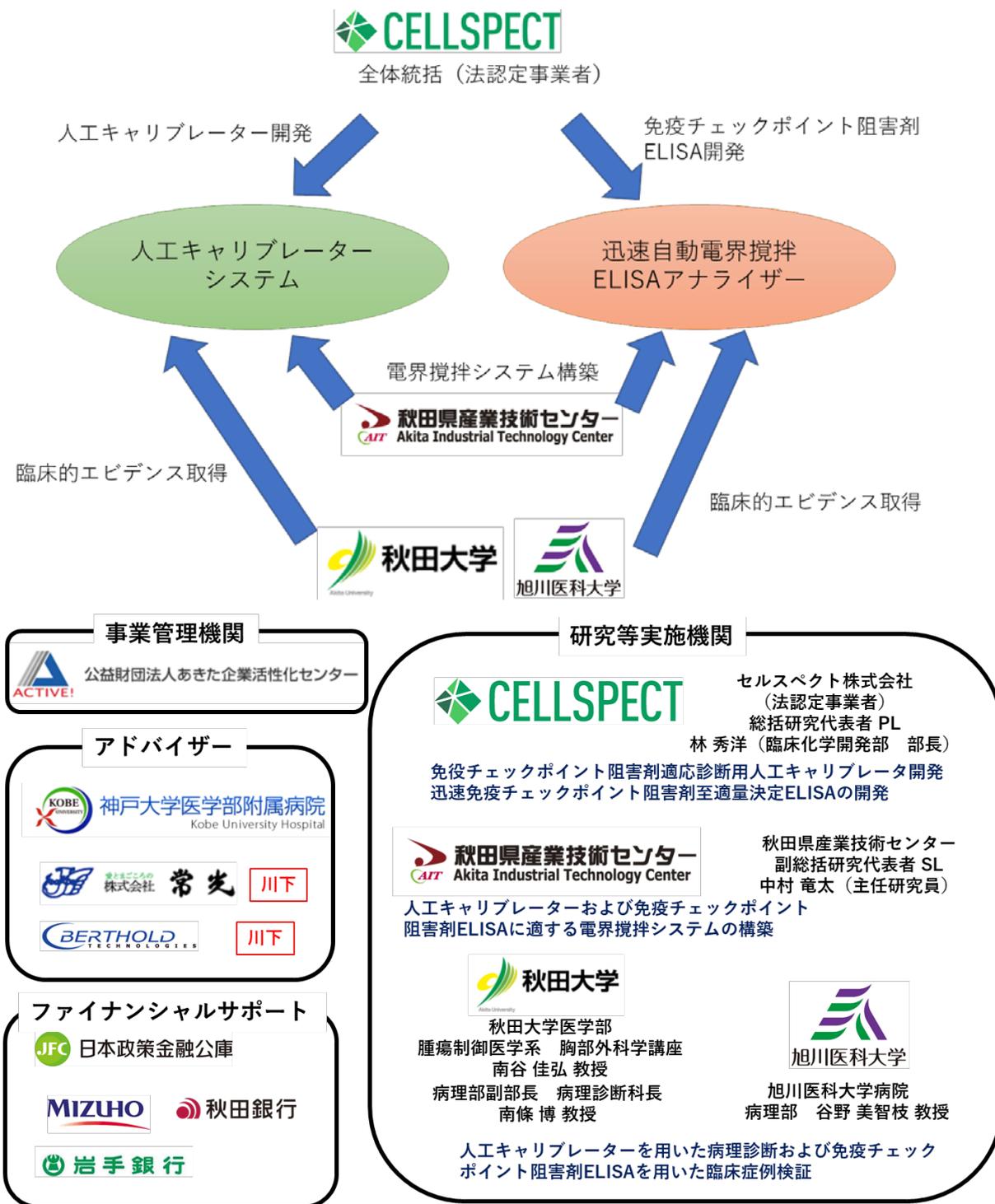


図3 研究体制図

1-3 成果概要

【抗 PD-1 抗体病理組織染色用人工キャリブレーター】

免疫チェックポイント阻害剤適応診断に共通使用できる人工キャリブレーターの開発に成功したことを凍結切片およびパラフィン切片において確認した。さらに電界攪拌技術を導入し、人工キャリブレーターを用いた迅速免疫組織染色の適用に成功した。また、臨床試験において、画像解析ソフトを用いて人工キャリブレーターの染色強度を数値化し検量線を得ることに成功した。人工キャリブレーターによる判定結果と既存診断法の病理診断結果が 95%以上一致することを達成した。

【抗 PD-1 抗体 ELISA 対応アナライザー】

電界攪拌条件の最適化により、吸光度が静置状態と比べて約 2.8 倍高く、かつ、ばらつきの変動係数を目標である 20%を大きく上回る最小 5.2%を達成できた。加えて ELISA 時間をトータル約 40 分で行うことが出来、本年度の目標である測定時間 1 時間以内を達成することが出来た。既存 ELISA 法による測定値と電界攪拌 ELISA 法による測定値を比較した結果、相関関係は良好であった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

セルスペクト株式会社 メディカルサイエンス部 林 秀洋

電話 080-5734-9809

FAX 019-903-0418

E-mail hhayashi@cellspect.com

第2章 本論一（1）

抗PD-1 抗体病理組織染色用人工キャリブレーター

【1-1】人工キャリブレーターの開発

これまで、免疫チェックポイント阻害剤の一つであるキイトルーダでは扁桃上皮が含まれた扁桃組織もしくは胎盤組織を、ニボルマブでは陽性細胞株を用いて染色性の確認を行う陽性コントロールとしてきた。これらは共通でない上に、染色強度が一定でない。そこで、免疫チェックポイント阻害剤適応診断に共通使用できる人工キャリブレーターを開発した。人工キャリブレーターは結合させるタンパク量を変えることにより染色強度をコントロールすることができ、抗体の種類に依存しない適切な強度の安定した染色結果を得ることができる。

1) 人工キャリブレーターのフロー合成法の検討

フロー合成法は液を最初から混ぜ合わせてしまうバッチ法と比較して、精密な温度制御、高速混合可能および反応時間制御が容易であるという利点がある。

上記のフロー合成法を取り入れたことによって均質な反応が可能となり、免疫組織染色の際に人工キャリブレーターの色ムラ発生が抑制された。

2) パラフィン切片、凍結切片を用いた人工キャリブレーターの免疫組織染色比較

パラフィン切片は長期保存に適した病理検体であり、凍結切片は迅速検査に適した病理検体である。パラフィン切片と凍結切片とも一般的な方法であるため、どちらの切片においても染色性の比較検討を行った。パラフィン切片、凍結切片ともに良好な染色像が得られ、また染色性に差も認められなかった。このため、人工キャリブレーターがパラフィン切片、凍結切片の免疫組織染色ともに適用可能であることが確認できた（図3）。

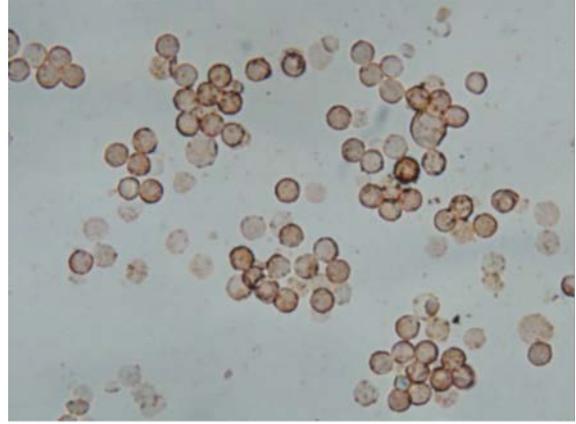
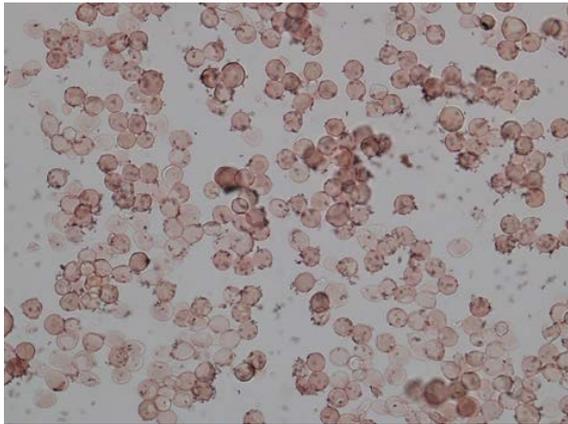


図4 パラフィン切片（左）と凍結切片（右）を用いた人工キャリブレーター免疫組織染色

【1-2】抗 PD-L1 抗体人工キャリブレーター用電界攪拌免疫組織染色システムの試作開発

電界攪拌技術を用いた 30 分以内で免疫染色が可能である迅速免疫染色のプロトコールの開発に成功した。実際に使用する際には検体組織を同時にスライドガラスに貼りつけ免疫組織染色を行い、工程中の抗原抗体反応部分に電界攪拌技術を導入する。電界攪拌技術には最適な電界印加を行うことが迅速化に重要であるため条件を検討した。電界攪拌に使用するはっ水領域を決定し、攪拌溶媒は純水を用いて、液滴が活発に動く周波数を探索した。印加電圧は一定とし、それぞれの液量、電極間距離における活発に攪拌が行われる周波数を表している。電界攪拌法による一次抗体反応、二次抗体反応をそれぞれ15分ずつ行い、良好な染色像が得られた（図5）。また、電界攪拌法により免疫組織染色に要した時間が1時間以内とすることを達成した。また、激しく攪拌することによる人工キャリブレーターの剥離も認められなかった。



図5 開発した PD-L1 人工キャリブレーターを乗せたスライドガラス

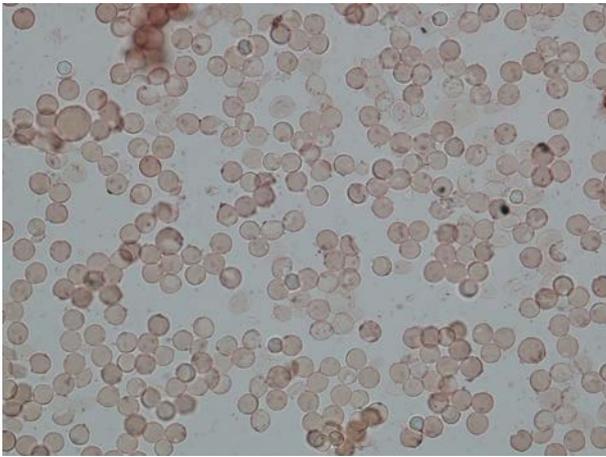


図6 電界攪拌法による PD-L1 人工キャリブレーターの免疫組織染色

【1-3】人工キャリブレーターと既存診断法の相関試験

予め PD-L1 陽性であることが確認されている検体（図6）と人工キャリブレーター（図10）を同時に染色し、染色程度の比較を行った。検体は 4 μm に薄切されたパラフィン切片を用いた。人工キャリブレーターに担持する PD-L1 タンパクの量を反応させるタンパク溶液の濃度を変えることで差をつけ、染色度合いに差を出した染色後、画像解析ソフトにより染色強度を輝度へ変換し、タンパク溶液無しのキャリブレーターの輝度を 0 としてタンパク溶液の濃度ごとに差を取り検量線を作成した。2 種類の抗 PD-L1 抗体クローンで同一強陽性肺癌組織検体等を染色し、染色度合いを人工キャリブレーターにより評価した。人工キャリブレーターの染色画像から染色強度の閾値を設定し、組織における染色部位を特定することに成功した。その結果から、Combined Positive Score (CPS) を評価した。検体は頭頸部、肝切除組織、胸壁腫瘍、リンパ節等の様々な組織を対象として、かつ CPS は 95%–10%と広い範囲を対象とした。通常の病理検査では各臨床試験で検査精度が保障された単一の PD-L1 抗体で組織の免疫組織化学染色を行うが、今回は代用可能と考えられる他の染色抗体でも検査を行った。人工キャリブレーターの染色強度から CPS を評価したところ、病理医の診断結果と一致した。

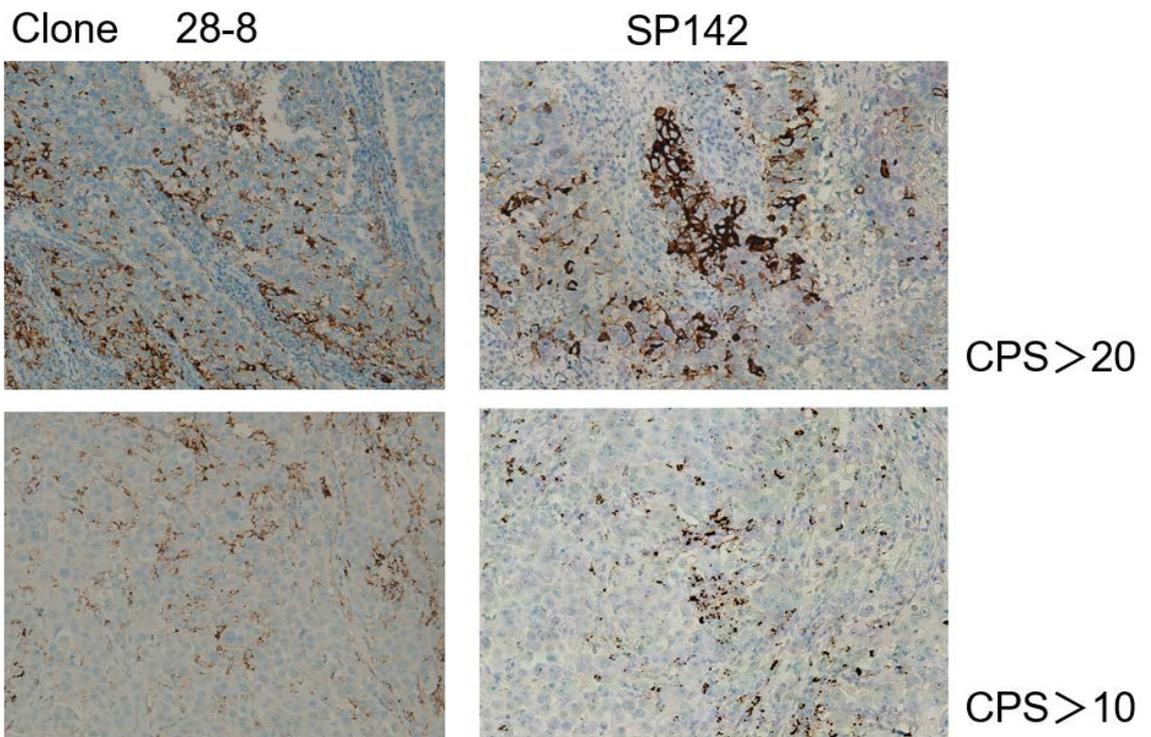


図7 PD-L1 陽性検体の染色画像

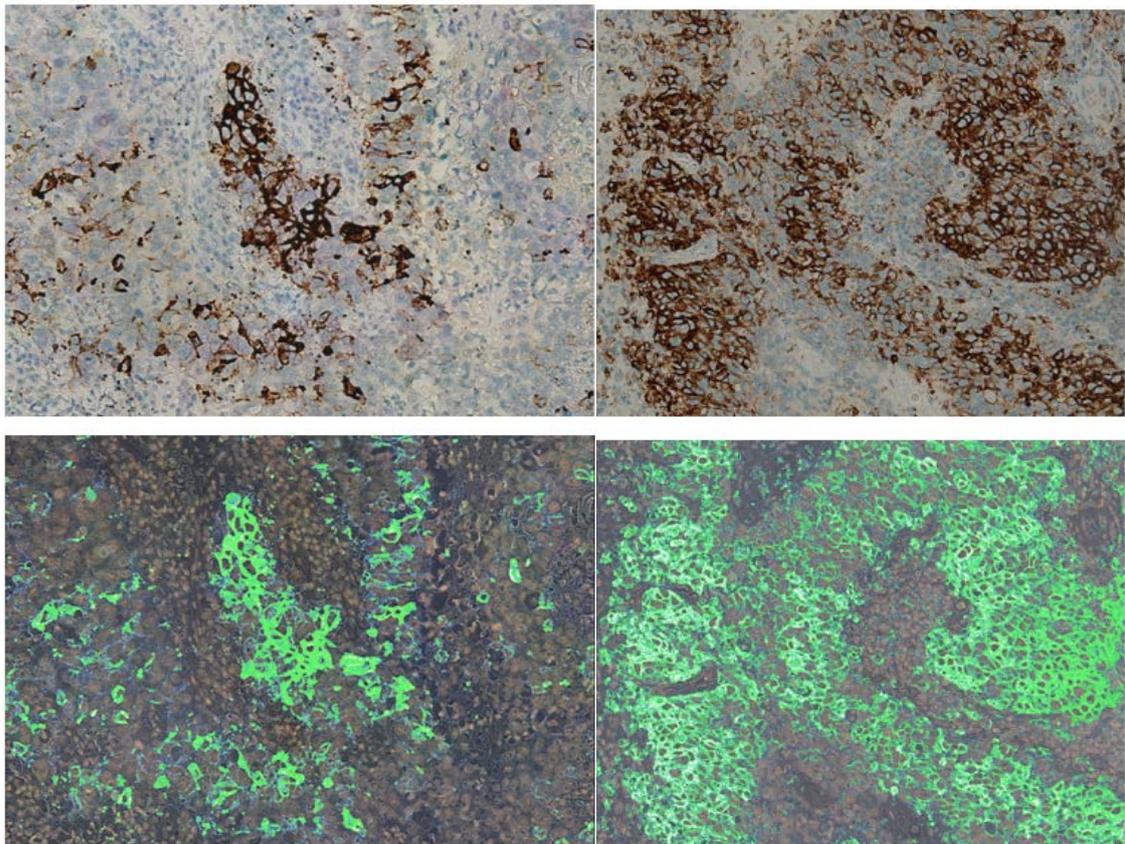


図8 画像解析により染色されていると判定された部分（下画像 緑）

抗 PD-1 抗体 ELISA 対応アナライザー

【2-1】抗 PD-1 抗体 ELISA に適する電界攪拌技術を用いた迅速アナライザーの試作開発

1) 電界攪拌用マイクロプレートと専用電極の開発

開発した 2 種類の電界攪拌用マイクロプレートを図 8 に示す。電界攪拌を行うための液滴をドーム型にするための台座がついているのが特徴である。また、本スライドプレートに対応する専用の電界攪拌下部電極を製作した。その電極を図 11 に示す。本電極を用いることで合計 96 サンプルまで同時に電界攪拌可能となる。



レンズ型



平面型

図 9 開発した電界攪拌用マイクロプレート

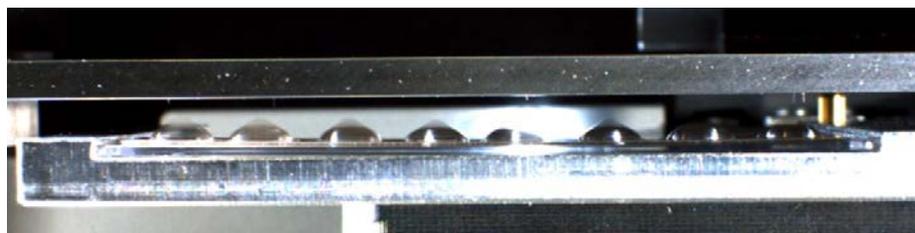


図 10 電界攪拌挙動

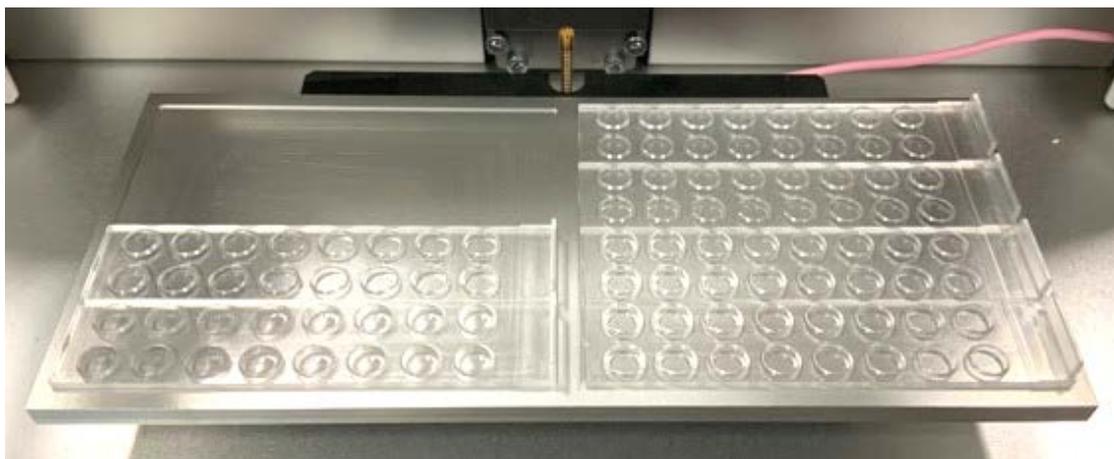


図1 1 専用下部電極

2) 抗 PD-1 抗体 ELISA キットを用いた電界攪拌迅速 ELISA

セルスペクト製抗 PD-1 抗体 ELISA キットと市販の高撥水印刷スライドガラスプレートを用い、電界攪拌 ELISA 試験を行った。電界攪拌 ELISA 試験後におけるそれぞれの印加周波数の発色写真を図1 2に示す。この結果から、電界印加により発色が増強されるとともに、CV 値はすべての周波数帯で 10%以下、特に 45Hz においては 5.2%と小さい結果となり、セルスペクト社製抗 PD-1 抗体 ELISA キットを用いて、電界攪拌 ELISA の有効性を確認することができた。

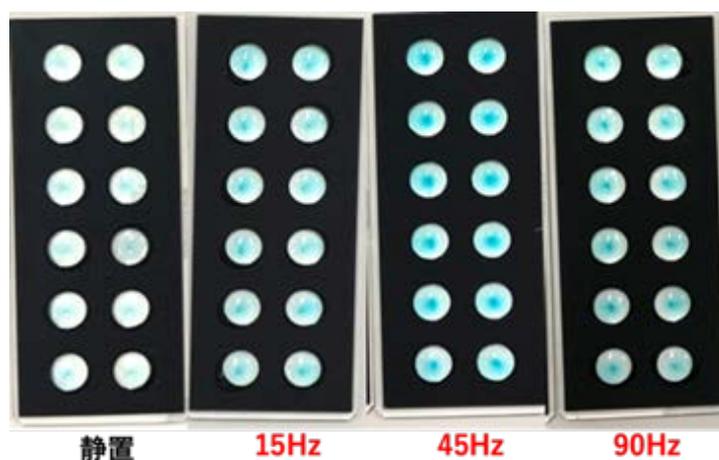


図1 2 電界攪拌試験結果

【2-2】抗 PD-1 抗体 ELISA 用自動電界攪拌迅速 ELISA アナライザーの開発

抗 PD-1 抗体 ELISA 用自動電界攪拌迅速 ELISA アナライザーを開発した。これまで時間を要していた洗浄操作が自動化されることにより、測定時間を目標の 1 時間以内である 40 分まで短縮することに成功した。

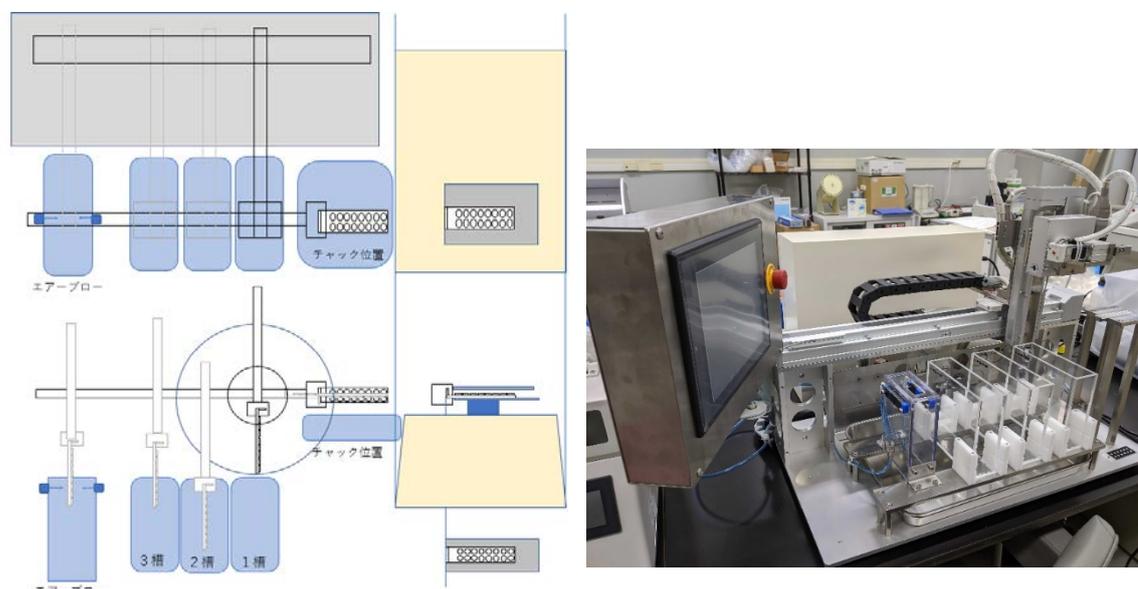


図 1.3 抗 PD-1 抗体 ELISA 用自動電界攪拌迅速 ELISA アナライザー

【2-3】抗 PD-1 抗体 ELISA による血中濃度測定試験

患者検体を用いて抗 PD-1 抗体の血中濃度測定試験を行った。検体は抗 PD-1 抗体であるキイトルーダ（Pembrolizumab）を投与した直後に採血を行い、速やかに血清を分離した。電界攪拌 ELISA 法による検量線は高濃度範囲を除いて直線に回帰した（図 1.4）。既存 ELISA 法と電界攪拌 ELISA 法の相関比較を行ったところ、検量線から求めた測定値には差異が認められたものの、相関関係は概ね一致した。測定値が一致しない原因を明らかにするには抗原抗体反応を用いない LC-MS 等の ELISA 法以外で測定値を確認する必要がある。

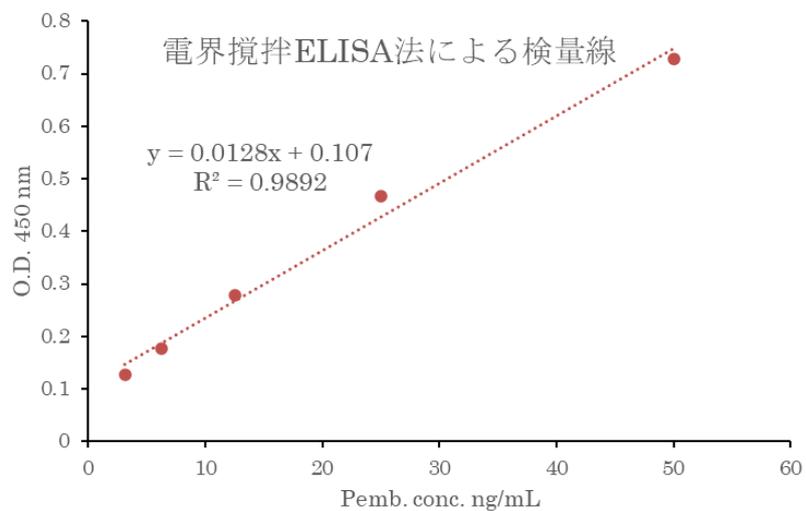


図14 電界攪拌 ELISA 法による検量線

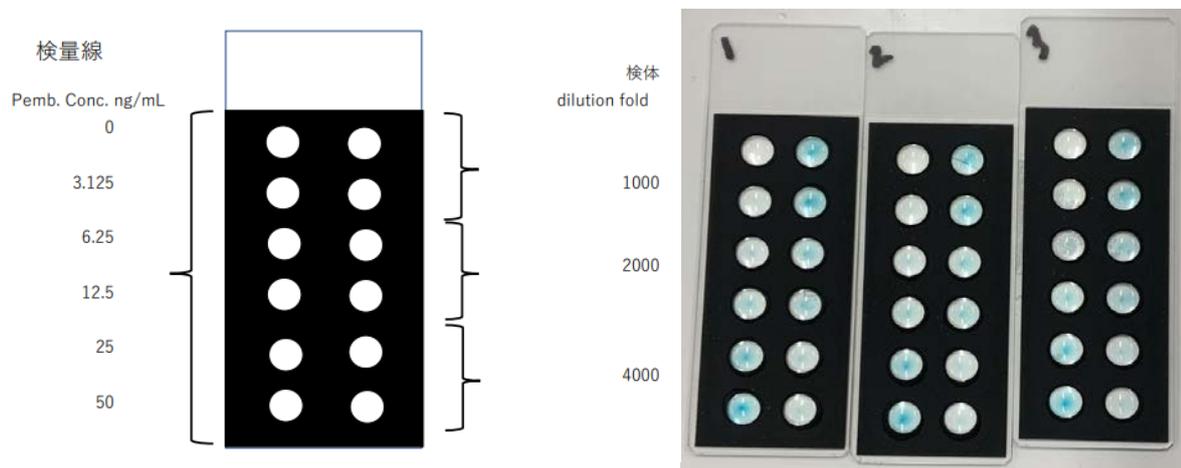


図15 プレート配置図（左）と検体測定時の発色（右）

最終章 全体総括

1 研究開発成果と課題

【1-1】人工キャリブレーターの開発

免疫チェックポイント阻害剤適応診断に共通使用できる人工キャリブレーターの開発に成功した。

【1-2】抗 PD-1 抗体人工キャリブレーター用電界攪拌免疫組織染色システムの試作開発

電界攪拌の最適な電界印加条件の検討や、洗浄工程の最適化により目標の 30 分以内で免疫染色が可能な迅速免疫染色プロトコルの開発に成功した。

【1-3】人工キャリブレーターと既存診断法の相関試験

人工キャリブレーターの判定結果と既存診断法の病理診断結果が 95%以上一致することを達成した。今後より多くの検体を用いて有効性を確認する必要がある。

【2-1】抗 PD-1 抗体 ELISA に適する電界攪拌技術を用いた迅速アナライザーの試作開発

測定値のばらつきを表す変動係数が目標である 20%以下よりもさらに低い 10%以下とすることに成功した。

【2-2】抗 PD-1 抗体 ELISA 用自動電界攪拌迅速 ELISA アナライザーの開発

ELISA に要する時間を目標である測定時間 1 時間以内を大きく上回るトータル 40 分に短縮することが出来た。

【2-3】抗 PD-1 抗体 ELISA による血中濃度測定試験

抗 PD-1 抗体を対象とした電界攪拌 ELISA 法による検体の測定に成功した。既存 ELISA 法による測定値と電界攪拌 ELISA 法による測定値を比較した結果、相関関係は良好であったものの、LC-MS 等の抗原抗体反応の原理を用いない方法でさらに検討を行う必要がある。

2 研究開発後の課題・事業化展開

事業化へ向けてセルスペクト株式会社は体外診断用医薬品製造販売業許可および第2種医療機器製造販売業許可を有し、体外用医薬品登録製造所および医療機器登録製造所をすでに稼働させている。電界攪拌技術は秋田県産業技術センターが要素技術を持っており、秋田大学との共同研究により開発した自動染色装置ラピート IHC を医療機器としてサクラファインテックジャパン株式会社より上市している。また、セルスペクト株式会社は診断薬の開発経験が豊富であり、抗体医薬品 ELISA を上市している。抗 PD-1 抗体 ELISA 対応電界攪拌アナライザーは抗 PD-1 抗体のみならず、様々な抗体医薬品を含む抗がん剤に適用可能であり、がん治療の個別化医療全般に展開可能である。また、本事業で得られた検体解析技術は将来的に計画されている臨床検査所事業に活かせる。