



迅速かつ高感度な免疫測定試薬開発に向けたサメ抗体取得技術の適用

升田, 智史

(Degree)

博士 (科学技術イノベーション)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8961号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490186>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

迅速かつ高感度な免疫測定試薬開発に向けた
サメ抗体取得技術の適用

2024年1月

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

升田 智史

目次

第1章 序論.....	1
1.1. 医薬品としての抗体に求められる物理学的特性.....	1
1.2. サメ抗体のユニークな特性.....	2
1.3. サメのユニークな体内環境.....	5
1.4. ユニークな特性を示すサメ抗体の取得に向けた課題.....	6
1.5. 本研究の目的.....	9
参考文献.....	10
第2章 ユニークな特性を持つ VNAR を取得のための検討.....	13
2.1. 背景.....	13
2.2. 実験方法.....	13
2.3. 実験結果.....	15
2.4. 考察.....	19
参考文献.....	20
第3章 均一性の高い VNAR を調製するためのコンストラクト検討.....	21
3.1. 背景.....	21
3.2. 実験方法.....	21
3.3. 実験結果.....	23
3.4. 考察.....	25
参考文献.....	25
第4章 VNAR の物理化学的特性の解析.....	27
4.1. 背景.....	27
4.2. 実験方法.....	27
4.3. 実験結果.....	28
4.4. 考察.....	43
参考文献.....	46
第5章 先端技術研究の社会実装に向けた戦略構築.....	49
5.1. イノベーションアイデア.....	49

5.1.1. 免疫測定試薬に関わる技術の歴史.....	49
5.1.2. 歴史から考察される免疫検査分野のトレンド.....	51
5.1.3. 社会課題とイノベーションアイデアの創出.....	52
5.2. 技術戦略.....	53
5.2.1. 高親和性と高安定性を兼ね備えたサメ抗体の取得方法.....	53
5.2.2. 技術戦略まとめ.....	54
5.3. 知財戦略.....	55
5.3.1. 抗体に関連する特許.....	55
5.3.2. 免疫測定試薬の開発、および製造プロセスと参入障壁の関係.....	59
5.3.3. 免疫測定試薬におけるリバースエンジニアリングの可能性.....	60
5.3.4. 特許化と秘匿化の判断.....	61
5.3.5. 知財戦略まとめ.....	62
5.4. 事業戦略.....	62
5.4.1. 外部環境分析.....	62
5.4.2. 内部環境分析.....	75
5.4.3. 事業化に向けた戦略.....	81
5.4.4. 事業戦略まとめ.....	87
5.5. 財務戦略.....	87
5.5.1. 損益計算書(P/L)の予測.....	88
5.5.2. 貸借対照表(B/S)の予測.....	89
5.5.3. キャッシュ・フロー計算書(C/S)の予測.....	90
5.5.4. DCF 法による事業価値評価.....	91
5.5.5. 事業価値のリアルオプション理論に基づいた分析.....	95
5.5.6. 財務戦略まとめ.....	98
参考文献.....	98
第6章 結言.....	101
研究業績.....	103

謝辭.....	104
---------	-----

第1章 序論

1.1. 医薬品としての抗体に求められる物理学的特性

抗体は、治療用医薬品、体外診断薬用医薬品として利用されている。モノクローナル抗体を主原料とする製品の市場が益々成長している。例えば治療用の抗体は米国および EU で、2022 年までに、がん以外に対する治療薬抗体が 71 種類、がんに対する治療薬抗体が 52 種類、合計 123 種類、承認されている(図 1.1)。抗体は、がんだけでなく、自己免疫疾患や感染症、循環器系疾患等、多岐にわたる疾患領域で利用されている。これらのことから、モノクローナル抗体を主原料とする製品は今後も人々の健康に貢献し続けると予想される[1]。

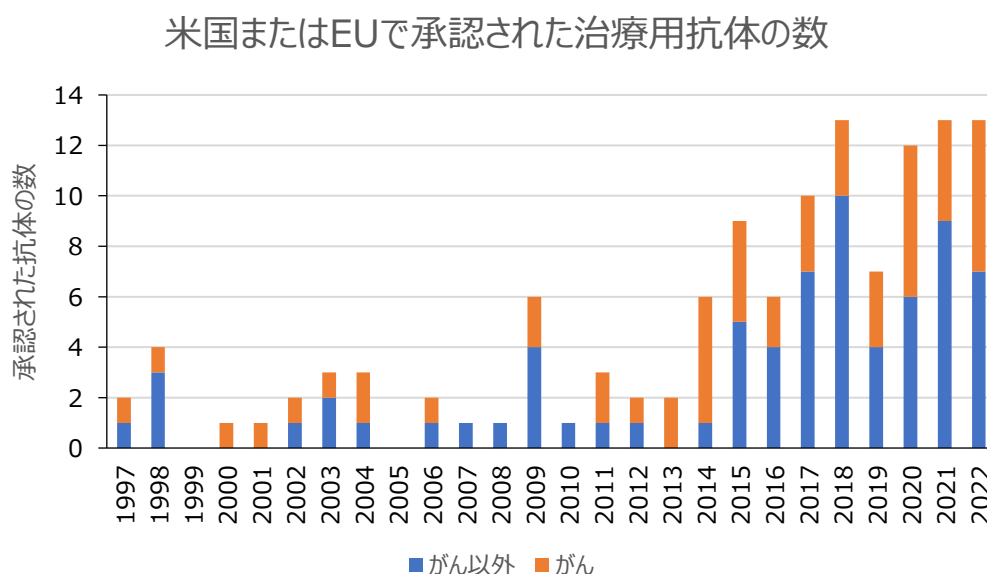


図 1.1 米国または EU で承認された治療用抗体医薬品の数(出所：Antibody Society(参考 URL①))の情報をもとに、筆者作成)

医薬品は人々の健康に大きな影響を与えることから、その原料として利用される抗体は優れた物理学的特性を示すことが要求される。このような開発する製品の持つべき機能や特性を仕様としてまとめたものは要求仕様と呼ばれる。医薬品の製品化に向けては、様々な要求仕様を満たす必要があるため、その開発可能性 (Developability) が低い。Developability とは、候補となる抗体が、スクリーニングおよび開発に成功する可能性を意味する。Developability の検証方法として、例えば抗原結合活性や熱安定性、純度等が評価される。製品の要求仕様に応じて、候補となる抗体の選別、またはそれらの特性の最適化が行われる。治療用抗体や診断薬用抗体の開発において、前臨床段階を含めると 99%以上が、要求仕様を満たさないため不採用となる[2]。Developability を下げる一つの要因は、候補抗体の大部分が初期スクリーニング段階で、抗原反応性に基づいた選別が行われることである[3]。す

なわち、初期スクリーニングの段階で、特殊な条件での抗原反応性や熱安定性、純度等の物理化学的特性が十分に注目されていない。初期スクリーニング段階で、様々な特性を有する候補抗体を拡充することが、Developability を向上させる上で非常に重要である。

1.2. サメ抗体のユニークな特性

ラクダやサメは、他の動物種と異なり軽鎖のない重鎖抗体を産生することが知られている。これらの抗体の可変領域は、シングルドメイン抗体(single domain antibody(sdAb))として利用可能である(図 1.2)。ラクダの sdAb は VHH(Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody)と呼ばれる。サメは、IgNAR(Immunoglobulin New Antigen Receptor)という重鎖抗体を産生し、その可変領域は VNAR(Variable domain of New Antigen Receptor)と呼ばれる sdAb である。これら sdAb は、熱安定性、可逆性、多量体化の容易さ、大腸菌での高発現、埋もれたエピトープへのアクセス等、従来の抗体(Immunoglobulin G(IgG))と比較してユニークな特性を持つことが知られている[4-8]。これらの理由から、免疫測定試薬や治療薬の原料抗体としての利用が期待されている[9]。

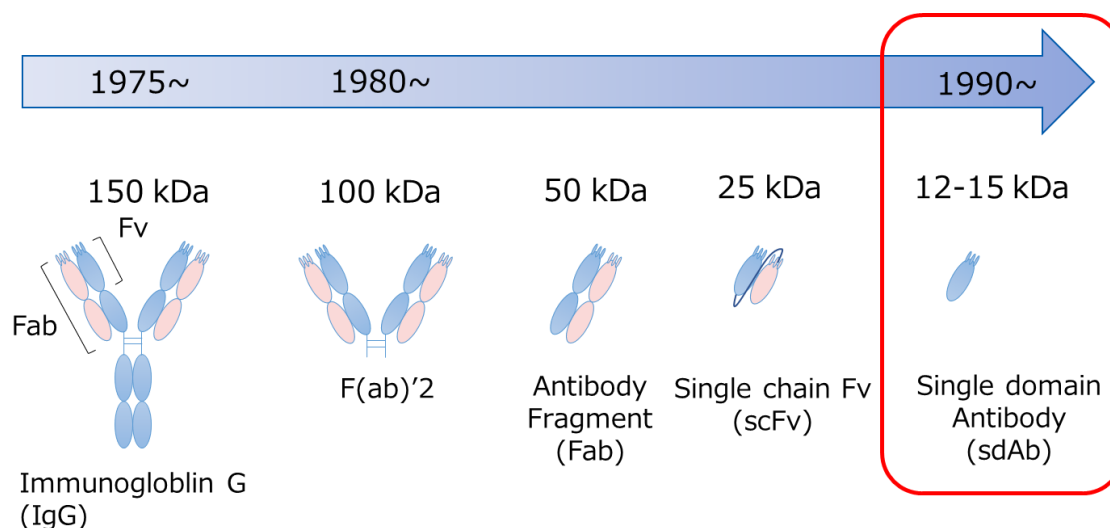


図 1.2 各抗体フォーマットの構造 (出所：筆者作成)

重鎖は青色、軽鎖は赤色で表示。各分子フォーマットが開発、あるいは発見された年代を上の矢印内に数字で示した。本研究では赤枠内で囲んだシングルドメイン抗体について取り扱う。

図 1.3 に VNAR、ヒト重鎖可変領域(VH)、VHH の構造の比較を示した。sdAb は主な結合部位である相補性決定領域 3(Complementarity Determining Region 3(CDR3))が、ヒト抗体と比較して長いことが知られている。

VNAR は 2 つの点で、産業利用が進んでいる VHH と異なる。まず VNAR は VHH と構造が異なることが特徴である。CDR2 が欠損しており、その代わりに超可変ドメイン 2(Hyper variable domain 2(HV2))および HV4 に多様性がある[7, 10](図 1.3)。よって VNAR

は動物界で最小の抗体分子であると言われている。免疫測定試薬においては、検体中の様々な物質が免疫測定試薬の原料抗体に結合することで偽高値となることが知られている。分子量を小さくし、非特異的に結合する部分(例えば Fc 領域)を排除することで誤診断の低減が期待される。

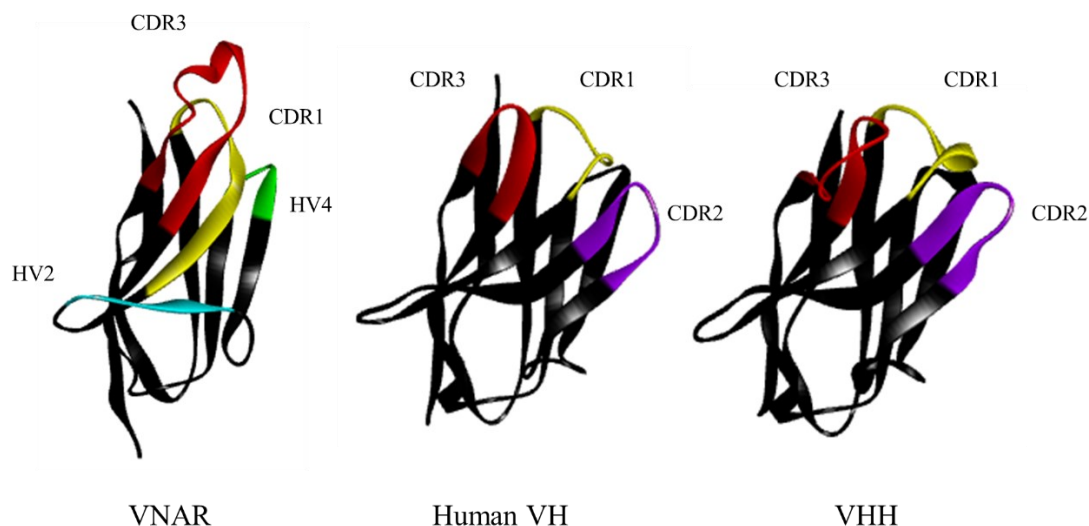


図 1.3 VNAR、Human VH、VHH の構造比較 (出所：筆者作成)

VNAR は PDB ID: 8HGI、Human VH は PDB ID: 3OGO、VHH は PDB ID: 4U3X を用いた。各立体構造を Discovery Studio 2020 を用いて表示した。CDR1 を黄色で、CDR2 を紫色で、CDR3 を赤色で、HV2 を水色で、HV4 を黄緑色で示した。

図 1.4 に示す通り、VNAR は Cys 残基の数と位置によっていくつかのタイプに分類される[11, 12]。図 1.4 にオレンジ色の丸で示す Cys 残基は VNAR に共通する Cys 残基(Canonical Cysteine)でありフレームワーク領域(FR)1 と FR3b に存在し、これら Cys 残基同士でジスルフィド結合を形成する。Canonical Cysteine 以外の Cys 残基は、Non Canonical Cysteine と呼ばれ、図 1.4 の白色の丸で示すように位置と数はタイプにより異なる。CDR1、CDR3、HV2 および HV4 は灰色で示した。FR は白色で示した。

タイプ I は FR2 および FR4 に Non Canonical Cysteine があり、それぞれ CDR3 内の 2 つの Non Canonical Cysteine とジスルフィド結合を形成する。コモリザメ(英語名：Nurse shark、学術名：*Ginglymostoma cirratum*)においてのみタイプ I が報告されている[13, 14]。タイプ I の CDR3 の長さは、15–21 残基とタイプ II より長い[15]。

タイプ II は、Canonical Cysteine に加えて、CDR1 と CDR3 に 1 つずつの Non Canonical Cysteine を有し、これら Non Canonical Cysteine 同士でジスルフィド結合を形成することにより、CDR1 と CDR3 が近接する[15]。このタイプは CDR3 を FR に固定するジスルフィド結合が存在しないため、CDR3 が突出した構造を形成し、酵素活性部位などの溝を認識することができる[16]。現在までに報告されている宿主のサメはタイプ II を共通して保有し

ている。

タイプⅢは、生後一年未満のサメに見られ、免疫系が成熟する前の病原体に対する防御の第一段階として機能すると考えられている[13]。タイプⅢはタイプⅡと同じく CDR1 と CDR3 の Non Canonical Cysteine 同士で追加のジスルフィド結合を形成する。CDR1 の Non Canonical Cysteine の後に Trp 残基が位置することが特徴である。タイプⅢの CDR3 の多様性は非常に低い[15]。

タイプⅣは、Canonical Cysteine のみを有し、それ以外の Cys 残基を含まない。そのため、他のタイプと比較してより柔軟性に富む。sdAb は二量体化すると活性が低下する場合があるが、このタイプは柔軟性があることにより活性を維持したとの報告がある[17]。

タイプⅤは、カリフォルニアネコザメで発見されたタイプであり、Canonical Cysteine 以外に CDR1 と CDR3 内にそれぞれ 2 つずつ Non Canonical Cysteine を含み、それらで追加の 2 つのジスルフィド結合を形成する[12]。

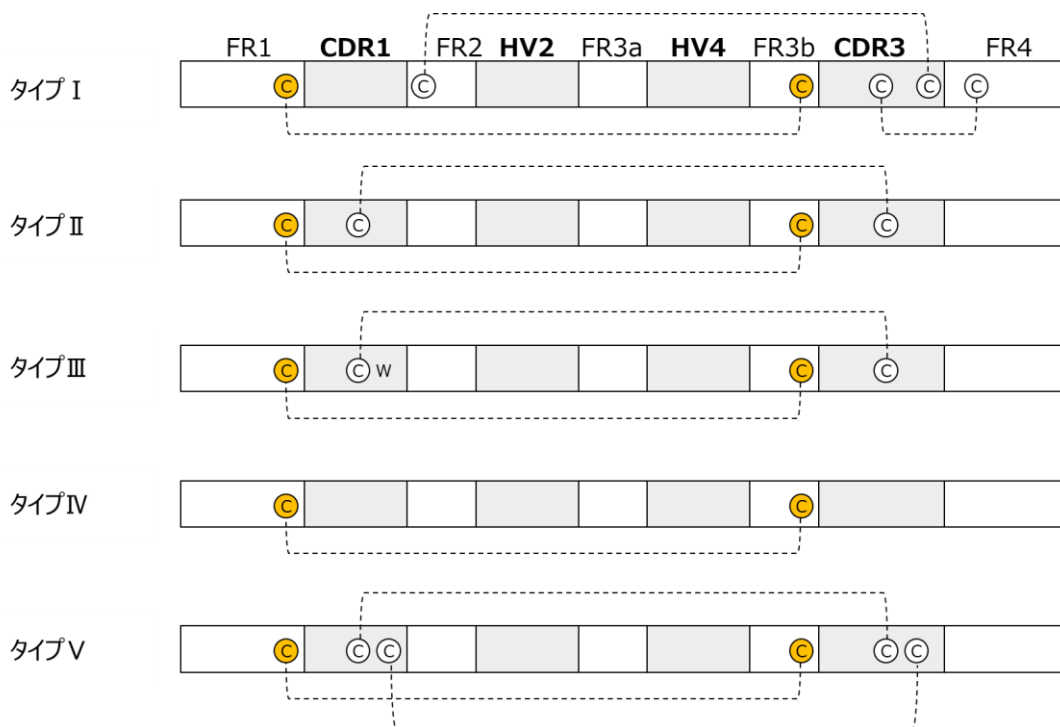


図 1.4 VNAR の Cys 残基によるタイプ分類(出所：筆者作成)

Canonical Cysteine はオレンジ色で示した。Non Canonical Cysteine は白色で示した。CDR1、HV2、HV4 および CDR3 は灰色で示した。タイプⅢは CDR1 の Cys 残基のとなりに Trp 残基を含み、W で示した。Cys 残基同士を繋ぐ破線はジスルフィド結合を示す。

VNAR と VHH の二つ目の違いとして、サメがヒトやラクダなどの哺乳動物と比較して進化系統的に遠いことが挙げられる。進化系統的に遠いということは、サメに哺乳動物に共通する配列を有するタンパク質を免疫した場合、免疫原性を示す可能性があるということ

である。軟骨魚類と硬骨脊椎動物は約 4 億 5000 万年前に分岐したと考えられている。そのためサメの体内に存在するタンパク質配列はヒトのタンパク質との相溶性が低い。例えばアルブミンの相溶性を比較すると、サメなどの軟骨魚類の体内で発現するアルブミンはパルブアルブミン(Parvalbumin、PDB ID: 1B8C)で、ラクダはヒトと同じくアルブミンを産生する(アラビアラクダ由来 AF-A0A5N4EFP0-F)。ヒトのアルブミン(Human Serum Albumin(HSA)、PDB ID: 1AO6)との配列相溶性は、ラクダのアルブミンが 84.7%、サメのアルブミンは 16.3%でありサメのアルブミンの配列相溶性が非常に低い。図 1.5 に立体構造の比較を示した。ラクダのアルブミンは HSA と類似した構造であるが、サメのアルブミンは大きく構造が異なる。ラクダ抗体を産生するラクダは哺乳類であるため、哺乳類に共通するアミノ酸配列に対しては免疫原性が低く、抗体を作製することが一般に困難である。一方、サメのタンパク質とヒトのタンパク質との配列相溶性は低く、サメにとってはヒトタンパク質に対する免疫原性が高いため、上記のような従来の宿主動物では取得困難なターゲット分子に対する抗体が取得できる可能性がある。

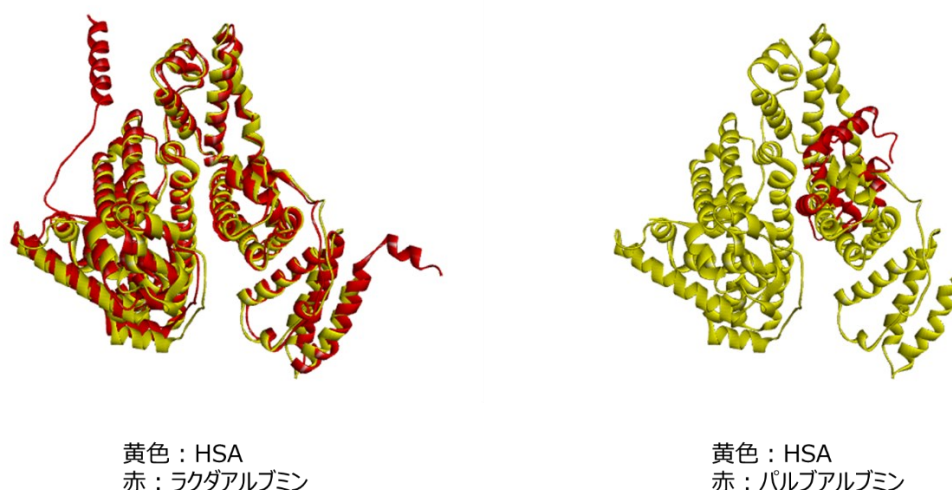


図 1.5 ヒト、ラクダ、サメのアルブミンの構造比較(出所：筆者作成)

ヒト血清アルブミン HSA(PDB ID: 1AO6)、ラクダアルブミン(AF-A0A5N4EFP0-F)、パルブアルブミン(PDB ID: 1B8C)の構造を示した。ラクダのアルブミンとサメのアルブミン(パルブアルブミン)を赤色で示し、HSA の立体構造をそれぞれ黄色で示した。Discovery Studio 2020 を用いてそれぞれの構造を重ね合わせた。

1.3. サメのユニークな体内環境

サメの血清成分と体温は、他の宿主動物と比較して非常に特徴的である。サメは、体内で生成されたアンモニアを尿素に変化させ体内に蓄積させることで浸透圧を調節すると考えられている。このことから、サメは血清中に 300–400 mM の尿素を含むことで、1000

mOsm/kg の浸透圧を調節している[18]。またサメの血清中には、340–500 mM の NaCl を含むことも特徴的である。サメの体温については、変温動物であることから、海水と同等である。海水は一般に 15–25°C であることから、哺乳類の体温と比較して低い。これらのことからサメの特徴的な血清成分、温度において、サメのタンパク質は高い活性を示す可能性がある。このように生物学から着想したアイデアを工学に活かし、所望の機能を獲得しようとする試みは、生物模倣(バイオミメティクス)と呼ばれている。

本論文で取り扱うサメはエイラクブカ(英語名: Japanese Topeshark、学名: *Hemitriakis japonica*)で、日本や中国、韓国の海域に生息する体長約 1 m のドチザメ科の軟骨魚類である。従来、サメは、捕獲や飼育、抗体取得のための免疫技術が確立されていなかったことから、サメ抗体の取得は容易ではなかった。愛媛大学 竹田浩之准教授は、愛媛県水産研究センターなどと共同研究を行い、愛媛県伊予灘に多数生息する、小型で歯の尖っていない安全なサメであるエイラクブカを活用し、VNAR を作製するプラットフォームを確立した[19]。

エイラクブカは、2つの点で他のサメよりも利点がある可能性がある。まず、免疫期間が短い可能性である[19]。コモリザメ、カリフォルニアネコザメ、ウォビゴンザメ、タケザメでは通常 5–6 か月の免疫期間を要した一方で、エイラクブカは 8 週間で血清抗体価の上昇を認めた。抗原種や免疫方法により免疫期間が変化することが想定されるが、免疫期間の短縮は、抗体取得の効率化に向けて有用性が高い。

2 つ目は、これまで解析の十分に進んでいないタイプの VNAR を、エイラクブカが産生する可能性である。既報の論文では、タイプ I およびタイプ II の配列とその物理化学的特性について主に研究がなされていた。タイプ III は多様性が少なく産業応用の可能性は低い。タイプ IV および V の配列の取得とその物理化学的な特性に関する情報は限定的で、且つ原料抗体としての有用性が高い可能性がある。サメの種類により、産生される VNAR のタイプが異なることが知られており、エイラクブカからタイプ IV または V の VNAR を取得できる場合、情報が限定的であったタイプの物理化学的特性に関する知見が蓄積されるため、今後のサメ抗体の社会実装に向けた非常に有益な情報となる。

1.4. ユニークな特性を示すサメ抗体の取得に向けた課題

サメ抗体は産業応用に向けて高いポテンシャルを有することから、治療用抗体および免疫測定試薬の原料抗体としての利用が期待されている[9]。これら医薬品の原料抗体は、優れた物理化学的特性を示すことが必要とされている。なぜなら、人々の健康に大きな影響を与えることから、品質の高さを担保する必要があるためである。そのため、商品開発の成功確率が他業種の商品と比較して低い。これらのことから、優れた特性を示す候補抗体を多数確保することが成功確率を上げるために重要である。

標的抗原をサメに免疫し、その脾細胞を用いてファージライブラリを作製し、ファージディスプレイ法により VNAR を取得する方法が報告されている[20–22]。ファージディスプレイ法は、2018 年にノーベル賞を受賞した方法であり、ヒュミラを始めとする様々な医薬

品の原料抗体(治療、診断用途を含む)の作製に大きく貢献した有用性の高い方法である。この方法は、ファージウイルス粒子上に目的のタンパク質(今回の場合はサメ抗体)を提示したファージライブラリ(アミノ酸配列の異なる抗体群)を準備し、標的抗原との相互作用が強いクローンのみを濃縮する方法である。結合して溶出するまでの操作をパニングと呼ぶ(図1.6)。また一般的に3-5Round程度パニングを行うことで、所望の機能を有するクローンの濃縮が行われる。選別されたクローンは、ランダムピックアップ法または次世代シーケンサー(Next generation sequencer(NGS))による抗体遺伝子の配列解析が行われる。ランダムピックアップ法とは、溶出されたファージを大腸菌に感染させた後、寒天培地に播種することで単クローン化し、遺伝子解析を行う方法である。NGSはファージライブラリの抗体遺伝子を鋳型として、単クローン化せずに、遺伝子抽出、網羅的に解析を行うことで大量の遺伝子配列を解析する方法である。両者の違いは解析数であり、ランダムピックアップ法では、 10^2 — 10^3 程度であるが、NGSでは 10^4 — 10^6 程度の配列解析が可能である。

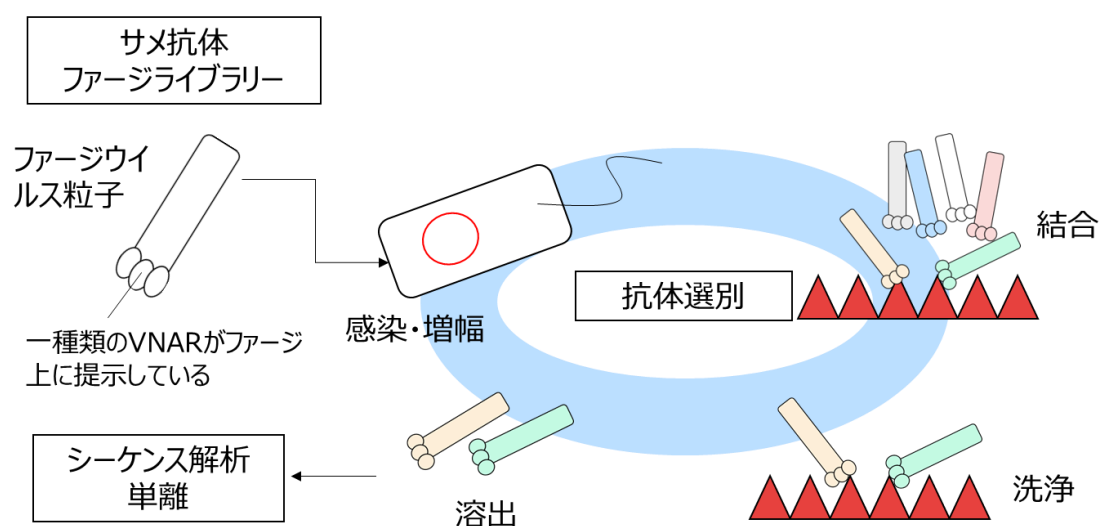


図 1.6 ファージディスプレイ法の原理(出所：筆者作成)

ファージディスプレイ法は、大腸菌内での遺伝子増幅や目的タンパク質の発現においてバイアスが生じることで、ファージライブラリの多様性が大きく低下することが報告されている[23]。このような宿主細胞の違いから生じるタンパク質の発現バイアスにより、大腸菌内で発現しやすいクローンが優先的に濃縮されることで、望ましい特性を有した抗体が選別されにくくなる。そのため、大腸菌の発現バイアスによるファージライブラリの多様性低下は、候補抗体の多様性確保に向けた大きな課題の一つである。

ファージライブラリの多様性が低下する状況下でも、最終的に選別される優れた特性を示す候補抗体の数を増やすには、「ファージライブラリの多様性」と「抗体選別の効率性」の向上が必要である[24]。

前者に関する技術は、サメ抗体でも、他の動物種の抗体と同様、盛んに取り組まれてきた。サメに標的抗原を免疫し、免疫細胞からライブラリを作製する方法や、非免疫サメ細胞から作製したナイーブライブラリ、変異導入プライマー等を用いることで CDR 配列に多様性を持たせた半合成ライブラリなどの作製が多数報告されている[7, 25]。また、治療用抗体においては、ヒト化されたサメ抗体ライブラリが作製され、ヒトへの投与に際して免疫原性を低減する試みが行われている[26]。

一方で、後者のサメ抗体の選別方法については、産業応用されている抗体と同様のファージディスプレイ法が使用されている[7]。これらの方法は他の抗体フォーマットの選別方法をサメ抗体の選別方法に外装したものであり、サメ抗体の選別に特化した検討は十分に実施されていない。抗体の配列や構造、物理化学的特性が異なることから、各抗体フォーマットで至適化が重要である。

サメ抗体以外の抗体フォーマット(例えばマウスやヒトの抗体)では、有用クローンの選別方法として、選択圧の検討、次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer(NGS))の解析などが行われており、その成果が報告されている。

選択圧とは、ファージディスプレイ法の結合や洗浄、溶出過程で、所望の機能を有する抗体群を濃縮するための条件検討である。例えば、熱安定性を上げるために、予熱処理を行いパニングが行われた[27]。また、結合および溶出過程における pH を検討することで、pH 応答性の抗体分子が取得された[28]。これらの検討は通常の方法では濃縮されてこない抗体群を、選択圧の変更によって選別できることを示している。

NGS 解析は、飛躍的に技術が進歩しており、測定結果の正確性の向上、測定時間の短縮、低コスト化等が実現している[29]。これらの技術進歩より、NGS を活用したライブラリ中に含まれる抗体の遺伝子配列の網羅解析が積極的に行われるようになった。ファージディスプレイのパニング過程において、大腸菌の発現バイアスによる、ファージライブラリの多様性の低下が生じるが、NGS による配列解析の導入により、パニング前後の抗体配列の僅かな濃縮過程が観察されるようになり、高機能な抗体の配列が取得できるようになった。パニング後の抗体遺伝子ライブラリにおいて低頻度でしか存在しないクローンでも、抗原結合活性を有することから、NGS 活用の重要性が示唆されている。

また、選択圧の変更と NGS 解析を組み合わせることによって有用クローンの取得が行われている[30]。例えば、取得した抗体のエピトープ(抗原決定基)に偏りがあった場合、新しいエピトープを有する抗体を取得するために、通常の方法で取得される抗体をあらかじめ細胞に添加し、そのエピトープに結合する抗体群の濃縮を阻害することで、その部位以外に結合する抗体を NGS 解析により取得する方法が提案された[30]。この方法は NGS の活用により、ファージライブラリで低頻度に存在するクローンにおいても解析、抗体取得が可能であることから、ディープマイニング法と呼ばれている。マウス scFv などでは選別方法の検討(選択圧の変更や NGS の解析)が行われてきたが、サメ抗体の取得にこれらの技術が適用できるかどうかは不明だった。宿主の動物によって産生される抗体の配

列や構造が異なるため、それらの特性を考慮した選別方法の構築が望まれる。

1.5. 本研究の目的

本研究では、次世代の医薬品(治療および診断用途)原料として注目される VNAR を対象とし、VNAR 取得プロセスの先端技術研究を行い、VNAR の社会実装に必須となる選別方法に関する技術の構築を目的とした(図 1.7)。

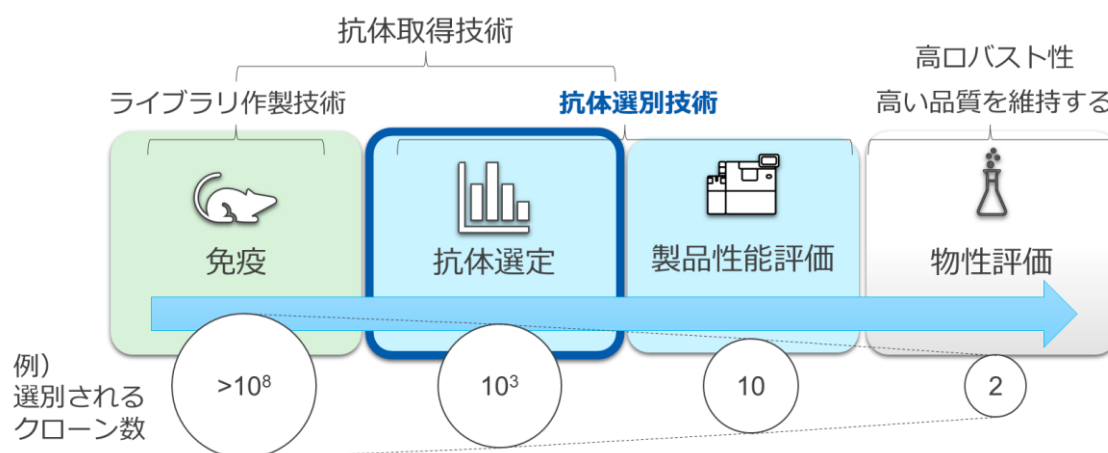


図 1.7 抗体取得プロセス(出所：筆者作成)

本研究では、大腸菌内で生じるタンパク質の発現バイアスによりファージライブラリの多様性が低下した条件において、選択圧の検討と NGS による抗体配列解析を組み合わせることで、通常の方法では低頻度でしか存在しないユニークな特性を持つ VNAR の選別を試みた。選択圧と NGS の活用は、他の抗体フォーマットにおいては実施されていたものの、VNAR においては十分に検討されていない。VNAR と他の抗体フォーマットで物理化学的特性が大きく異なっていること、また VNAR が存在するサメの体内環境が、他の宿主動物と比べ特徴的であることから、VNAR 取得のための選別条件の至適化が必要と考えられた。そこで、VNAR の特徴的な物性である可逆性から「予熱条件」を、サメの特徴的な体内環境から「低温」、「高塩濃度」、「高尿素濃度条件」を着想し、VNAR の物性およびサメの体内環境を模倣した選択圧の検討を行った(第 2 章)。通常のパニング方法と上記のバイオミメティクスに基づいたパニング方法(提案法)で濃縮された抗体配列を NGS 解析で比較することで、特定の選択圧で濃縮しやすい抗体群を検出した。

次に VNAR の均一性を高めるコンストラクトの検討を行った(第 3 章)。サメ抗体(IgNAR)はヒンジ領域を持たず、定常領域(C1)の VNAR の存在状態への影響は十分に検証されていない。そこで、VNAR の C 末端に C1 の配列を付加するコンストラクトと付加しないコンストラクトとでタンパク質としての均一性の比較を行った。AlphaFold2 による構造解析予測

と精製した VNAR の均一性評価により、至適なコンストラクトの選択を行った。

さらに、大腸菌の発現バイアスによりパニングで濃縮されやすいクローン(Z11)と、提案法で選別されたクローンを、物理化学的観点から分析することで、提案法の有用性と各 VNAR が持つ特性について示した(第 4 章)。VNAR の物理化学的特性の解析は、VHH の解析と比べ限定的であり、本研究は、VNAR の特性解析の観点でも新規性と産業応用に向けた実用性が高い、重要な知見を提供する。相互作用解析(ELISA、等温滴定熱量測定法(Isothermal titration calorimetry)、表面プラズモン共鳴法(Surface Plasmon Resonance(SPR)))と熱安定性(示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry (DSC)))に関して解析を行った。

最後に、提案法を活かすイノベーションアイデアとして、「迅速かつ高感度な免疫測定試薬開発事業」を提案した(第 5 章)。本イノベーションアイデアを実現するために必要な技術戦略、知財戦略、事業戦略および財務戦略の構築を行った。

参考文献

1. Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109(1), 74-103.
2. Fogel, D. B. (2018). Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: a review. *Contemporary clinical trials communications*, 11, 156-164.
3. Bailly, M., Mieczkowski, C., Juan, V., Metwally, E., Tomazela, D., Baker, J., ... & Fayadat-Dilman, L. (2020, January). Predicting antibody developability profiles through early stage discovery screening. In *MAbs* (Vol. 12, No. 1, p. 1743053). Taylor & Francis.
4. Griffiths, K., Dolezal, O., Parisi, K., Angerosa, J., Dogovski, C., Barraclough, M., ... & Foley, M. (2013). Shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody fragments: stability and diagnostic applications. *Antibodies*, 2(1), 66-81.
5. Liu, J. L., Anderson, G. P., Delehanty, J. B., Baumann, R., Hayhurst, A., & Goldman, E. R. (2007). Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naive shark library. *Molecular immunology*, 44(7), 1775-1783.
6. Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., ... & Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology*, 198, 157-174.
7. Feng, M., Bian, H., Wu, X., Fu, T., Fu, Y., Hong, J., ... & Ho, M. (2019). Construction and next-generation sequencing analysis of a large phage-displayed VNAR single-domain antibody library from six naive nurse sharks. *Antibody therapeutics*, 2(1), 1-11.

8. Barelle, C., Gill, D. S., & Charlton, K. (2009). Shark novel antigen receptors—the next generation of biologic therapeutics?. *Pharmaceutical Biotechnology*, 49-62.
9. Cheong, W. S., Leow, C. Y., Majeed, A. B. A., & Leow, C. H. (2020). Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody. *International journal of biological macromolecules*, 147, 369-375.
10. Zielonka, S., Weber, N., Becker, S., Doerner, A., Christmann, A., Christmann, C., ... & Kolmar, H. (2014). Shark attack: high affinity binding proteins derived from shark vNAR domains by stepwise in vitro affinity maturation. *Journal of biotechnology*, 191, 236-245.
11. Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könning, D., Barelle, C. J., & Kolmar, H. (2015, January). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. In *MAbs* (Vol. 7, No. 1, pp. 15-25). Taylor & Francis.
12. Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., & Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS One*, 14(6), e0213394.
13. Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *nature*, 374(6518), 168-173.
14. Streltsov, V. A., Varghese, J. N., Carmichael, J. A., Irving, R. A., Hudson, P. J., & Nuttall, S. D. (2004). Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12444-12449.
15. Diaz, M., Stanfield, R. L., Greenberg, A. S., & Flajnik, M. F. (2002). Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development. *Immunogenetics*, 54, 501-512.
16. Streltsov, V. A., Carmichael, J. A., & Nuttall, S. D. (2005). Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early - developmental isotype. *Protein science*, 14(11), 2901-2909.
17. Barelle, C., & Porter, A. (2015). VNARs: an ancient and unique repertoire of molecules that deliver small, soluble, stable and high affinity binders of proteins. *Antibodies*, 4(3), 240-258.
18. Zeidel, J. D., Mathai, J. C., Campbell, J. D., Ruiz, W. G., Apodaca, G. L., Riordan, J., & Zeidel, M. L. (2005). Selective permeability barrier to urea in shark rectal gland. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(1), F83-F89.
19. Takeda, H., Ozawa, T., Zenke, H., Ohnuki, Y., Umeda, Y., Zhou, W., ... & Sawasaki, T. (2023). VNAR development through antigen immunization of Japanese topeshark (*Hemitriakis japonica*). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.

20. Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., & Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual review of immunology*, 12(1), 433-455.
21. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352(6336), 624-628.
22. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *nature*, 348(6301), 552-554.
23. Turner, K. B., Naciri, J., Liu, J. L., Anderson, G. P., Goldman, E. R., & Zabetakis, D. (2016). Next-generation sequencing of a single domain antibody repertoire reveals quality of phage display selected candidates. *PLoS One*, 11(2), e0149393.
24. Rahbarnia, L., Farajnia, S., Babaei, H., Majidi, J., Veisi, K., Ahmadzadeh, V., & Akbari, B. (2017). Evolution of phage display technology: from discovery to application. *Journal of drug targeting*, 25(3), 216-224.
25. Dooley, H., Flajnik, M. F., & Porter, A. J. (2003). Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular immunology*, 40(1), 25-33.
26. Fernández-Quintero, M. L., Fischer, A. L. M., Kokot, J., Waibl, F., Seidler, C. A., & Liedl, K. R. (2022). The influence of antibody humanization on shark variable domain (VNAR) binding site ensembles. *Frontiers in Immunology*, 13, 953917.
27. Pershad, K., & Kay, B. K. (2013). Generating thermal stable variants of protein domains through phage display. *Methods*, 60(1), 38-45.
28. Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., ... & Hattori, K. (2010). Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nature biotechnology*, 28(11), 1203-1207.
29. Luciani, F., Bull, R. A., & Lloyd, A. R. (2012). Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow. *Trends in biotechnology*, 30(9), 443-452.
30. Ljungars, A., Svensson, C., Carlsson, A., Birgersson, E., Tornberg, U. C., Frendéus, B., ... & Mattsson, M. (2019). Deep mining of complex antibody phage pools generated by cell panning enables discovery of rare antibodies binding new targets and epitopes. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 847.

参考 URL

- ① Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US – The Antibody Society
<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>

第2章 ユニークな特性を持つ VNAR を取得のための検討

2.1. 背景

サメ抗体の取得プロセスにおける技術課題は、大腸菌の発現バイアスにより、ファージライブラリの多様性が低下することである。この技術課題に対する解決策として、所望の機能を有する結合分子の選別方法をサメ抗体で検討した。他の分子フォーマット(例えば scFv)では、選択圧の変更や NGS の活用によって、ファージライブラリの多様性が低下した場合でも高機能な分子を見分ける方法が提唱されている[1]。VNAR において選別方法の研究がこれまで十分に行われていないため、選択圧の検討や NGS 解析の VNAR 選別技術への適用可能性の評価が重要である。本章では、VNAR の物理化学的特性とサメの体内環境は他と比べ非常に特徴的であるため、本研究ではそれらを考慮し、パニングの結合ステップにおける選択圧(選別条件)を検討した。まず VNAR の物理化学的特性としては、可逆性が高いため[2]、予熱条件(70°C加熱後 25°Cにて静置)を検討した。次に、サメの体内環境の特徴としては、他の宿主動物より体温が低温であること、血清中の塩濃度および尿素濃度が高いことから、それらを模した条件(4°C、1 M NaCl、1 M 尿素)を検討した。続いて、パニングしたファージ集団(プール)を NGS 解析することで、パニング条件(選択圧)特異的に濃縮したクローンの選別可否を判断した。

2.2. 実験方法

VNAR ファージライブラリの作製とパニング

蛍光タンパク質である Venus をエイラクブカに免疫し作製した抗 Venus VNAR 提示ファージライブラリを、愛媛大学 竹田浩之准教授からご提供いただいた[3, 4]。パニング操作を行っていないファージライブラリ(以下、「インプット」と呼ぶ)は、ファージ粒子数を 1×10^{13} に調製し、あらかじめスキムミルクでブロックしたイムノチューブ(Nunc)に添加し、1 時間、25°Cで静置することで、非特異的に吸着する画分を除去した。予熱条件は、70°Cで 30 分間加熱し、25°Cで 30 分間静置した後、上記の非特異的吸着画分除去操作を行った。上清を回収し、通常、低温および予熱条件はスキムミルク含有 PBS を添加、混合した。高塩濃度、高尿素濃度条件においてはそれぞれ、終濃度が 1 M NaCl、1 M Urea となるようにスキムミルク含有 PBS を添加した。それぞれのファージ溶液を Venus 固定化 ELISA プレート(Nunc)に添加し、25°Cで 1 時間反応させた。低温条件は、4°Cで反応を行った。ELISA プレートを PBS/0.05% (v/v) Tween 20 にて洗浄し、Venus に結合していないファージ粒子を除去した。Venus に結合したファージ粒子は、Glycine-HCl(pH2.2)で溶出し、Tris-HCl(pH 9.0)で中和した。ファージディスプレイ用大腸菌コンピテントセル TG-1 株(Lucigen)を 37°Cで培養し、OD600 が 0.5 となった時に、溶出したファージ粒子を添加した。37°Cで 30 分間、TG-1 株を培養した後、1% (w/v)グルコース、100 μ g/mL アンピシリン含有 2 $\times$ YT 寒天培地に播種し、30°Cで一晩培養した。コロニーを回収し、M13KO7 ヘルパーファージ

を添加することで、次の Round に使用するファージ粒子を形成させた。各条件 Round3 まで上記の操作を繰り返した。

ファージ ELISA

1 $\mu\text{g/mL}$ の Venus 抗原を Nunc MaxiSorp ELISA Plates に 100 μL 添加し、25°C で 1 時間静置することで抗原を ELISA プレートに固定化した。各ウェルを洗浄後、1% (w/v) スキムミルク含有 PBS を 300 μL 添加し、25°C で 1 時間静置することで、ブロッキングを行った。パニング後の 15 種類のファージプール(パニング 5 種類 $\times$ Round3)とインプットプールそれぞれに、1% (w/v) スキムミルク含有 PBS を加えることで、各ファージ粒子数を 2×10^{10} に調製した。各ウェルを洗浄後、5% (w/v) スキムミルク含有 PBS で 3,000 倍に希釈した HRP 標識抗 M13 抗体(Abcam)を各ウェルに添加し、25°C で 1 時間静置した。各ウェルを洗浄後に TMB(Thermo Fisher Scientific)を添加し、25°C で 10 分間静置した。1 N 硫酸を各ウェルに添加し反応を停止し、450 nm の吸光度を読み取った。

NGS 解析と抗体選別

Nucleospin Plasmid EasyPure kit(タカラバイオ)を用い、各ファージプールからファージミド DNA を抽出し、このファージミド DNA を鋳型として PCR にて増幅し NGS 解析用サンプルとした。KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR kit(KAPA Biosystems)を使い、増幅したファージミドにアダプター配列を付加した。シーケンス解析は、MiSeq Reagent Nano Kit v.2 (Illumina)を用いて行った。検出は Illumina MiSeq sequencer (Illumina)を使用した。上記のディープシーケンスで取得した塩基配列の内、ストップコドンを含まない、かつ 400 bp 以上の塩基配列を抽出した。VNAR が共通して持つ塩基配列を含むクローンを選別し、それらのクローンの CDR3 の塩基配列を抽出した。抽出されたアミノ酸配列に重なりのない CDR3 の塩基配列を「ユニーク配列」とした。出現頻度(CDR3 abundance)は、ユニーク配列の各プールにおける出現頻度と定義した。すなわち、出現頻度はユニーク配列数を各プールの総数で割ることで算出する。例えばユニーク配列 A が、プール A (配列数: 10,000)に 10 配列存在する場合は、出現頻度は 0.1%(10 $\div$ 10,000)となる。各プールにおいて出現頻度が高い 500 のユニーク配列を MAFFT[5]によりアライメントした。Seaborn Python package のヒートマップ作成機能を利用して、各パニング条件におけるユニーク配列の出現頻度の推移をヒートマップ化した(緑色と赤色)。Fold change は、ユニーク配列の各パニング条件における特異的濃縮の程度と定義した。各パニング条件でのユニーク配列の出現頻度を通常条件でのユニーク配列の出現頻度で割ることで算出する。Fold change の値が高いほど、条件特異的な濃縮が生じていることを示す。例えば、ユニーク配列 B のプール B での出現頻度が 0.1%で、通常条件での出現頻度が 0.01%であった場合は、Fold change は 10 となる。各プールにおいて出現頻度が高い 500 のユニーク配列について、Fold change を算出し、Seaborn Python package のヒートマップ作成機能を利用して、ヒートマップ化(白色と青色)

した。各パニング条件で特異的に濃縮したユニーク配列を抽出するために、以下のクライテリアを満たす配列を抽出した。①インプットで検出されないこと、②Fold change が 10 以上であること。

2.3. 実験結果

サメ抗体の選別は図 2.1 に示すフローで実施した。標的抗原は蛍光タンパク質である Venus とし[3]、愛媛大学にてエイラクブカへの免疫およびファージライブラリの作製が行われ、ご提供いただいた[4]。このファージライブラリをインプットファージとし、通常方法を含め、5 種類のパニング条件を検討した。パニングの結合過程における温度(4°C)、塩濃度(1 M)、尿素濃度(1 M)、および予熱条件(70°Cで 30 分間加熱後に 25°Cで 30 分間静置)を検討した。それぞれのファージを、抗原プレートに反応させ溶出した後、大腸菌での増幅を完了するまでを Round1 とした。各パニング条件では、Round3 まで行われ、溶出されたファージライブラリの配列を NGS で解析した。

各パニング条件後に得られたファージライブラリをプールと呼び、以下の方法にてプールの名前を決定した。頭文字は各パニング条件を表しており、低温では「L」、塩濃度では「S」、尿素濃度は「U」、予熱条件は「H」、通常条件は「N」とした。2 文字目の数字は Round 数を表示した。例えば「L3」であれば、低温条件における 3 回目の Round を示す。



図 2.1 VNAR の選別フロー

n.d.は Not detected(検出されなかったこと)を意味する。

ファージ ELISA

パニング条件が 5 種類、Round を 3 回ずつ行ったため、合計 15 種類のプールが作製された。これらのプールにインプットを加えた合計 16 種類について抗原特異的な濃縮が生じたか確かめるために、ファージ ELISA を行った。その結果、各パニング条件において、Round を重ねる毎に反応性が向上していることが示された(図 2.2)。高尿素条件以外は、Round1 でインプットよりも反応性が向上した。Round2、3 では、さらに反応性が向上した。高尿素条件のみ、Round1、2 で反応性を示さず、Round3 で急激に反応性が向上した。続いて非特異的な反応性を調べるために、BSA に対する反応性を評価した。全てのプールにおいて BSA に対する非特異的な反応性を示さなかった。これらのことから、全てのパニング条件において、抗原特異的なファージ粒子の濃縮が行われていることが示された。

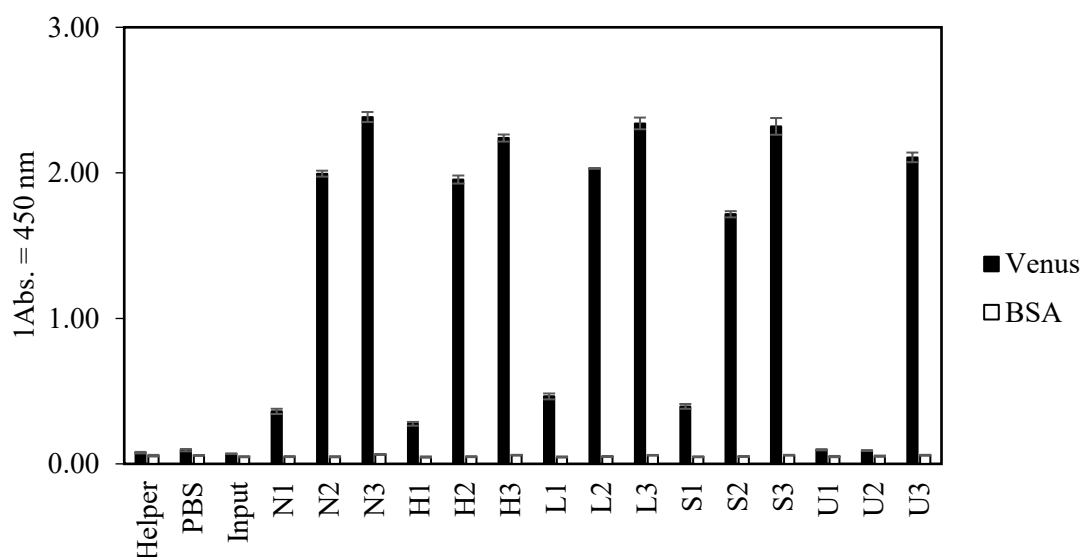


図 2.2 ファージ ELISA の結果

各ファージ溶液は 1×10^{12} PFU/mL に希釈し、Venus 抗原または BSA を固定化した ELISA プレートに反応させ、A450 を測定することで反応性を評価した。黒色のグラフは Venus に対する反応性を、白色のグラフは BSA に対する反応性を示す。エラーバーは 3 回繰り返し測定 of 標準偏差を示した。Helper はヘルパーファージの反応性を示す。

NGS 解析結果

表 2.1 には各プール内に含まれる CDR3 の総数と、ユニーク配列数を示した。各プール内には、同一の CDR3 配列が複数含まれるため、プール内に含まれる CDR3 の数よりもユニーク配列数の方が低値となる。出現頻度や Fold change の算出に、表 2.1 の数値を用いた。CDR3 配列の総数は、U1 が最も少なく 29,231 で、N2 が最も多く 133,114 であった。ユニーク配列数は、U2 が最も低値で 18,116、N2 が最も高値で 117,760 であった。各プールで

10,000 を超える配列数が取得できたことから、出現頻度、および Fold change の算出を行った。

表 2.1 各プールにおける NGS 解析結果

パニング条件	R0	R1	R2	R3
インプット	75,451 (49,852)	-	-	-
通常	-	61,218 (44,081)	133,114 (117,760)	90,064 (79,695)
低温	-	75,688 (53,680)	51,788 (41,630)	76,228 (42,372)
高塩濃度	-	44,690 (33,708)	99,971 (87,566)	82,013 (74,217)
予熱	-	67,390 (44,188)	129,833 (113,817)	44,321 (37,851)
高尿素濃度	-	29,461 (19,790)	29,231 (18,116)	74,929 (39,971)

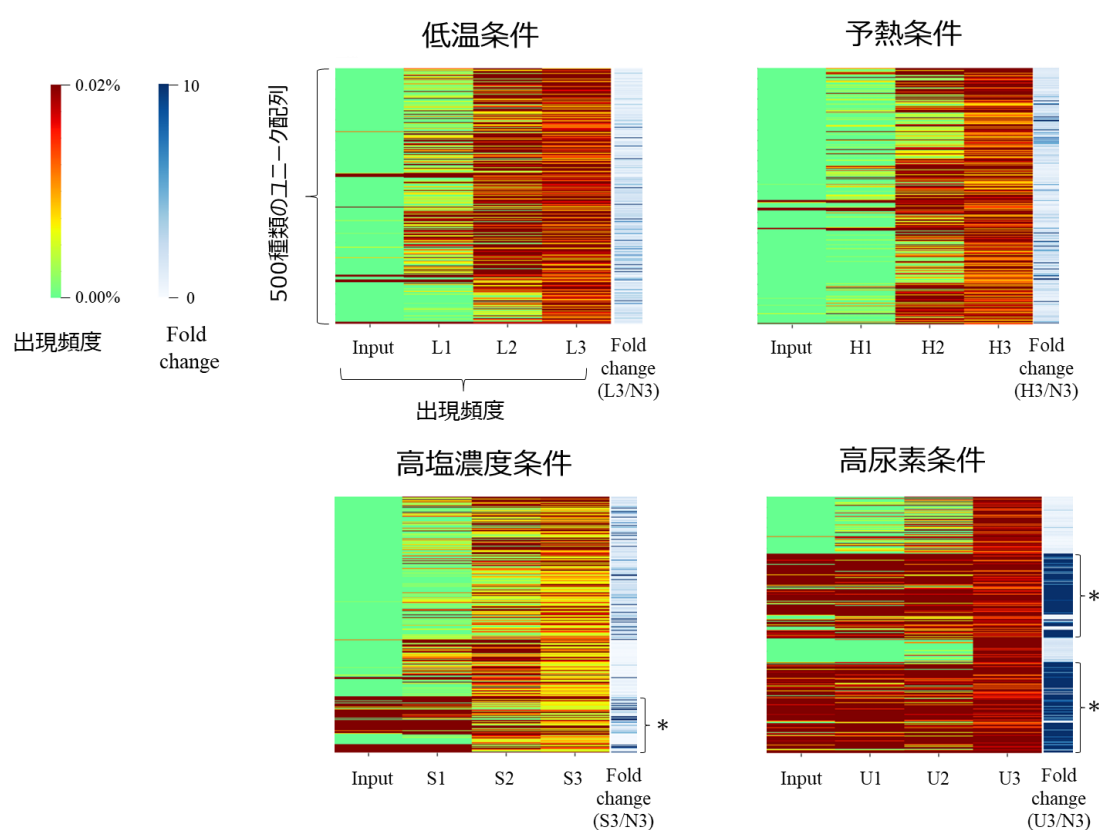
表には各プールにおける CDR3 の配列数を示した。括弧内の数字はユニーク配列の数を示す。

各パニング条件の濃縮過程

NGS 解析には、表 2.1 に示した 15 種類のファージプールとインプットの合計 16 種類のプールについて解析を行った。各パニング条件の Round3 のプールにおいて出現頻度の高い上位 500 の CDR3 配列を抽出し、アライメントを実施した。次に、これらのユニーク配列における出現頻度を算出した。出現頻度は、各 CDR3 配列の出現数を、各プールの解析総数で割った値とした。図 2.3 には、抽出した 500 種類の抗体配列の各パニング条件における出現頻度を示した。それぞれインプットから Round3 までの出現頻度を示した。緑は出現頻度が低く、赤は出現頻度が高いことを示しており、低温、予熱において Round を重ねるごとに赤色の領域が増加した。高尿素濃度条件では、Round3 で出現した 500 配列のうち、インプットでも赤色のユニーク配列が高頻度で存在していることが示された。また高塩濃度条件においても、高尿素濃度条件よりは少ないが、インプットにおいて出現頻度の高いユニーク配列が存在していた(それぞれ図 2.3 の*で示した抗体配列群参照のこと)。

続いて、Fold change を計算した。Fold change は各ユニーク配列の特定のパニング条件における出現頻度をその配列の N3 プールにおける出現頻度で割った値である。従って、

Fold change の値が高いほど、特定のパニング条件では高頻度で、通常条件では低頻度で出現する配列であり、各パニング条件特異的な濃縮している配列を検索することができる。Fold change は、値が低いユニーク配列は白色、値が高いユニーク配列は青色で示した(図 2.3)。低温、予熱条件でのパニングでは、青色のユニーク配列の頻度が少ないことから、通常条件と類似した濃縮であることが示された。一方、高塩濃度および高尿素濃度条件でのパニングでは青色の領域の頻度が高く、この条件で特異的に濃縮したクローンが多いことが示された。ただし、これらの配列のインプットにおけるユニーク配列の出現頻度は赤色であることから、インプットにおいても出現する配列であることが明らかとなった。



*抗原非特異的な増幅

図 2.3 CDR3 配列の出現頻度および Fold change

L3、H3、S3、U3 の各条件において出現頻度の高い 500 種類のユニーク配列をアライメントした。各ユニーク配列の Round1 から Round3 における出現頻度をヒートマップで示した。緑色は出現頻度が低く、赤色は出現頻度が高いことを示す。Fold change は条件特異的な濃縮を示し、青色が濃いほど通常条件で出現頻度の低いクローンであることを示す。*は抗原非特異的な濃縮を示す。

本研究においては、各パニング条件(選択圧)特異的に濃縮した VNAR の選別が必要であ

ることから、以下のクライテリアを設定し、抗体を選別した；①インプットにおいて出現しないユニーク配列、②Fold change が 10 以上であるユニーク配列。クライテリアを満たす 27 種類の VNAR について、第 3 章、第 4 章で物理化学的特性の解析を行った。

2.4. 考察

低温条件と予熱条件では通常条件と類似した濃縮が生じる

図 2.3 から、低温条件(L3 プール)と予熱条件(H3 プール)のユニーク配列はインプットにおいて出現するものが少なく、抗原特異的な濃縮が生じることが示された。一方で、Fold change は 10 以上のユニーク配列が少なく、通常条件と類似した抗体濃縮が生じていることが示唆された。低温および予熱条件から選別されたユニーク配列の出現頻度は全て 0.1% 以下であった。よってランダムピックアップ法による選別では Fold change が高いユニーククローンを選別するのが困難であることが予測された。以上の結果から、パニング条件特異的に濃縮したクローンの選別には、選択圧の検討と NGS 解析を組み合わせる方法が有用だと考えられる。

高尿素濃度条件と高塩濃度条件は抗原非特異的な濃縮が生じる

図 2.3 から、高尿素濃度条件(U3 プール)において、インプットで高頻度に出現しているユニーク配列が多いことが示された。この結果はインプットで出現しているクローンが、排除されていないことを示している。このことから抗原非特異的な濃縮である可能性が示唆された。高塩濃度条件においても、抗原非特異的な濃縮と考えられるユニーク配列が見られた(図 2.3 の*で示した部分)。パニングの結合ステップにおいて尿素、または塩濃度を過剰に添加することで抗原非特異的な抗体の濃縮が起こる可能性があるため、尿素および塩濃度に耐性のある抗体の取得に向けては、パニングの結合ステップにおける濃度の至適化の必要性が示唆された。

高塩濃度条件と高尿素条件で抗原非特異的なファージの濃縮が生じた理由を以下に考察した。高塩濃度条件では、静電遮蔽が生じることから、パニング後に残存する VNAR は静電相互作用以外のメカニズムで抗原と相互作用する必要がある[6]。非特異的な結合を誘起する疎水性相互作用を主な機序とする一部の抗体群が高塩濃度条件で排除しきれなかった可能性がある。次に高尿素濃度条件に関しては、尿素がタンパク質によっては 0.5 M であっても変性作用を示す可能性があり[7]、さらに高尿素条件の尿素濃度は 1 M で、サメ体内の濃度(300–400 mM)よりも高濃度であることから、大部分の抗体群が尿素により変性し、抗原以外の部分に非特異的に吸着し濃縮が生じたと示唆された。高尿素条件から選別したモノクローナル VNAR は BSA に対しても反応性を示した結果と符合する(後述、図 4.1)。

図 2.2 のファージ ELISA の結果では、U3(高尿素条件)および S3(高塩濃度条件)でも他のプールと同様に BSA に対して反応性を示さなかった。それぞれのプールにおいて出現頻度の高い上位 5 種類のユニーク配列の出現頻度の合計は 90% 以上であり、これらのユニーク

配列が BSA に対して反応性を示さないことに起因すると考えられた。

参考文献

1. Ljungars, A., Svensson, C., Carlsson, A., Birgersson, E., Tornberg, U. C., Frendéus, B., ... & Mattsson, M. (2019). Deep mining of complex antibody phage pools generated by cell panning enables discovery of rare antibodies binding new targets and epitopes. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 847.
2. Griffiths, K., Dolezal, O., Parisi, K., Angerosa, J., Dogovski, C., Barraclough, M., ... & Foley, M. (2013). Shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody fragments: stability and diagnostic applications. *Antibodies*, 2(1), 66-81.
3. Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, 20(1), 87-90.
4. Takeda, H., Ozawa, T., Zenke, H., Ohnuki, Y., Umeda, Y., Zhou, W., ... & Sawasaki, T. (2023). VNAR development through antigen immunization of Japanese topeshark (*Hemirhamphys japonica*). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.
5. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160-1166.
6. Curtis, R. A., Prausnitz, J. M., & Blanch, H. W. (1998). Protein - protein and protein - salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes. *Biotechnology and bioengineering*, 57(1), 11-21.
7. Ferreira, L. A., Povarova, O. I., Stepanenko, O. V., Sulatskaya, A. I., Madeira, P. P., Kuznetsova, I. M., ... & Zaslavsky, B. Y. (2017). Effects of low urea concentrations on protein-water interactions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(1), 207-218.

第3章 均一性の高いVNARを調製するためのコンストラクト検討

3.1. 背景

IgNAR は、可変(V)領域と定常(C)領域を持ち、標準的なヒンジ領域を含まないことが知られている(図 3.1)。定常領域の C1 および C3 領域が相互作用し二量体化することで、IgNAR を形成する[1]。標準的なヒンジ領域を含まないにも関わらず、可変領域は抗原の離れたエピトープを効率的に認識できる位置に配置されている。可変領域の位置には、C1 および C3 の二量体化の結合界面と角度が関係していると考えられている[1]。筆者は、一般的に知られている可変領域だけでなく、C1 のアミノ酸配列(スペーサー)を VNAR のコンストラクトに含めることで、分子の均一性に影響を与えるかどうか調査した。

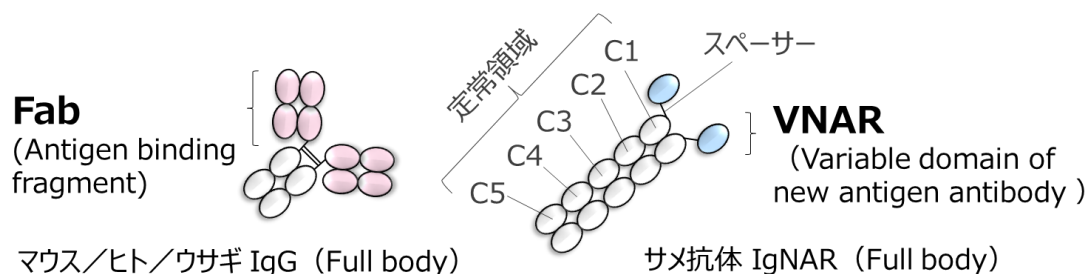


図 3.1 Fab と VNAR の構造の比較

IgNAR は標準的なヒンジ領域が存在しない。本論文においては C1 領域の N 末端部分のアミノ酸配列をスペーサーと呼ぶ。IgG の Fab 部分を赤色で、IgNAR の VNAR を青色で示した。

3.2. 実験方法

AlphaFold2 による構造予測

VNAR のコンストラクトを選定するにあたり、AlphaFold2[2]による立体構造予測を実施した。AlphaFold2 は v2.3.0(Deep Mind)を使用した。アミノ酸配列情報を計算用のワークステーションに転送するためのソフトウェアとしては Tera Term 5.0 alpha1(Windows)を使用した。コンストラクト 1 および 2 のアミノ酸配列は拡張子.fasta ファイルとして準備した。準備したアミノ酸配列を Tera Term 5.0 alpha1 によりワークステーション上に送付した。ワークステーション上で、「conda deactivate」と入力し、Conda 環境を削除した。その後、アミノ酸配列が保存されたパスを指定し、run_docker.py のスクリプトを実行した。本実験では単量体としての構造を想定していたため、「monomer」と指定した。出力された立体構造情報を Tera Term 5.0 alpha1 によりデータの受信を行った。出力された複数の立体構造の内、pLDDT スコアが最も高い立体構造について解析を行った。

VNAR 遺伝子の発現ベクターへの組み込み

NGS の解析結果から選別した 27 種類の VNAR 遺伝子および pcDNA3.4 TOPO cloning vector(Thermo Fisher Scientific)を PCR にて線状化した。それぞれの PCR 産物をアガロース電気泳動に供し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)にてゲル抽出することで精製した。精製した遺伝子を In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ)を用いて表 3.1 に示す 2 種類コンストラクトを pcDNA3.4 TOPO cloning vector に組み込んだ。反応液を ECOS™ Competent *E.coli* DH5 α (ニッポンジーン)に添加し、42°C で 45 秒間反応後、LB プレートに播種し 37°C で 18 時間インキュベートした。遺伝子配列が設計通りであるコロニーを採取し、2 mL の LB 液体培地に懸濁した後、37°C で 200 rpm で 18 時間培養した。Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems(Promega)を用い、細胞懸濁液からプラスミド DNA を抽出した。

表 3.1 二つの VNAR のコンストラクト

	配列
コンストラクト1	VNAR スパーサー ⋯DGAGTVLTVN SGLTPPVISLFSETDELRFNGF*
コンストラクト2	VNAR ⋯DGAGTVLTVN*

VNAR のアミノ酸配列は赤色で示した。VNAR 部分の配列は選別した 27 種類のクローン毎に異なる。C1 の N 末端領域(スパーサー)はアミノ酸配列の上部に表示した。コンストラクト 2 は VNAR のアミノ酸配列のみとした。両コンストラクトともに、表示したアミノ酸配列の C 末端領域に G4S リンカーと His Tag 配列を付加されている。

組み換え VNAR の調製

Expi293 細胞(Thermo Fisher Scientific)に Expi293™ Expression Medium(Thermo Fisher Scientific) を添加し、125 rpm、37°C、CO₂ 濃度 5%で培養した。30 mL の Expi293 細胞に対して、30 µg のプラスミド DNA を準備し、ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit(Thermo Fisher Scientific) で Expi293 細胞にプラスミド DNA を導入した。125 rpm、37°C、CO₂ 濃度 5%で培養し、1 日後に、エンハンサーを添加した。さらに 4 日後に細胞懸濁液を回収した。3,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を回収した。さらに、10,000 rpm で 10 分間遠

心し上清を回収した。回収した培養上清を HisTrap excel (Cytiva) に通液することで、VNAR をカラム担体に吸着させた。カラムを洗浄後、溶出液(1×PBS, 300 mM イミダゾール)にて溶出した。さらに Superdex™ 75 Increase 10/300 GL(Cytiva)にて精製した。

SDS-PAGE による純度確認

Expi293 細胞の培養上清、または精製後に 0.1 µg/mL に希釈した VNAR を 10 µL 採取し、2 µL の Sample Buffer Solution without Reducing Reagent(6x) for SDS-PAGE(ナカライテスク)を添加し、95°C で 5 分間加熱した。ポリアクリルアミドゲルにサンプルを添加し、200 V で 30 分間通電した。Gel Doc EZ ゲル撮影装置(Bio-Rad)で撮像した。

3.3. 実験結果

AlphaFold2 による一次配列からの構造予測結果

IgNAR は、図 3.1 に示すように、可変領域(VNAR)と定常領域(C1、C2、C3、C4 および C5 領域)で構成されている。IgNAR は C1 および C3 領域同士が相互作用することで二量体化する。選択圧特異的に濃縮したと考えられる 27 種類の VNAR について、スペーサーを含むコンストラクト(コンストラクト 1)とスペーサーを含まないコンストラクト(コンストラクト 2)を準備し、純度の比較を行った。構造予測の際は、VNAR と C1 の配列のみを使用し解析したが、VNAR として発現させる際には、精製および検出のためにタグ配列を挿入した。

表 3.1 に示したアミノ酸配列を用いて AlphaFold2 による立体構造予測を行った。2 つのコンストラクトの構造予測の比較を図 3.2 に示す。コンストラクト 1 のスペーサーの C 末端部分(図 3.2 の赤枠で囲んだ部分)が α ヘリックスを形成する一方、コンストラクト 2 では二次構造を形成しないことが予測された。

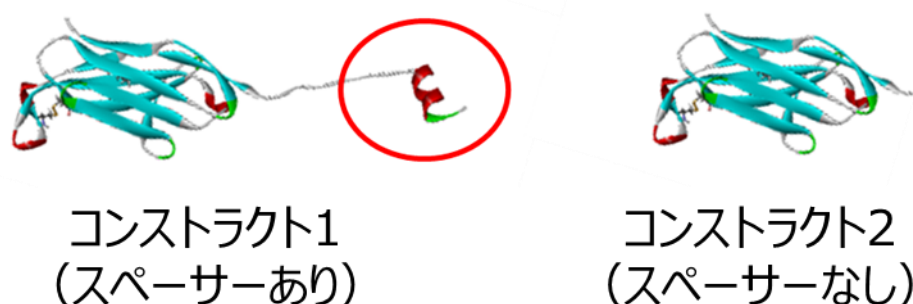


図 3.2 AlphaFold2 による VNAR の構造予測

赤色は α ヘリックス、青色は β シート、緑色はループを示す。Discovery studio 2020 を用いて構造を表示。コンストラクト 1 はスペーサーの C 末端側が α ヘリックス構造を形成した。なお、入力したアミノ酸配列には G₄S リンカーおよび His tag 配列は含んでいない。

組み換え VNAR の純度確認結果

精製後の純度が低い場合、品質、および性能が低下する要因となり得る。従って、免疫測定試薬原料の品質を担保するための評価方法の一つとして、純度確認が行われている。SDS-PAGE にて、His tag 精製後の VNAR の純度を評価した。図 3.3 には、インプットの出現頻度=n.d.、Fold change>10 を満たす 27 種類の VNAR について、スペーサーを付加したコンストラクト 1 の精製後の SDS-PAGE の結果を示した。全てのクローンで均一性が顕著に低いことが示された。また VNAR 部分のクローンの配列によって分子サイズと均一性が異なる結果となった。

図 3.4 には、インプットの出現頻度=n.d.、Fold change>10 を満たす 27 種類の VNAR について、スペーサーを付加していない可変領域のみのコンストラクト 2 の精製後の SDS-PAGE の結果を示した。スペーサーを含まないコンストラクトにおいても、コンストラクト 1 と同様、VNAR 部分の配列により分子量が異なっていた。コンストラクト 2 の均一性は VNAR 部分の配列に関わらず高いことが示された。

これらの結果から、コンストラクト 2 の均一性はコンストラクト 1 よりも高いことが示された。図 3.3 に示した各 VNAR は、15 から 25 kDa の間に複数のバンドを呈するものがあり、純度が低い。より均一性の高い VNAR の調製にはコンストラクト 2 が必要であることが示された。

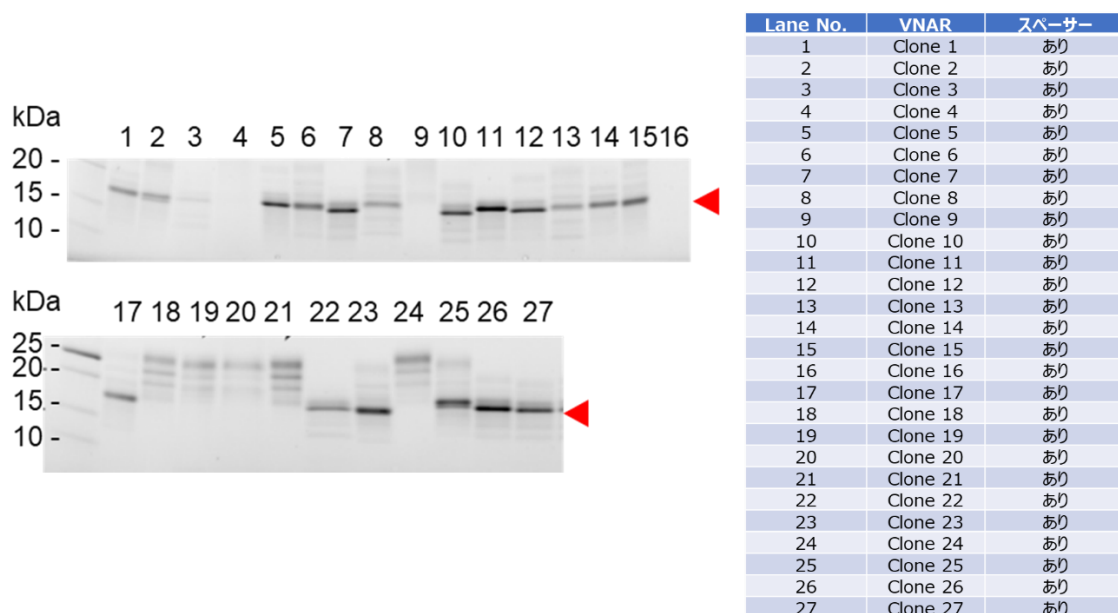


図 3.3 His tag 精製したサメ抗体の純度確認(コンストラクト 1)

コンストラクト 1 の非還元条件で SDS-PAGE を実施した。クライテリアを満たす 27 種類の VNAR の His tag 精製後の電気泳動結果。電気泳動の図の左には分子量を、右には理論上の VNAR の分子サイズの箇所に赤色の三角で表示した。

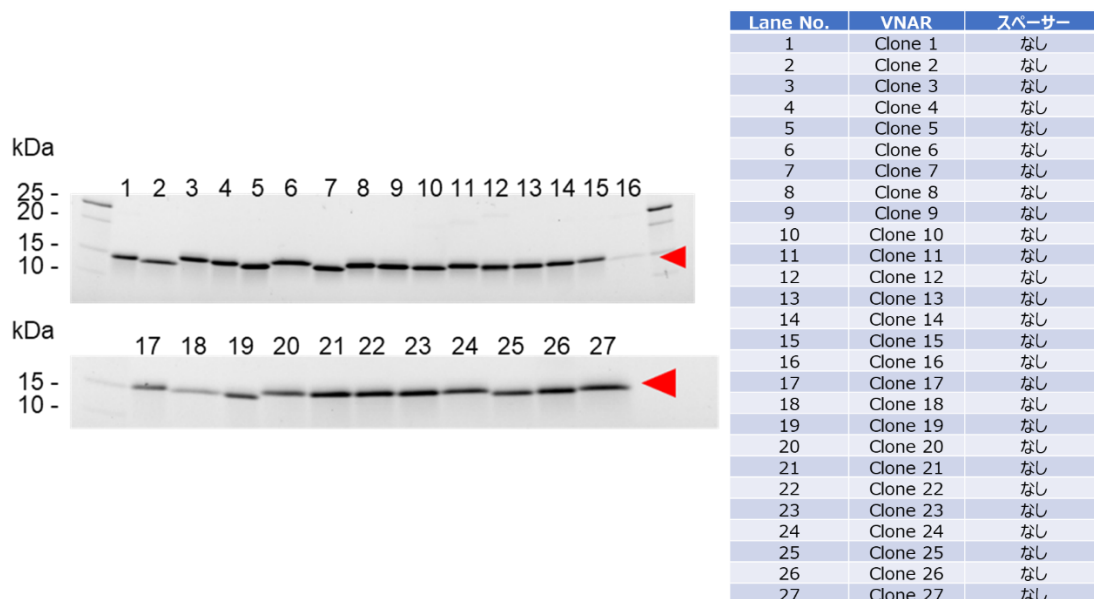


図 3.4 His tag 精製したサメ抗体の純度確認(コンストラクト 2)

コンストラクト 2 の非還元条件で SDS-PAGE を実施した。クライテリアを満たす 27 種類の VNAR の His tag 精製後の電気泳動結果。電気泳動の図の左には分子量を、右には理論上の VNAR の分子サイズの箇所に赤色の三角で表示した。

3.4. 考察

定常領域(C1)のアミノ酸配列を付加することで VNAR の均一性が低下

治療薬および検査薬用途の医薬品原料抗体を生産する際に、均一性は長期保存安定性や薬物動態の観点から非常に重要視されている[3]。今回検証したコンストラクト 1 の配列は VNAR に C1 領域の一部のアミノ酸配列を付加した。他の宿主が産生する抗体はヒンジ領域を持つのに対し、IgNAR はヒンジ領域を持たない[4]。ヒンジ領域が存在しないものの、C1 と C3 が IgNAR の二量体化の役割を担うと同時に、それぞれの二量体化の界面の角度によって、IgNAR 全体の分子としての柔軟性を獲得すると考えられている[4]。

コンストラクト 1 は C1 の配列が付加されており、二量体化、多量体化に寄与した可能性がある。また図 3.2 からコンストラクト 1 のスパーサー部分が二次構造を形成することが予測されることから、複数の構造体が生じる可能性が示唆された。図 3.3 ではコンストラクト 1 の均一性が低いことが示された。図 3.4 に示したコンストラクト 2 は均一性が高いことから、C1 の配列を含まないコンストラクトが均一性の高い VNAR の作製に重要であることが示された。

参考文献

1. Feige, M. J., Gräwert, M. A., Marcinowski, M., Hennig, J., Behnke, J., Ausländer, D., ...

- & Buchner, J. (2014). The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8155-8160.
2. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.
 3. Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C., & Sun, J. (2008). Heterogeneity of monoclonal antibodies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(7), 2426-2447.
 4. Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könning, D., Barelle, C. J., & Kolmar, H. (2015, January). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. In *MAbs* (Vol. 7, No. 1, pp. 15-25). Taylor & Francis.

第 4 章 VNAR の物理化学的特性の解析

4.1. 背景

VNAR のスクリーニング方法はこれまでほとんど検討されていない。スクリーニングされた VNAR の物理化学的特性の解析は、VNAR 取得のためのアプローチの有用性を検証するために重要である。これまで VNAR は物理学的特性の観点から十分に評価されていなかった。そこで、本手法の有用性を検証するため、取得されたクローンと抗原との相互作用解析(ELISA、等温滴定熱量測定法(Isothermal Titration Calorimetry)、表面プラズモン共鳴法(Surface Plasmon Resonance(SPR)))と熱安定性(示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry(DSC))) に関して解析を行った。

4.2. 実験方法

ELISA による有望クローンの選別

PBS で 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した Venus を 50 μL ずつウェルに添加し、1 時間、25°C で静置することで抗原を ELISA プレート上に固定化した。上清を除去し、1% (w/v) BSA 含有 PBS を 300 μL /ウェル添加し、1 時間、25°C で静置することでブロッキングした。1% (w/v) BSA 含有 PBS で 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した VNAR を 50 μL /ウェル添加し、1 時間、25°C で静置した。未反応の VNAR を 1% (w/v) BSA 含有 PBS で洗浄することで除去した。1% (w/v) BSA 含有 PBS で 10,000 倍に希釈した Goat anti-6-His tag HRP-conjugated antibody(Bethyl Laboratories)を 100 μL /ウェル添加し、1 時間、25°C で静置した。各ウェルを 1% (w/v) BSA 含有 PBS で洗浄後、100 μL の TMB 溶液(Thermo Fisher Scientific)を添加し、10 分間、25°C で静置した。100 μL の 1 N 硫酸溶液を添加し、反応を停止させ、ELISA プレートリーダーにて 450 nm の吸光度を検出した。

ELISA による有望クローンの反応特性評価

ELISA プレートは、「ファージ ELISA」に記載の方法で作製した。精製した VNAR に PBS、2 M NaCl 含有 PBS、または 2 M 含有 PBS を等倍量添加、混合した。各 Buffer を用いて、VNAR 溶液の 5 倍希釈系列を調製した。予熱条件のみ、調製した VNAR 溶液を 70°C で 30 分間加熱した後、25°C で静置した。調製した VNAR を 50 μL /ウェル添加し、1 時間、25°C または 4°C で静置した。未反応の VNAR を 1% (w/v) BSA 含有 PBS で洗浄することで除去した。二次抗体添加以降の方法は、「ELISA による有望クローンの選別」に記載の方法で実施した。複数の抗体希釈系列における 450 nm の吸光度から、Softmax 6.5.1 を使用して 4 パラメーターロジスティック回帰モデルでフィッティングを行うことで、 EC_{50} を計算した[1]。

等温滴定型カロリメトリー(Isothermal Titration Calorimetry (ITC))

ITC による分析は、MicroCal PEAQ-ITC automated system(Spectris)で実施した。Venus

および VNAR は PBS にて透析を行い、分析前に脱気を行った。透析外液をリファレンスセルに添加した。VNAR の Venus への相互作用を分析するために、セル側に 50 μ M の Venus を、シリンジ側に 500 μ M の VNAR を利用した。インジェクションは 19 回、リファレンスパワーは 5 μ cal/sec、セルおよびシリンジの温度は 25°C に設定した。データ解析は MicroCal Origin v1.21(Spectris)で行った。

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance(SPR))

SPR による分子間相互作用は、Biacore 8K(Cytiva)で行った。Sensor Chip CM5(Cytiva)に Mouse antibody Capture Kit(Cytiva)を用いて、抗マウス抗体をセンサーチップに固定化した。HBs-EP(0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA および 0.005% (v/v) Surfactant P20)(Cytiva)で 2 μ g/mL に調製した VNAR-mouse Fc を 30 μ L/min で通液した。Venus 溶液の 2 倍希釈系列を準備し、30 μ L/min で通液することでセンサーグラムを得た。結合時間、解離時間はそれぞれ 120 秒、300 秒に設定した。再生は glycine-HCl (pH 1.7)を 30 μ L/min で 30 秒間通液した。カイネティクスパラメーターは、Biacore Insight Evaluation Software 2.0.15.12933(Cytiva)で、シングルサイクル解析を行うことで計算した。

示差走査型カロリメトリー(Differential Scanning Calorimetry (DSC))

DSC は MicroCal PEAQ-DSC(Spectris)で行った。VNAR は PBS で透析したサンプルを使用した。透析外液をリファレンスセルに添加した。昇温速度は 1°C/min、分析温度は 30°C から 90°C に設定した。リファレンスには PBS を使用した。得られた吸熱カーブから非二状態モデルで熱安定性を解析した。解析ソフトウェアは、MicroCal PEAQ-DSC software v1.53(Spectris)を使用した。

4.3. 実験結果

ELISA による有望クローンの選別

図 4.1 には調製した 26 種類の VNAR の ELISA での反応性評価結果を示す。Expi293 細胞で調製した 27 種類の抗体クローンの内、1 種類は発現が他のクローンと比べ著しく低く、また調製過程での回収率が低いことから、ELISA の評価対象から除外した。

ELISA で評価した 26 クローンで、Venus に対する反応性で吸光度が 0.3 を上回ったクローンは、H3-5、L2-1、L3-4、L3-5、S2-1、S3-1、U3-13 の 7 クローンであった。さらに、Venus の測定値(吸光度)から BSA の測定値(吸光度)を差し引いた値が 0.3 を上回ったクローンは L3-5、S3-1 および H3-5 の 3 クローンであった。Urea のプールから選別されたクローン(U3-13)は、BSA に対する非特異的な反応性が確認されたため、詳細な物理化学的特性解析の対象クローンから除外した。

以上の結果から、L3-5、S3-1 および H3-5 の 3 クローンを有望クローンとして選別し、以降の詳細な分析を進めた。これらの抗体は、①インプットにおいて検出されず、②Fold

change が 10 以上で、③Venus に対して特異的な反応性を示すクローンである。

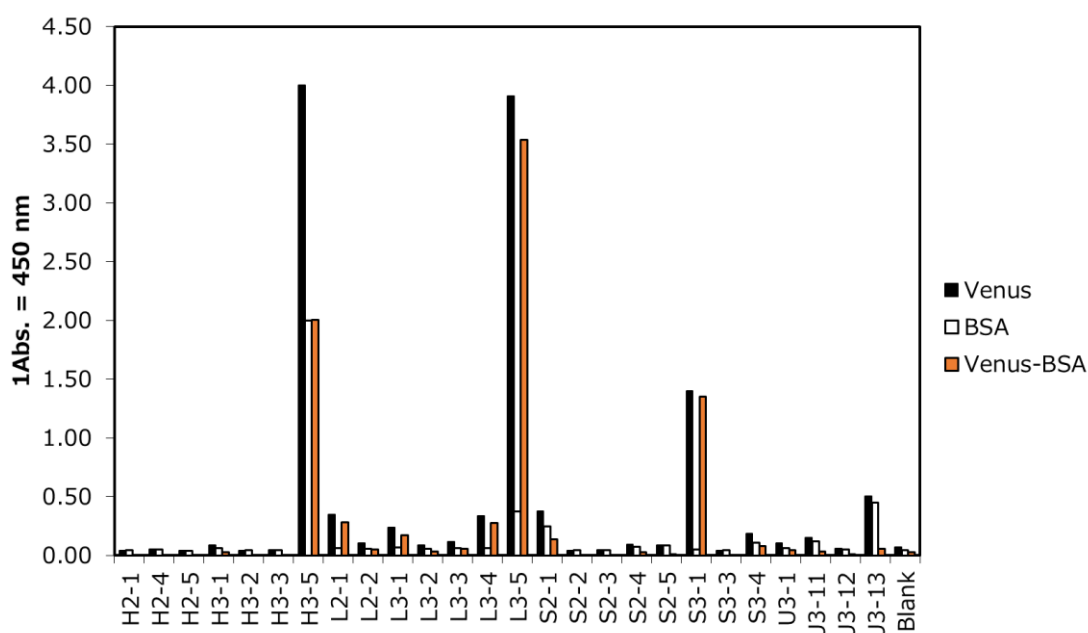


図 4.1 各ユニーククローンの反応性比較

40 $\mu\text{g/mL}$ の各 VNAR を 50 μL 添加した時の Venus または BSA に対する反応性を示した。黒のグラフは Venus に対する吸光度を、白のグラフは BSA に対する吸光度を、オレンジのグラフは、Venus の吸光度から BSA の吸光度を差し引いた値を示した。

有望クローンとして選別された VNAR の配列の特徴

表 4.1 に、有望クローンとして選別した VNAR の特徴を示す。高尿素条件においては、クライテリアを満たすクローンが選別されなかった。

ここで Z11 は通常法(N3)で最も高頻度で存在するクローンであり、大腸菌の発現バイアスにより、出現頻度が増加したクローンである。このクローンはランダムピックアップ法により、容易に単離することができる。Z11 の CDR3 の長さは 18 アミノ酸で、インプットにおいても 0.012% 存在している。またそれ以外の選択圧を変更したプールにおいても Z11 は高頻度に出現している。

L3-5 は、CDR3 の長さが 18 アミノ酸で、インプットにおいては検出されなかった。また N3 プールにおいては出現頻度が 0.001% であったのに対し、L3 プールにおいては、出現頻度が 0.014% であった。従って、Fold change は 11.3 と 10 以上の値であった。N3 プールにおいては出現頻度が 0.001% であったことから通常法においては低頻度で存在するクローンで単離するのは極めて困難であり、選択圧の検討と NGS の活用により選別できたと言える。Z11 と L3-5 の CDR3 は 7 アミノ酸異なっていた。

S3-1 は、CDR3 の長さが Z11 と同じで 18 アミノ酸だった。インプットにおいてこの配

列は検出されなかった。N3 においては 0.001%であったのに対し、S3 のプールにおいては出現頻度が 0.014%であり、Fold change が 10.7 で 10 以上であった。Fold change が 10.7 であることから、L3-5 と同様、通常法では取得が困難な配列であると考えられる。

H3-5 は CDR1 と CDR3 内に追加の Non Canonical Cysteine が 2 つずつ存在することから、選別された VNAR の中で唯一タイプ V に分類される [2]。CDR3 以外にも、FR や CDR1、HV4 において Z11 と配列の違いが見られた (図 4.2)。CDR3 の長さは、Z11 の CDR3 より長く、21 アミノ酸であった。インプットおよび N3 プールにおいては、H3-5 の CDR3 は検出されなかった一方で、H3 プールにおいては、出現頻度が 0.016%であった。N3 プールにおいて配列が検出されなかったことから、通常法で取得するのは困難なクローンであり、選択圧と NGS を組み合わせたことで取得できた抗体であると考えられる。

NGS の解析結果、選択圧特異的に濃縮した 3 種類のクローンは、いずれも通常法では取得困難なほど低頻度しか存在しないクローンであることがわかった。またそれぞれのパニング後のプールにおいても、出現頻度が 0.014%–0.016%と低頻度であり、通常法の配列頻度との比較を行うことで、スクリーニング可能なクローンであることが示された。このことから選択圧と NGS 解析を組み合わせることにより、パニング条件特異的に濃縮したクローンが選別できる可能性を見出した。

表 4.1 選別したクローンの特徴

クロー ン	プール	CDR3 配列	タイプ	CDR3 長	出現頻度(%)			Fold change
					インプット	N3	各プール	
L3-5	L3	RDGVHGLGVCA ^{SYN} RY	II	18	n.d. ¹⁾	0.001	0.014	11.3
S3-1	S3	RDGVK ^{GS} LGVC ^{DTA} ATGY	II	18	n.d. ¹⁾	0.001	0.014	10.7
H3-5	H3	QDVRYGFRGCVWGYRCS ^{DLY}	V	21	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾	0.016	>12.7
Z11	All ²⁾	RDGVQ ^{GIL} GVCD ^{TA} ATGY	II	18	0.0120	36.633	-	-

1) n.d.=not detected(検出されなかった)

2) Z11 はいずれのプールでも高頻度に出現

図 4.2 に各 VNAR のアミノ酸配列を示した。サメ抗体における CDR1、CDR3、HV2 および HV4 は配列の下に示した。L3-5、S3-1 および通常法で出現する Z11 は、タイプ II に分類される配列であり、H3-5 のみタイプ V に分類されるクローンであった [2]。H3-5 は CDR1 に含まれる 30 位の Cys 残基と CDR3 に含まれる 102 位の Cys 残基が架橋し、追加のジスルフィド結合を形成していると考えられる。HV2 は全ての抗体で同一の配列であった。HV4 は H3-5 のみ 65 位が Asn 残基ではなく Lys 残基であった。

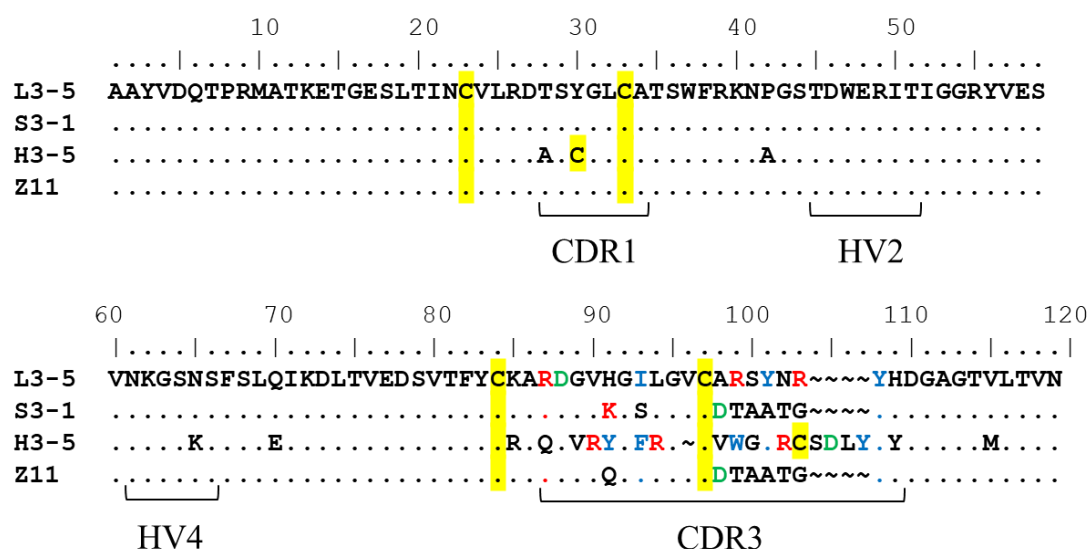


図 4.2 各サメ抗体配列のアライメント

BioEdit version 7.2.5 のアライメント機能(Clustal W)で配列を表示した[3]。Cys 残基を黄色でハイライトした。CDR3 の Arg 残基または Lys 残基は赤色で、Asp 残基は緑で、疎水性アミノ酸(Ile 残基、Phe 残基、Trp 残基および Tyr 残基)は青色で示した。

次に、Z11 と選別された VNAR の純度を確認するために、SDS-PAGE を実施した。図 4.3 に各 VNAR の SDS-PAGE の結果を示す。各クローンとも約 15 kDa 付近にシングルバンドを呈した。このことから、各抗体とも均一性の高い VNAR が調製できたことが分かった。

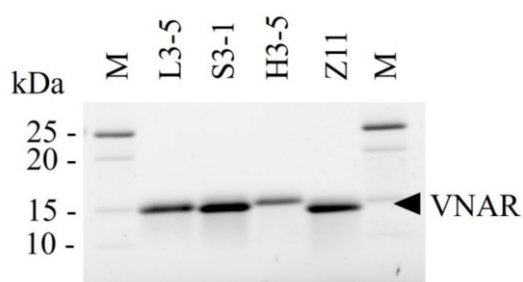


図 4.3 選別されたクローンの SDS-PAGE

非還元 SDS-PAGE。各サンプルは 1 μ g 添加し電気泳動した。M：タンパク質マーカー

通常条件における VNAR の反応性比較

大腸菌の発現バイアスによりファージディスプレイ法で優先的に濃縮される Z11 と、パニング条件特異的に濃縮した VNAR の反応性を比較することは、出現頻度が低い場合でも適切な選択圧と NGS の活用により、高機能な VNAR を取得できることを示すため重要である。

図 4.4 に通常の ELISA 条件における各クローンの反応性を示した。L3-5、S3-1、H3-5 および Z11 の EC_{50} はそれぞれ、 3.0×10^{-7} 、 1.3×10^{-6} 、 9.0×10^{-8} および 1.3×10^{-6} M であることが示された。このことから、選別された抗体は、Z11 と同等以上の反応性を示すことが明らかとなった。L3-5 は 4.3 倍、H3-5 は 16.3 倍、Z11 より反応性が向上した(図 4.5)。

このことから、大腸菌の発現バイアスによりファージライブラリの多様性が低下した場合でも、上記の方法によって、通常法で取得されるクローンよりも高い反応性を示すクローンの選別が可能であることを示した。

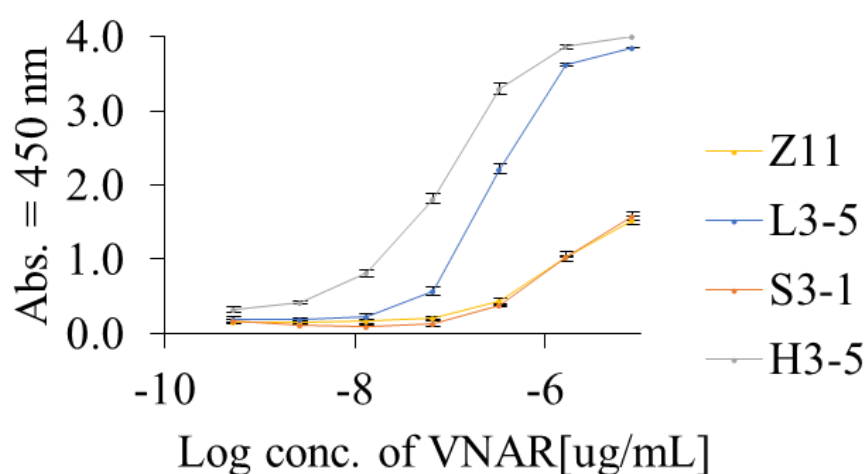


図 4.4 通常条件における物理吸着抗原プレートでの ELISA による反応性比較

ELISA プレートには、Venus を $0.1 \mu\text{g} / \text{well}$ 固定化し、1% (w/v) の BSA を含む PBS にてブロッキングを行った。各サメ抗体を ELISA プレートに添加し反応することで、抗原反応性の比較を行った。横軸には添加した抗体濃度を、縦軸には A450 の吸光度を示した。エラーバーは繰り返し 3 回測定による標準偏差を示した。シグモイドカーブが左側にシフトする程、強い抗原結合活性を示す。

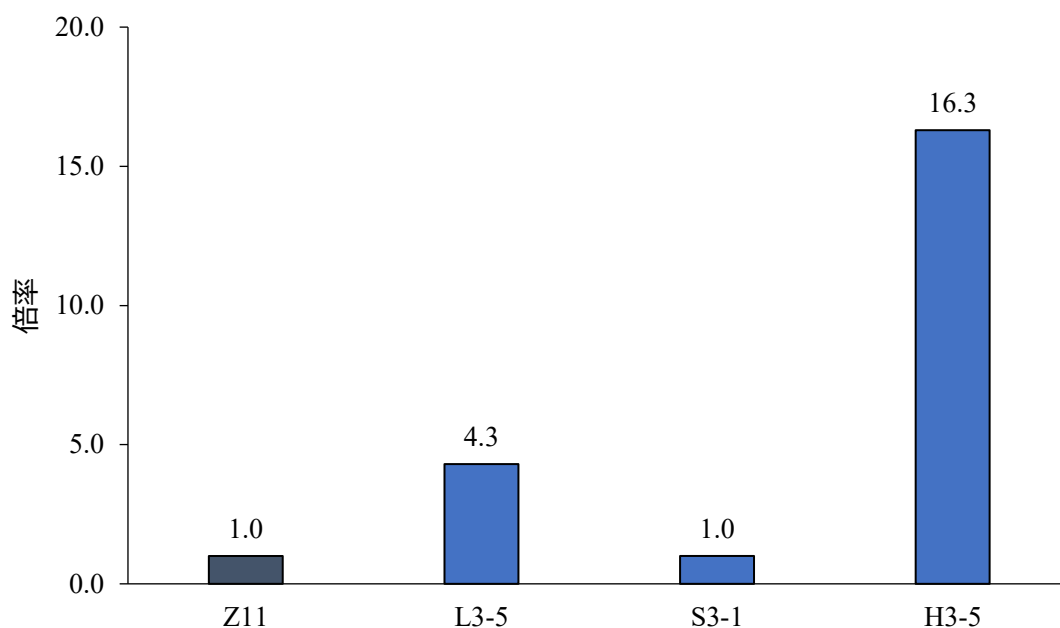


図 4.5 通常条件における物理吸着抗原プレートでの反応性の比較

図 4.4 のシグモイドカーブから算出された EC_{50} を用いて反応性を比較。Z11 の EC_{50} を各変異体の EC_{50} で割った値を示した。通常法で取得される Z11 は灰色のグラフで、提案法で取得された抗体は青色のグラフで示した。縦軸の値が高い程、抗原への反応性が高いことを示している。

次に ITC による相互作用解析結果を表 4.2 および図 4.6 に示す。分子同士が相互作用する場合、発熱または吸熱が生じる。ITC は、相互作用に伴う熱量の変化を検出することができ、またタンパク質にラベルをすることなく、相互作用解析が可能である。検出した熱量変化から、親和性やギブス自由エネルギー変化 (ΔG)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) および結合比を分析することができる。 ΔH と ΔS の両方が寄与することで ΔG は常に負の値となる。各抗体は良好なフィッティングを示した。

Z11 はエンタルピー変化が -7.85 kcal/mol で、エントロピー変化が -0.05 kcal/mol であった。このことから、Z11 は、抗原との相互作用において有利なエンタルピー変化を示した。これは、Z11 がエンタルピー駆動の相互作用をする抗体であることを示す。エンタルピー変化の寄与が大きい場合は、一般に水素結合やファンデルワールス力、静電相互作用が関与していると考えられている。

L3-5 はエンタルピー変化が -8.26 kcal/mol で、エントロピー変化が 0.28 kcal/mol であった。このことから L3-5 も抗原との相互作用において有利なエンタルピー変化を示したことから、エンタルピー駆動の相互作用をする抗体であることが示された。Z11 と比較したエンタルピー変化が -0.07 kcal/mol であることと、L3-5 の CDR3 に荷電アミノ酸が多く含まれることから、静電相互作用が Z11 と比較して有利に働いたことで通常条件の ELISA で反応性が向上したと示唆された(図 4.4、図 4.5)。

S3-1 はエンタルピー変化が -9.71 kcal/mol で、エントロピー変化が 1.99 kcal/mol であった。このことから S3-1 は抗原との相互作用において有利なエンタルピー変化と不利なエントロピー変化を示したことから、エンタルピー駆動の相互作用をする抗体であることが示された。

H3-5 はエンタルピー変化が -1.61 kcal/mol で、エントロピー変化が -6.76 kcal/mol であった。H3-5 はエンタルピー変化およびエントロピー変化が有利に働き、特にエントロピー変化の寄与が大きいことが示された。このことから、H3-5 は、選別された抗体で唯一エントロピー駆動の抗体であることが示された。エントロピー変化の寄与が大きい場合は、一般に疎水性相互作用が関与していると考えられている。CDR3 は VNAR の相互作用に特に重要であり、図 4.2 に示す CDR3 に疎水性アミノ酸を多く含むことと、H3-5 が主に疎水性相互作用によって Venus と結合することは強く関連があると考えられる。また図 4.1 で H3-5 は BSA に対しても反応性を示したのは、疎水性相互作用が影響していることが示唆された。Z11 と比較したエントロピー変化が、 -6.71 kcal/mol であることから、通常条件の ELISA で Z11 よりも反応性が高かったのは、疎水性相互作用による有利なエントロピー変化の獲得が寄与したと考えられる(図 4.4、図 4.5)。

表 4.2 ITC の結果

クローン	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
Z11	-7.91	-7.85	-0.05
L3-5	-7.98	-8.26	0.28
S3-1	-7.72	-9.71	1.99
H3-5	-8.38	-1.61	-6.76

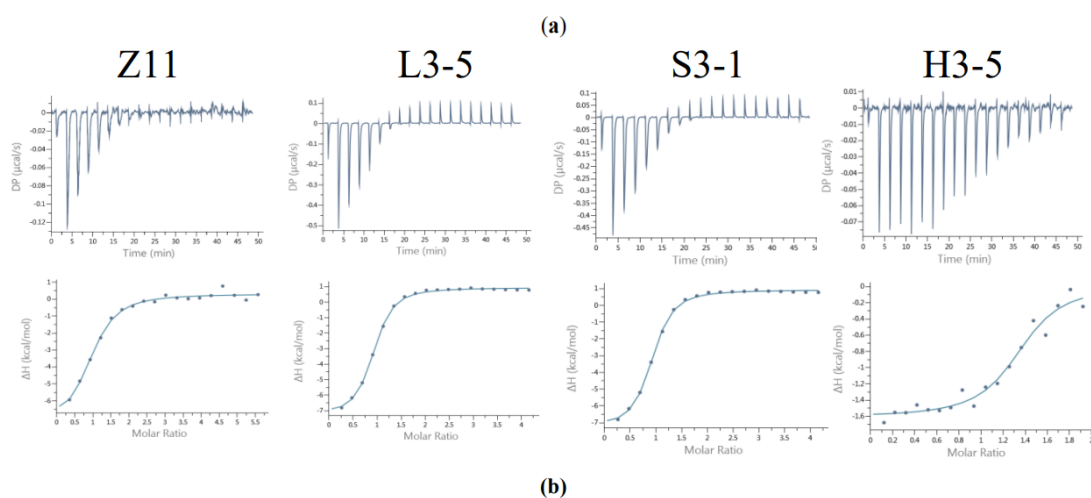
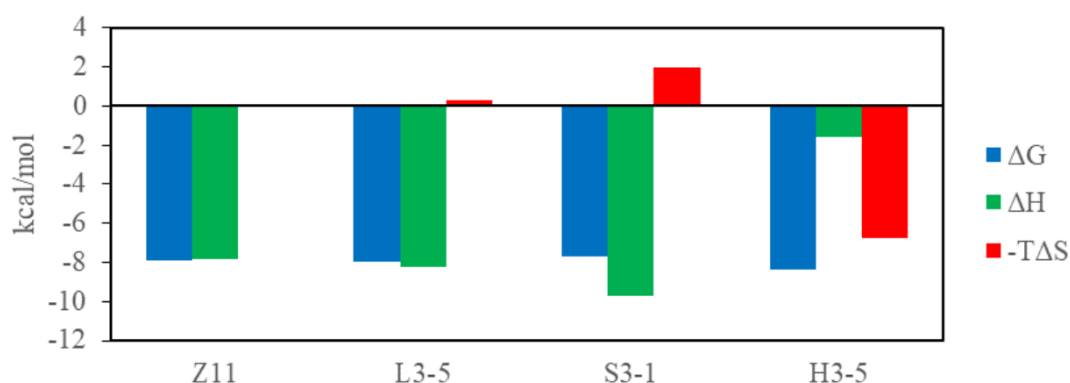


図 4.6 ITC の測定結果の詳細

(a) 4 種類の VNAR の Venus との相互作用における熱力学的な解析結果を示した。(b) Venus を Z11、L3-5、S3-1 および H3-5 に滴定した時に得られる ITC カーブを示した。

特殊条件での反応性比較

パニング条件に設定した ELISA を行うことで、選別されたクローンの反応特性の評価を行った。選別された抗体が各パニング条件に応じた特性を有している場合、適切な選択圧の設定がなされていると言える。

ELISA で取得されたシグモイドカーブから 4 パラメトリックロジスティック回帰モデルを使用して 50%効果濃度(EC_{50})を算出した[1]。残存活性率は、通常条件の EC_{50} を条件変更後の EC_{50} で割った値を示した。ここで、残存活性率が 100%を超える場合は、条件変更後において反応性が向上していることを示している。通常法で高頻度に出現する Z11 と、パニング条件特異的に濃縮したクローンの各 ELISA 条件における残存活性率を図 4.7 に示した。

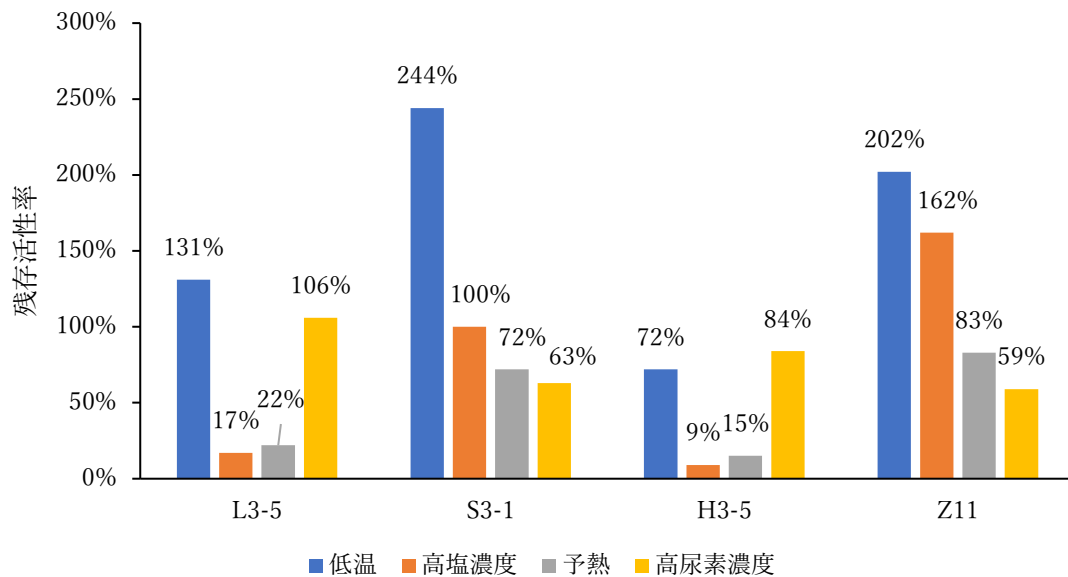


図 4.7 各 ELISA 条件での残存活性率

残存活性率は通常条件で得られた吸光度のシグモイドカーブから算出した EC_{50} と各 ELISA 条件で算出された EC_{50} の比率を示す。残存活性率が 100%を超える場合は、通常の ELISA 条件と比較して、条件変更後で反応性が向上していることを示す。残存活性率は、低温を青色、高塩濃度をオレンジ色、予熱条件を灰色、高尿素条件を黄色で示した。

まず低温条件における ELISA での反応性評価を行った(図 4.7 および図 4.8)。4°Cにおける残存活性率は、L3-5 が 131%、S3-1 が 244%、H3-5 が 72%、Z11 が 202%であった。低温条件下で反応性が顕著に低下するクローンはないことがわかった。L3 プールに存在する L3-5 および Z11 は、低温にした場合に、反応性が向上していることから、パニング条件に応じた反応特性を有していることが示唆された。パニング条件に応じた反応性を示したことから、選択圧が適切に機能したと言える。

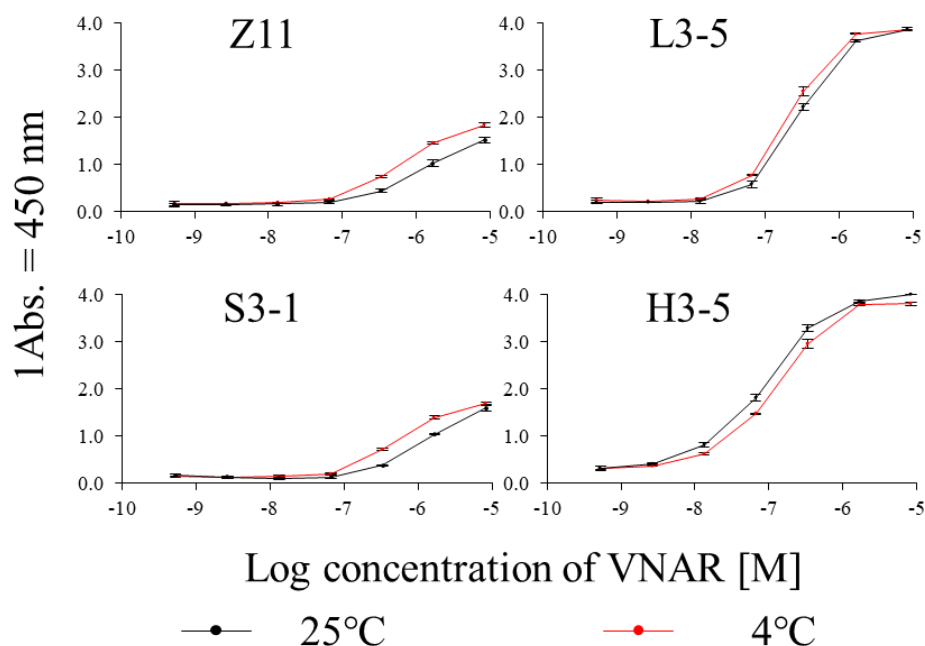


図 4.8 低温条件における ELISA 反応性比較

反応温度が 25°C(黒のプロット)または 4°C(赤のプロット)に設定した時の各クローンの反応性比較を示した。横軸に添加抗体濃度を、縦軸に A450 を示した。エラーバーは繰り返し 3 回測定における標準偏差を示した。

次に、高塩濃度条件における各クローンの反応性を図 4.7 および図 4.9 に示した。残存活性率は Z11 が 162%、L3-5 が 17%、S3-1 が 100%、H3-5 が 9%であった。Z11 および S3-1 は高塩濃度条件においても反応性を保持したのに対し、L3-5 および H3-5 は反応性が著しく低下した。S3-1 は高塩濃度条件でのパニングでスクリーニングされたクローンであることから、パニング条件に即した反応特性を有していることが示された。高塩濃度条件では静電遮蔽が生じることから、静電相互作用を主とした相互作用である抗体は反応性が顕著に低下する[4,5]。このことから、S3-1 は静電相互作用以外のエンタルピーが有利に働く相互作用で抗原に結合することがわかった。

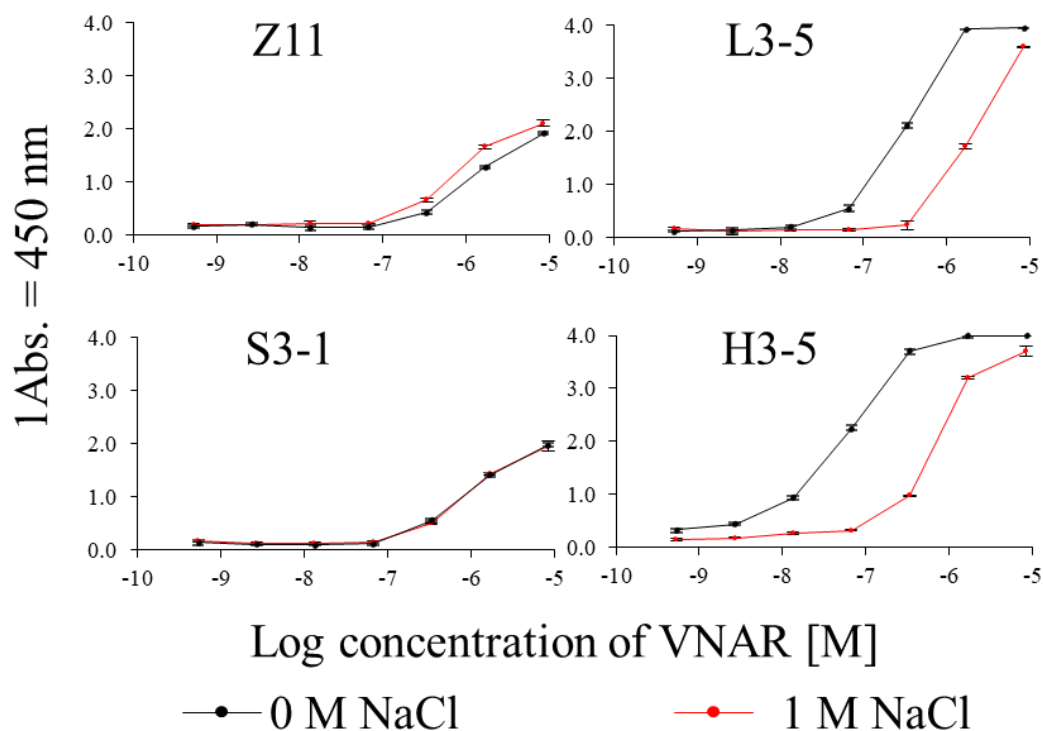


図 4.9 高塩濃度条件における ELISA 反応性比較

塩濃度を 0(黒のプロット)または 1 M(赤のプロット)に設定した時の各クローンの反応性比較を示した。横軸に添加抗体濃度を、縦軸に A450 を示した。エラーバーは繰り返し 3 回測定における標準偏差を示した。

次に予熱条件における ELISA の評価結果を図 4.7 および図 4.10 に示す。残存活性率は、Z11 が 83%、L3-5 が 22%、S3-1 が 72%、H3-5 が 15%であった。Z11 および S3-5 は予熱後も残存活性率に顕著な低下が見られなかったのに対し、L3-5 および H3-5 は残存活性率が著しく低下した。予熱した後にパニングした H3-5 は、予熱後の残存活性率が低かったことから、パニング条件とは異なる抗体反応特性を示すことが分かった。このことから、加熱後の残存活性率を向上させるための選択圧として予熱処理する工程は適さないと言える。一方で、Z11 および S3-1 は予熱処理後も反応性を維持したことから、加熱後にも活性を維持する VNAR はファージライブラリ中に含まれることがわかった。以上のことから加熱後の残存活性率を維持するには予熱以外の選択圧の検討が必要である。

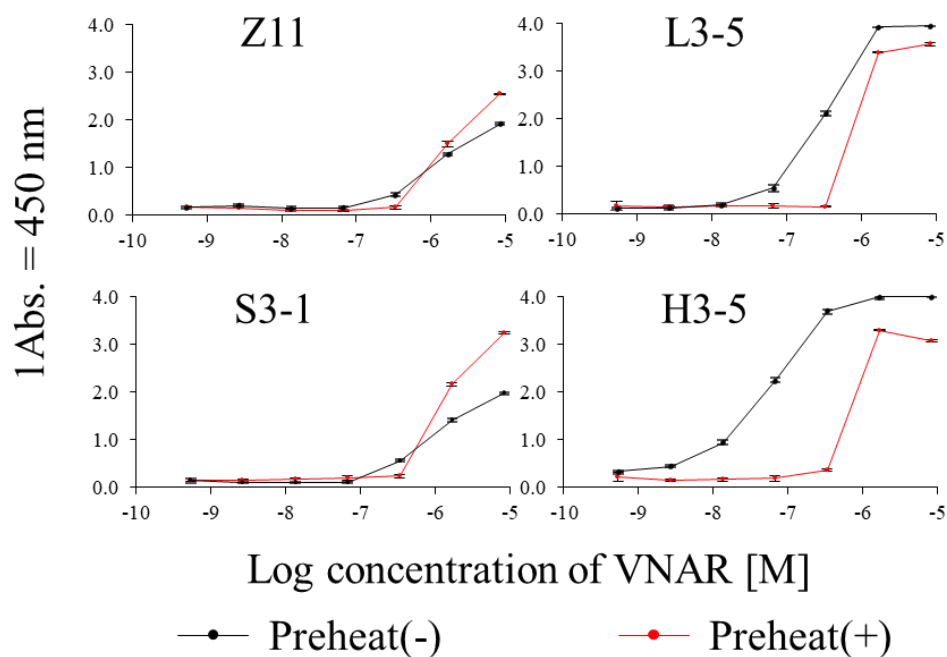


図 4.10 予熱条件における ELISA 反応性比較

予熱(70°Cで30分間加温後に25°Cで保温)あり(赤のプロット)またはなし(黒のプロット)に設定した時の各クローンの反応性比較を示した。横軸に添加抗体濃度を、縦軸に A450 を示した。エラーバーは繰り返し3回測定における標準偏差を示した。

U3 プールからは、2つのクライテリアを満たすユニーク配列(インプット=n.d.、Fold change>10)が4種類選別されたが、いずれのクローンも反応性が低く、且つBSAに対しても反応性を示したことから、詳細な物理化学的特性の評価対象から除外した。他のパニング条件で選別されたクローンの高尿素条件でのELISAの結果を図4.7および図4.11に示す。L3-5、S3-1、H3-5およびZ11の残存活性率はそれぞれ106%、63%、84%および59%であることが示された。Z11以外はU3で検出されないクローンだが、反応性が著しく低下するクローンはなかった。

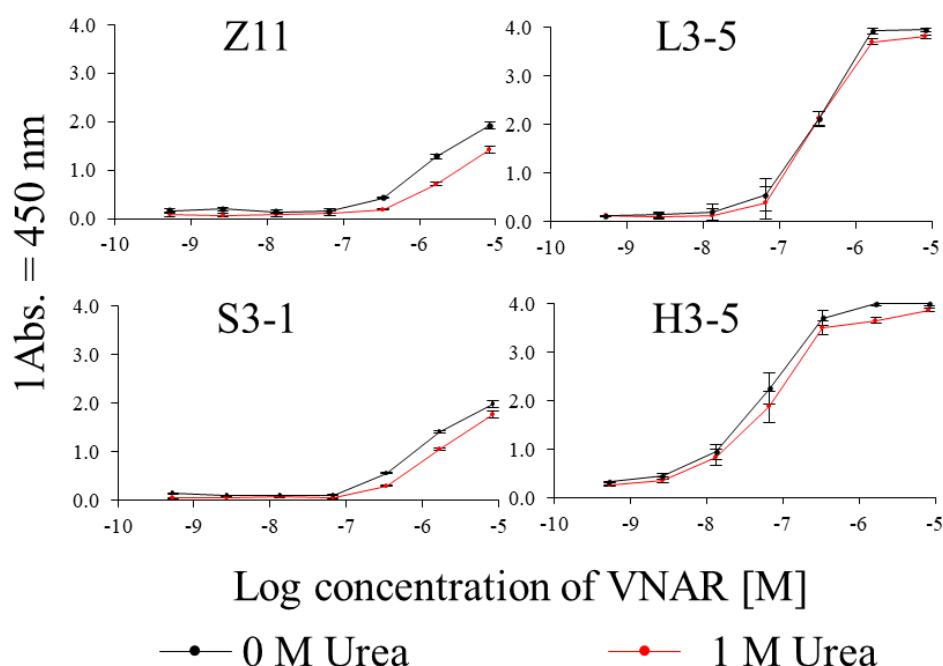


図 4.11 高尿素条件における ELISA 反応性比較

尿素濃度を 0 (黒のプロット) または 1 M (赤のプロット) に設定した時の各クローンの反応性比較を示した。横軸に添加抗体濃度を、縦軸に A450 を示した。エラーバーは繰り返し 3 回測定における標準偏差を示した。

以上の検討から、パニング条件の検討と NGS の解析を組み合わせることで、通常条件では低頻度でしか存在しない高機能なサメ抗体の選択が可能となった。また選択圧特異的に濃縮されたクローンは、通常条件で高頻度に出現する抗体クローンよりも顕著に反応性が高いことが示された。さらに、各パニング条件に応じた特性を有していることを示した。

VNAR の熱安定性評価

scFv の既報の研究では、予熱後のパニングによって熱安定性の向上が示されている [6]。そこで、H3 プールから選別された H3-5 とそれ以外の VNAR との熱安定性の比較を行った。

熱安定性はタンパク質の安定性に関する指標であり、抗体開発の評価に利用されてきた [7, 8]。予熱処理を行うことで抗体がどのような変性過程を経るかを解析するため、DSC による熱安定性指標の評価を行った。まず中点変性温度 (T_m 値) を算出した。タンパク質は、天然状態と変性状態の間で平衡状態となっている。 T_m 値が高いほど、高温で変性するため安定である。DSC ではタンパク質の変性に伴うエンタルピー変化 (ΔH) を DSC カーブの面積から算出することができる (図 4.12)。またこの論文では熱容量 (ΔCp) が最大となる温度を T_m 値として算出した。

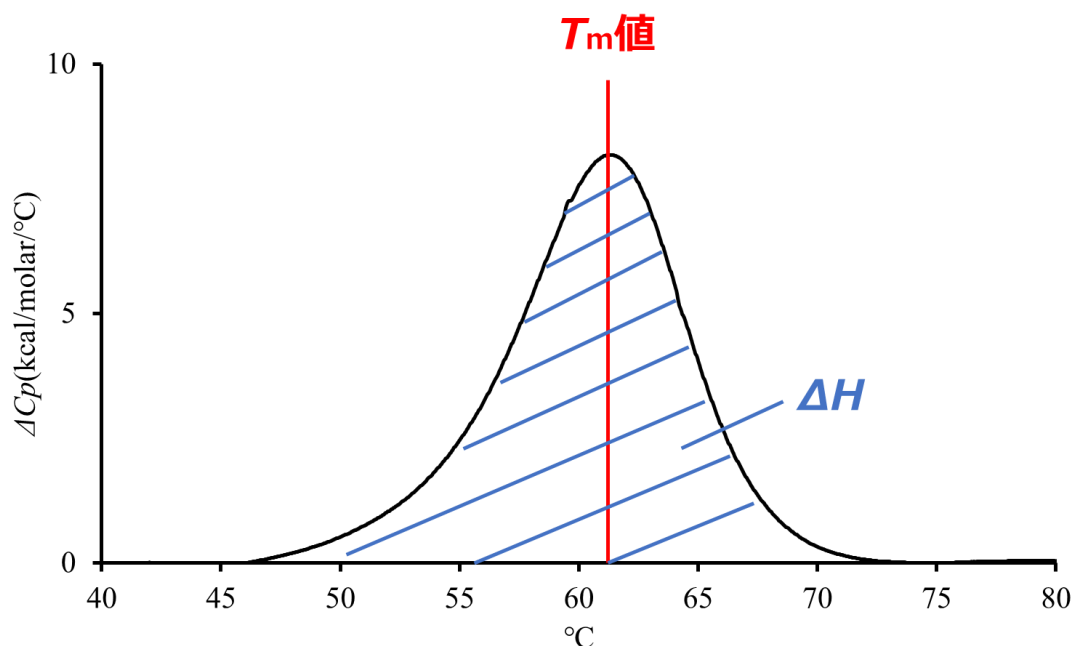


図 4.12 DSC カーブの T_m 値と ΔH

図 4.7 と表 4.3 に各 VNAR の熱安定性の測定結果を示す。Z11 が 61.2°C、L3-5 が 55.5°C、S3-1 が 61.7°C、H3-5 が 62.9°C と分析された。H3-5 の T_m 値は 69.2°C と測定した VNAR の中で最も高いことが示され、過去の研究における予熱処理後のパニングで T_m 値が向上した報告と一致した[6]。VNAR においても予熱によるパニングにより T_m 値向上に寄与する選択圧が生じたと言える。

続いて VNAR の可逆性について解析した。ここで可逆性とは、加熱による変性後、再び折りたたまれて抗体としての構造を持つ能力のことを示す。各 VNAR の可逆性を評価するために、繰り返し昇温し DSC カーブを得た。1 回目の昇温で得られる吸熱ピークの面積 (H_{1st}) と 2 回目の昇温で得られる吸熱ピークの面積 (ΔH_{2nd}) の比 ($\Delta H_{2nd} / \Delta H_{1st}$) を可逆性の指標とし、その割合が大きいほど可逆性が高いと評価した。

図 4.13 および表 4.3 から、Z11、L3-5、S3-1 および H3-5 の可逆性はそれぞれ 80%、56%、69% および 5% と算出された。1 回目と 2 回目のスキャンで T_m 値が著しく変化しなかった。この結果から、H3-5 は 5% と顕著に可逆性が低く、70°C で加温した場合、溶液中の大部分が不可逆的に熱変性し反応性を示さなくなることが示された。一方、ELISA における残存活性率の高かった Z11 と S3-1 の可逆性はそれぞれ 80% と 69% で高いことが示された。残存活性率の低かった L3-5 と H3-5 の可逆性は 56% と Z11 および S3-1 より低かった。これらの結果から、ELISA における残存活性率が、DSC の可逆性と類似した傾向を示すことが分かった。

以上の結果から、パニングの予熱処理は可逆性ではなく、 T_m 値の向上に寄与することが

示唆された。

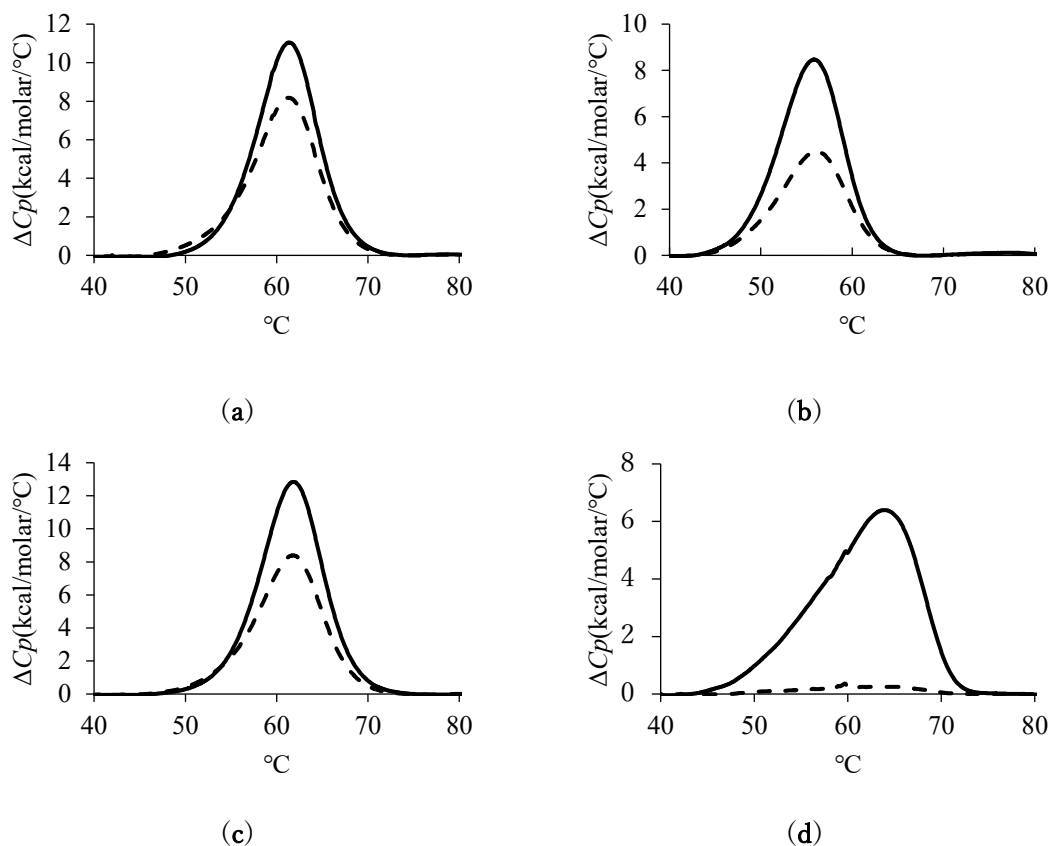


図 4.13 DSC による熱安定性および可逆性の比較

実線は 1 回目の昇温で得られた DSC カーブを、破線は 2 回目の昇温で得られた DSC カーブを示した。各抗体を 1 mg/mL に PBS を用いて調製し、1 °C/min にて、30°C から 90°C まで昇温することで DSC カーブを得た。降温後に再度同条件で昇温し再スキャンでの DSC カーブを得た。MicroCal PEAQ-DSC のソフトウェアを用いて中点変性温度 (T_m 値) および DSC カーブにより得られたピーク面積 ΔH を算出した。再スキャン時の ΔH を 1 回目のスキャンで得られた ΔH で割った値を「可逆性」とした。(a) Z11、(b) L3-5、(c) S3-1、(d) H3-5

表 4.3 熱安定性の解析結果

	T_m 値 ¹⁾	可逆性 ²⁾
Z11	61.2°C	80%
L3-5	55.5°C	56%
S3-1	61.7°C	69%
H3-5	62.9°C	5%

¹⁾ 1 回目のスキャンにおける DSC カーブにおける最大値を示す温度とした

²⁾ 2 回目のスキャンの変性のエンタルピー変化を 1 回目のスキャンの変性のエンタルピー変化で割った値

4.4. 考察

VNAR は元々、低温と高濃度尿素耐性を示す可能性

選別された VNAR が、低温と高尿素条件に耐性を示したことについて考察する。サメの血液中には浸透圧制御のために高濃度の尿素が含まれている[9]。またサメの体温は一般に 15–25°C で、他の免疫動物と比較して体温が低い。筆者は VNAR 特有のパニング方法を見出すために、サメの生理学的条件を模倣したパニング条件を検討した。L3 プールで濃縮されなかった S3-1 と H3-5 は低温でも高い残存活性率を示した (図 4.8)。L3-5、S3-1、H3-5 は U3 プールでは選択されていないにもかかわらず、高尿素条件において高い残存活性を示した (図 4.11)。これらの結果から低温耐性と高尿素濃度耐性が VNAR 特有の特徴であることが示唆された。

VNAR が温度変化に伴いどのような相互作用の変化が生じるのか評価するために、表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance (SPR) 法) による親和性解析を行った。25°C と 4°C での親和性解析結果を図 4.14 および表 4.4 に示す。25°C での VNAR の平衡解離定数 (K_D 値) は、4°C での K_D 値と比較して、L3-5 では 57.2 倍、S3-1 では 5.4 倍、Z11 では 24.5 倍増加した (K_D 値の増加は親和性の低下を示す)。VNAR の場合、温度上昇に伴い、結合速度定数 (k_{on}) は僅かに上昇し、 k_{off} は著しく上昇した (k_{off} の上昇は解離がしやすくなることを示す)。一方、他のフォーマットの抗体や分子は温度上昇に伴い、 k_{on} 、 k_{off} 両方が増加することが報告されている [10–12]。これはサメが生息する温度帯が一般に 25°C 以下であるため、血液中に存在する VNAR は低温でより高い活性を示すと予測され、且つそれは k_{off} の寄与が大きいと考えられる。

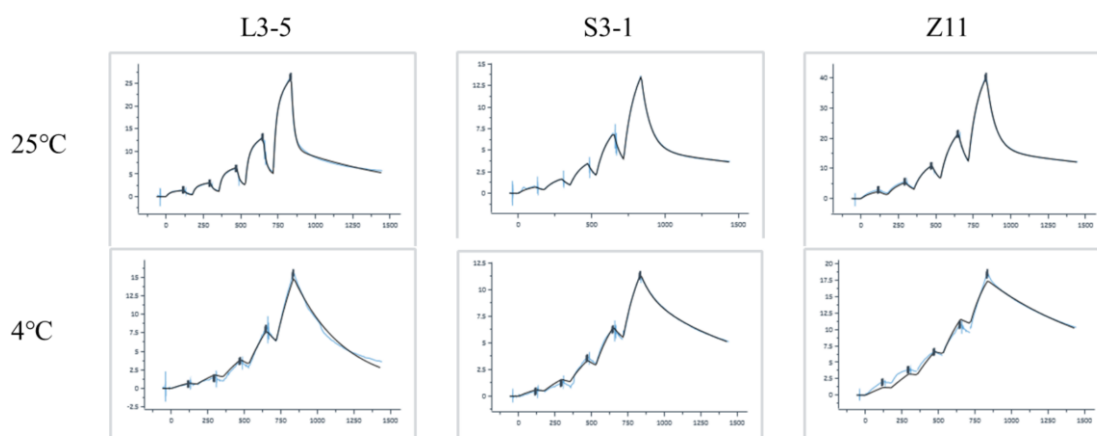


図 4.14 SPR のセンサーグラム (4°C と 25°C)

黒線はフィッティングカーブ、青色は実測値である。Single cycle kinetics での解析したフィッティングカーブを示した。

表 4.4 温度がカイネティクスパラメーターに及ぼす影響

クローン	25°C			4°C		
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
L3-5	1.66×10^3	2.52×10^{-1}	1.51×10^{-4}	1.09×10^3	2.88×10^{-3}	2.64×10^{-6}
S3-1	1.13×10^3	1.44×10^{-2}	1.27×10^{-5}	2.64×10^3	6.25×10^{-3}	2.37×10^{-6}
Z11	2.74×10^3	1.50×10^{-2}	5.48×10^{-6}	1.35×10^4	3.02×10^{-3}	2.24×10^{-7}

H3-5 は、サンプル調製中に凝集し、測定することができなかった。

VNAR は低温だけでなく高尿素濃度にも耐性を示した。既報の論文においては 0.5 M の尿素濃度でタンパク質が変性作用を示した[13]。また尿素が抗原抗体反応を阻害する場合があることが報告されている[14]。サメの血液中には高濃度の尿素が含まれており、不安定なタンパク質は変性し分解される[15]。本論文で得た結果と既報の論文の情報から、VNAR は元々高濃度の尿素に対して耐性があると示唆された。U3 プールでは、抗原非特異的なファージの濃縮が観察され(図 2.3)、抗原に特異的な反応性を示す VNAR を取得することができなかった。VNAR が元々高濃度の尿素に対し耐性を示す場合、VNAR のパニング過程において、必ずしも過剰な濃度の尿素を添加する必要はないと言える。

以上のように、低温と高濃度の尿素濃度に対し、VNAR は元々耐性がある可能性があり、ユニークな特性を持つ VNAR を取得するためのパニング条件設定において非常に重要な知見を得た。

高塩濃度耐性を示す VNAR と荷電アミノ酸の関係

図 4.7 および図 4.9 で示した通り、VNAR によって高塩濃度の耐性が異なっていた。サメの血液中には、高濃度の NaCl が含まれる[9]。S3 プールに含まれる S3-1 および Z11 は、1 M NaCl 存在下でも ELISA での残存活性率が高かった。一般に高塩濃度条件では静電遮蔽が生じることから、静電相互作用を主とした相互作用である抗体は反応性が顕著に低下する[4, 5]。S3-1 と Z11 の CDR3 は、高塩濃度で残存活性率が著しく低下した L3-5 および H3-5 よりも、荷電アミノ酸の含有が少なかった。塩濃度を変化させても S3-1 および Z11 は抗原に対する反応性に明確な変化が生じないことから、抗原への結合に静電相互作用が強く関与しないことが示唆された。従って、S3-1 や Z11 は、CDR3 に荷電アミノ酸が少なく、静電相互作用を積極的に使用していないことから、静電遮蔽による抗原結合活性の低下が生じなかったと考えられる。一方で、本アッセイにおいて反応性が低下した L3-5 および H3-5 は抗原との相互作用において荷電アミノ酸が重要であることが示唆される。

高塩濃度に耐性のあるクローンが、S3 から取得できることが示された一方で、高塩濃度条件下のファージ濃縮プロセスの結果では、低温や予熱条件と比較して、抗原非特異的な濃縮が示された(図 2.3)。このことから、より効率よく高塩濃度耐性を有する VNAR を取得す

るためには、パニング時に適切な塩濃度を考慮することが求められる。

パニングにおける予熱の影響

パニングの予熱条件が VNAR の反応特性および熱安定性に及ぼす影響を評価した。予熱条件で取得された H3-5 の熱安定性(T_m 値)の向上に関しては、ファージディスプレイの予熱によって VNAR の熱安定性が改善した既報の研究結果と一致した[6]。また H3-5 の可逆性の低さは、既報論文の予熱により得られた scFv における不可逆的な凝集が増加する結果と一致した[16]。H3-5 のアミノ酸配列は Z11 よりも多くの芳香族アミノ酸を含んでいた(図 4.2)。これら芳香族アミノ酸はかさ高い側鎖と疎水性環を持つため、タンパク質の構造に剛性を与えることで、凝集に関与することが知られている[17]。CDR3 における豊富な芳香族アミノ酸が予熱時の可逆性の低下に関与することが示唆された。パニングの予熱条件(選択圧)が H3-5 の T_m 値の向上に反映される一方で、可逆性には必ずしも影響を与えないことが示唆された。

通常条件の ELISA で選別した VNAR が Z11 よりも反応性が向上した原因

出現頻度の低いクローンの反応性解析は、高機能な候補 VNAR を得ることを目的とした本方法の有用性を示すのに貢献する。各 VNAR と抗原の相互作用に寄与する要因を考察した。高塩濃度で L3-5 と H3-5 は、通常条件(塩濃度を含まない条件)と比較し、顕著に反応性が低下したことから、静電相互作用が抗原認識に大きく貢献していることを示しており、高塩濃度条件で静電遮蔽が生じていることが示唆された。言い換えれば、荷電アミノ酸の存在は L3-5 と H3-5 の高い反応性の要因の一つであると言える。加えて L3-5 および H3-5 は、Z11 と比較して芳香族アミノ酸の使用頻度が高かった。特に、H3-5 は Z11 と比較したエントロピー変化が、 -6.71 kcal/mol であり、疎水性アミノ酸が相互作用に大きな影響を与えていることが示された。これは、芳香族アミノ酸が相互作用と親和性に大きく寄与するという既報の論文の結果と強く関連している[18]。

Z11 と比較して反応性にほとんど差が見られなかった S3-1 では、91 位が Lys 残基であり、Z11 の同位置のアミノ酸が His 残基であることから、有利なエンタルピー増加が生じたと考えられる。一方で、S3-1 の 93 位は Ser 残基であり、Z11 の同位置のアミノ酸は疎水性アミノ酸の Ile であることからエントロピーの損失が生じたことが示唆された。これらのことからエンタルピー・エントロピー補償の影響で抗原反応性に有意な差がなかったと考えられる[19]。

エイラクブカの産生する VNAR のタイプとその物理化学的特性

エイラクブカはタイプ II に加え、従来、カリフォルニアネコザメでのみ確認されていたタイプ V を産生することが示された。選別されたタイプ V は H3-5 であり、通常条件の ELISA で最も高い反応性を有していた。低温または高尿素条件において高い反応性を維持した。熱

安定性の指標である T_m 値は選別されたクローンの中でも最も高かった。上記の特性を有する VNAR を取得する場合、タイプVを他のサメよりも多く産生するエイラクブカの活用が有用である可能性がある。

Non Canonical Cysteine を有さないタイプIVはエイラクブカからは取得されなかった。sdAb の社会実装に向けて「分子の加工のしやすさ」は大きなアドバンテージになるため、タイプIVの VNAR の研究を実施する場合、他のサメからのファージライブラリの作製が必要となる。

特殊条件における耐性と診断薬用原料抗体への応用可能性

診断や治療薬の開発には、様々な物理化学的特性を持つ候補抗体を多数準備することが不可欠である。本研究で得られた VNAR の特性は独自性が高いため、次世代の免疫測定プラットフォームに活用できる可能性を秘めている。例えば、一部の診断マーカーは、ヒト血清中で自己抗体が作られやすい。一部の自己抗体は、診断薬の原材抗体と同じ抗原部位を認識することで、原料抗体と診断マーカーとの相互作用を競合的に阻害する。そのため、一部の診断マーカーでは、測定に先立ち、サンプル中に存在する阻害物質を除去するため、前処理を行っていた[20]。

本研究で検証した ELISA 条件は阻害物質が標的抗原から解離し得る条件であることが既報の論文から示唆される。抗原抗体反応または低分子の相互作用を 25°C程度から 4°C程度まで低下させた場合、 k_{on} が 1/5–1/10 に低下した[10–12]。CLEIA 法における抗原抗体反応時間は数分と限定的であることから k_{on} の低下により阻害物質と抗原との複合体形成効率が 25°Cの時と比べ、4°Cにおいて著しく低下すると考えられる。次に、高塩濃度条件においても静電相互作用を主とする相互作用は静電遮蔽による影響を受け、数十–数百倍程度反応性が低下する可能性がある[4, 5, 21]。さらに、マウス IgG を 70°Cで熱処理した場合では、63%まで結合活性が低下し、80°Cで熱処理すると結合活性を失った[22]。このことから予熱条件においてもマウス抗体の結合活性の低下が示されている。最後に、高尿素条件におけるタンパク質への影響は、例えば 0.5 M の尿素濃度でタンパク質が変性作用を示したことが報告されている[13]。また尿素が抗原抗体反応を阻害する場合があることが報告されている[14]。

これらの既報の論文の情報から、従来の抗体では反応性が著しく低下し得る条件において、本研究で示した方法で取得した VNAR は抗原結合活性を維持するため、前処理操作なく阻害物質の影響を排除する新規免疫測定試薬の開発を推進すると期待される。

参考文献

1. O'Connell, M. A., Belanger, B. A., & Haaland, P. D. (1993). Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 20(2), 97-114.

2. Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., & Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS One*, *14*(6), e0213394.
3. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948.
4. Curtis, R. A., Prausnitz, J. M., & Blanch, H. W. (1998). Protein - protein and protein - salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes. *Biotechnology and bioengineering*, *57*(1), 11-21.
5. Valente, J. J., Verma, K. S., Manning, M. C., Wilson, W. W., & Henry, C. S. (2005). Second virial coefficient studies of cosolvent-induced protein self-interaction. *Biophysical Journal*, *89*(6), 4211-4218.
6. Pershad, K., & Kay, B. K. (2013). Generating thermal stable variants of protein domains through phage display. *Methods*, *60*(1), 38-45.
7. Kim, D. Y., To, R., Kandalaft, H., Ding, W., van Faassen, H., Luo, Y., ... & Tanha, J. (2014, January). Antibody light chain variable domains and their biophysically improved versions for human immunotherapy. In *MAbs* (Vol. 6, No. 1, pp. 219-235). Taylor & Francis.
8. Joshi, V., Shivach, T., Yadav, N., & Rathore, A. S. (2014). Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. *Analytical chemistry*, *86*(23), 11606-11613.
9. Zeidel, J. D., Mathai, J. C., Campbell, J. D., Ruiz, W. G., Apodaca, G. L., Riordan, J., & Zeidel, M. L. (2005). Selective permeability barrier to urea in shark rectal gland. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *289*(1), F83-F89.
10. Navratilova, I., Papalia, G. A., Rich, R. L., Bedinger, D., Brophy, S., Condon, B., ... & Myszk, D. G. (2007). Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Analytical Biochemistry*, *364*(1), 67-77.
11. Prévost, J., Richard, J., Gasser, R., Ding, S., Fage, C., Anand, S. P., ... & Finzi, A. (2021). Impact of temperature on the affinity of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein for host ACE2. *Journal of Biological Chemistry*, *297*(4).
12. Leonard, P., Hayes, C. J., & O'Kennedy, R. (2011). Rapid temperature-dependent antibody ranking using Biacore A100. *Analytical biochemistry*, *409*(2), 290-292.
13. Ferreira, L. A., Povarova, O. I., Stepanenko, O. V., Sulatskaya, A. I., Madeira, P. P., Kuznetsova, I. M., ... & Zaslavsky, B. Y. (2017). Effects of low urea concentrations on protein-water interactions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(1), 207-218.

14. Bata, J. E., Gyenes, L., & Schon, A. H. (1964). The effect of urea of antibody-antigen reactions. *Immunochemistry*, 1(4), 289-293.
15. Feige, M. J., Gräwert, M. A., Marcinowski, M., Hennig, J., Behnke, J., Ausländer, D., ... & Buchner, J. (2014). The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8155-8160.
16. Jung, S., Honegger, A., & Plüß-Eckthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *Journal of molecular biology*, 294(1), 163-180.
17. Bemporad, F., Taddei, N., Stefani, M., & Chiti, F. (2006). Assessing the role of aromatic residues in the amyloid aggregation of human muscle acylphosphatase. *Protein science*, 15(4), 862-870.
18. Fellouse, F. A., Wiesmann, C., & Sidhu, S. S. (2004). Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a dominant role for tyrosine in antigen recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12467-12472.
19. Ito, W., Iba, Y., & Kurosawa, Y. (1993). Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters. *Journal of Biological Chemistry*, 268(22), 16639-16647.
20. Tzang, B. S., Tsay, G. J., Lee, Y. J., Li, C., Sun, Y. S., & Hsu, T. C. (2007). The association of VP1 unique region protein in acute parvovirus B19 infection and anti-phospholipid antibody production. *Clinica chimica acta*, 378(1-2), 59-65.
21. Dejaegere, A., Choulier, L., Lafont, V., De Genst, E., & Altschuh, D. (2005). Variations in Antigen – Antibody Association Kinetics as a Function of pH and Salt Concentration: A QSAR and Molecular Modeling Study. *Biochemistry*, 44(44), 14409-14418.
22. Takeda, H., Ozawa, T., Zenke, H., Ohnuki, Y., Umeda, Y., Zhou, W., ... & Sawasaki, T. (2023). VNAR development through antigen immunization of Japanese topeshark (*Hemirhamphys japonica*). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.

第5章 先端技術研究の社会実装に向けた戦略構築

5.1. イノベーションアイデア

5.1.1. 免疫測定試薬に関わる技術の歴史

本節では、免疫検査分野の歴史をまとめることで、現在のトレンドを把握する。そして免疫検査分野における社会課題を示し、課題解決に重要な科学技術上のブレークスルー、およびイノベーションアイデアについて記載する。

始めに、免疫検査分野の歴史から記述する。免疫測定法は、1956年のYalowとBersonによって開発されたRIA(Radio immunoassay)法に端を発した[1]。当時は測定対象の濃度が薄く、精製単離できずに検出不可能だったが、放射性物質で標識したホルモンと未標識のホルモンを競合させることで、微量の対象物の測定を可能とし、科学技術上のブレークスルーとなった。それまで克服困難だった検体中の微量蛋白質測定が実現した一方で、新たな課題に直面した。それは、標識物質である放射性物質の半減期が長いこと、設備投資が膨大であることである。これらの理由から、RIA法の普及は進まず、特殊な研究施設での利用に限定されていた。

1971年には、SchuursとVan Weemenらが酵素と抗原抗体反応とを組み合わせる技術を開発した[2]。これはhCGを西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)という酵素で標識し、セルロース上に抗体を固定化して、抗原を反応させる方法であった。この方法はEnzyme Immuno Assay(EIA)法と呼ばれた。1974年には抗体を標識し、抗原を検出する論文が発表された。

EIAの開発時期と同じ1970年代にEngvallとPerlmannはセファロース担体に抗体を吸着させ、酵素で標識した抗原を検出する方法、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)法を開発した[3]。それまで、RIA法は一部の研究者のみに使用されていたが、安全で利便性の高いELISA法が開発されたことにより、免疫測定法が一気に普及することとなり、イノベーションが起こった。イノベーションが起こった理由としては3点考えられる。まず、ストリップからプラスチックに変更したことによる利便性の向上、二つ目に酵素標識法の汎用性・安全性の向上、三つ目に多様な測定対象に対して幅広く対応することのできる柔軟性の向上である。

1983年には、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA法(Chemiluminescent enzyme immunoassay))が報告された[4]。発光反応は、発光物質が基底状態から励起状態に遷移し、再び基底状態へ戻るときに発生する光を検出する。この化学発光反応には、酵素と基質が必要となり、発光反応前後で基質の構造が変化する。ELISAやEIAでは、比色基質を用い、例えば、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)が利用される。一方、発光基質には、例えば、ルミエールやp-ニトロフェニルリン酸(PNP)、3'(2'-spiroadamantane)4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane(AMPPD)(1988年、Bronsteinら)等が用いられる。表5.1は、免疫測定法で用いられる代表的な標識酵素と検出感度について記載した。

ELISA 法で用いられる HRP と TMB の感度を凌駕する感度を ALP と AMPPD の組み合わせで発揮することが分かる。

表 5.1 標識酵素の活性測定法と検出感度(出所：参考文献[5] p100、一部改変)

酵素	基質	検出	感度(mol/アッセイ)
HRP	TMB	比色	5.0×10^{-17}
HRP	ルミノール	化学発光	2.5×10^{-17}
ALP	AMPPD	化学発光	1.0×10^{-20}

次に抗体の取得技術の沿革を示す。1975 年に Köhler と Milstein によってハイブリドーマ法が開発された[6]。それまでの抗体の調製方法としては免疫動物の血清を採取し、抗体を精製し利用していた。しかし、複数の抗体株が混合すること(ポリクローナル抗体と呼ぶ)、抗体産生細胞の安定的な培養が不可能なことから、抗体の調製間差が大きく、免疫測定試薬の品質担保に向けた一つの大きな課題であった。ハイブリドーマ法は免疫動物の B 細胞とミエローマ細胞を融合させることにより、抗体遺伝子が細胞内に維持され、半永久的に抗体を産生することができる方法である。また限界希釈法を用いた単離が可能であるため、単一な抗体(モノクローナル抗体)としての利用が可能となった。このように、安定して抗体の調製が可能になったこと、ポリクローナル抗体からモノクローナル抗体が利用できるようになったことから、抗体取得におけるイノベーションが起こった。

しかしながら、ハイブリドーマ法にも課題があった。以下に主な 3 つの課題について記載する。課題の一つ目としてはまず B 細胞とミエローマ細胞の融合率の低さによる候補抗体の多様性の低下が挙げられる。マウスの場合、ハイブリドーマの融合率は 1–2% と言われており[7]、免疫動物が有する多様性が融合の段階で失われるリスクがある。次に、スクリーニングの煩雑性の高さ、およびこれに起因する候補抗体の多様性の低下が挙げられる。スクリーニングには上記のようにまず限界希釈法が必要となる。評価方法としては煩雑性の高くスループット性の低い ELISA での評価が一般的で、評価できる数は 10^3 程度と候補クローンの数としては限定的である。最後にミエローマ細胞が由来動物細胞特異的で、その利用が制限される点が挙げられる。例えばマウス抗体であれば、マウス抗体産生細胞専用のミエローマ細胞が必要になるということである。マウス抗体作製に必要なマウスミエローマ細胞(SP2/0)が開発され商業利用が進んだ。一方でマウス以外の動物種の免疫細胞に対するミエローマ細胞の開発は停滞した。例えばウサギ抗体に対するミエローマ細胞は 1995 年、Spieker-Polet らの開発したトランスジェニックウサギが形成した 240E-1 と呼ばれる細胞株が開発された[8]。Epitopics 社はウサギモノクローナル抗体作製に必要なミエローマ細胞に関する特許を出願、利用が制限されていた。現在も Abcam 社が持つ RabMAb ではこの細胞から作られたミエローマ細胞が用いられており、Abcam 社の同意なく、この技術あるい

は抗体を商業利用することができない(参考 URL①)。

1990 年にハイブリドーマ法で指摘されていた課題を解決する抗体作製・取得技術が、Winter らによって開発された[9-12]。ファージディスプレイ法と呼ばれるこの技術は、2018 年にノーベル化学賞を受賞した。この方法は、抗体の重鎖と軽鎖の可変領域をリンカーで架橋した scFv(single-chain Fv)または Fab(Antigen binding fragment)をファージの遺伝子に組み込むことで、ファージの表面上に抗体を提示させ、標的物質に強く結合するファージ粒子を濃縮、単離する方法である。ハイブリドーマ法と比べて、抗体取得期間が短縮される点、手技が簡便になる点、ミエローマが不要となる点、生物に毒性を示す物質に対する抗体を取得できる点、などが利点として挙げられる。ハイブリドーマ法と比較したデメリットは、大腸菌内におけるタンパク質の発現、および遺伝子増幅のバイアスが生じることと、重鎖と軽鎖のペアリングが免疫動物内での親和性成熟過程を反映していない点である。

このようにハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法ともにメリット・デメリットがあるため、取得する抗体の仕様等によって取得方法を選択する必要がある。

加工技術にする歴史は、1972 年の Porter らによる抗体構造の解明に始まる。彼らは、Y 字構造の抗体をペプシンで消化することで、抗原に結合する分子(Fab 領域)とエフェクター部分(Fc 領域)に分かれることを説明した[13]。化学発光法の原材料である Fab 領域は、ペプシン消化後の Fab が 2 つ連結した F(ab)'₂ の重鎖間のジスルフィド結合を切断することで調製している。Porter の研究で免疫測定試薬に関連する点は、偽陽性の原因となりうる Fc 領域を酵素によって除去できることを科学的に証明した点であった。

サンドイッチ法の捕捉用抗体側で使用される、ストレプトアビジンの結晶構造解析の研究結果は 1989 年に Weber らによって発表された[14]。ストレプトアビジンとビオチンの結合は、非共有結合の中で最も強い反応であることが示され、現在では磁性粒子上の捕捉抗体の固定に不可欠な分子となっている。磁性粒子への固相により洗浄効率の改善および陰性検体におけるノイズ低減が実現した。

5.1.2. 歴史から考察される免疫検査分野のトレンド

化学発光法の開発により、ELISA 法での課題であった、感度、検体処理能力(自動化)、少量での測定など、顧客である臨床検査技師の利便性が大きく向上した。このように 1980 年代から ELISA、および EIA 法が形成してきた免疫検査分野の市場は、感度とスループット性の劇的な改善により、ハイエンドユーザーにおいて化学発光法への置き換わりが進んでいる[15]。これらのことから、昨今の免疫検査分野におけるトレンドは、「臨床検査技師の業務効率と診断結果の正確性の向上に寄与する免疫測定試薬のスペック」であると判断される。

高機能な抗体の取得技術は、抗体の性能を向上させることができるため、科学技術上のブレークスルーとして注目されている。高機能な抗体の取得方法には、大きく分けて二つの方

法がある。一つは元の抗体を起点として遺伝子を改変し高機能化する方法、もう一つはマウス以外の宿主動物が発現する高機能な抗体を取得する方法である。前者は後天的に抗体の性質を変える技術、後者は先天的に高機能な抗体を選び出す技術である。本論文の技術戦略で取り扱う技術は後者の技術であり、サメから取得される高機能な抗体の取得方法について記述している。

5.1.3. 社会課題とイノベーションアイデアの創出

近年、医療領域での技術革新により、新たな治療が実用化している。免疫測定試薬は、人から採取した生体サンプルに含まれる測定対象物を、臨床検査技師が専用の診断キットを用いて高感度に検出することができ、タイムリーに適切な治療方針の決定が可能となるため、医療現場における重要性が高まっている。臨床検査技師の役割は、医師からのオーダーに従い測定を実施し、迅速かつ正確な臨床情報を医師に報告することである。しかしながら、検体の種類によっては、測定の迅速性と正確性を両立することが困難となる。例えば生体成分には様々なタンパク質が含まれ、一部は測定対象物質と相互作用するため、原料抗体と抗原との反応を阻害する場合がある。この阻害反応は、ピットフォールと呼ばれ、偽陰性または偽陽性に繋がるため、正確な診断結果を取得する上で大きな課題である(表 5.2)。この課題の解決に向けて、検体に変性剤を加え阻害物質を不活化させた後、測定する技術が開発された。一方で、前処理に工程が追加されたことで測定の迅速性は低下した。本論文の先端技術研究では、検体中の阻害物質が標的分子から解離し得る条件において、高い抗原反応性を維持する VNAR の取得方法を提案した。「ピットフォール」の解決には、高親和性と高安定性を兼ね備えた結合分子が必要である。そこで、先端技術研究を免疫測定試薬の原材料の取得に活用することで、臨床検査技師の業務における「正確性」と「迅速性」を両立する価値の提供をイノベーションアイデアとした。

表 5.2 免疫測定における代表的なピットフォール(出所：参考文献[16]を一部改変)

	阻害物質	ピットフォールの影響
特異的な反応 阻害物質	感染症抗原に対する宿主由来の抗体	様々な細菌、ウイルスなどの構成タンパク質に対する宿主由来の抗体が、正確な抗原の測定に影響を与える
	内分泌マーカー、腫瘍マーカーに対する自己抗体	甲状腺マーカーやインスリン、CEA、CA125、CA19-9などに対する自己抗体が正確な抗原測定に影響を与える
	各種レセプターや結合タンパク質	ステロイド系の抗原や免疫抑制剤に対する結合タンパク質が正確な抗原検査に影響を与える
	免疫測定試薬の内容物に対する結合タンパク質	免疫測定試薬中のマウス抗体に対する抗マウス抗体により、特異性が低下する
非特異的な反応 阻害物質	疎水性・イオン性相互作用物質	RF、M タンパク質などの影響により特異性の低下が生じる

5.2. 技術戦略

5.2.1. 高親和性と高安定性を兼ね備えたサメ抗体の取得方法

筆者は、愛媛大学と共に、マウス抗体が抗原から解離する存在下でも、結合を維持できるサメ抗体を選別する技術を開発した。サメ抗体は、血清中に高濃度の尿素を含むため、元々の分子としての安定性が高いと言われている。しかしながら、サメ抗体取得の従来法であるファージディスプレイ法で抗体を取得しても、ピットフォールを排除する反応条件下では抗原結合活性を失う、または抗原結合活性が低いため、免疫測定試薬の原料としては利用することが困難だった。今回開発したサメ選別技術は、ファージディスプレイ法の結合ステップにおける条件(選択圧)と NGS 解析を活用することで、所望の機能を有するサメ抗体をスクリーニングすることを可能とした。

シスメックス社の免疫測定試薬の原料抗体を、阻害物質が解離する反応条件でも、抗原に結合できるサメ抗体に切り替えることで、前処理なしで測定阻害物質の影響を排除する高感度抗原検出系の構築が可能となる。免疫検査分野の市場にはピットフォールの影響を排除する前処理方法が存在するが、通常の方法に加え前処理時間が加算されるため測定時間が延長する。図 5.1 には、横軸に測定時間、縦軸に阻害物質の影響の受けやすさを示した 2×2 を示し、各社化学発光法の性能を位置づけた。筆者が目指した次世代免疫測定試薬のスペックは、測定時間の延長なしで、正確な測定を行うものである。シスメックス社の免疫測定試薬は全検査項目において測定時間 17 分であり、「迅速測定」において免疫検査分野で最高レベルのスペックを有する。もし、前処理によるピットフォールの影響を排除する方法(シスメックス新法 B)を開発したとしても、前処理時間が加算され 23.5 分(17 分+6.5 分)となり、全検査項目 17 分というブランドイメージが維持できないため、顕著な顧客価値の

提供と言い難い。そこで、本論文においては、前処理なしでピットフォールの影響を排除することで測定時間を 17 分の免疫測定試薬の開発を目指す(シスメックス新法 A)。迅速性と正確性を両立した測定方法は現在のところ、免疫検査分野の市場には存在せず、競争優位性が高いポジショニングである。

本免疫測定試薬はピットフォールを排除可能な免疫検査に要する時間を、現行の 26.5 分から 17 分に短縮し、顧客である臨床検査技師が求める「迅速で正確な検体検査」を実現する。

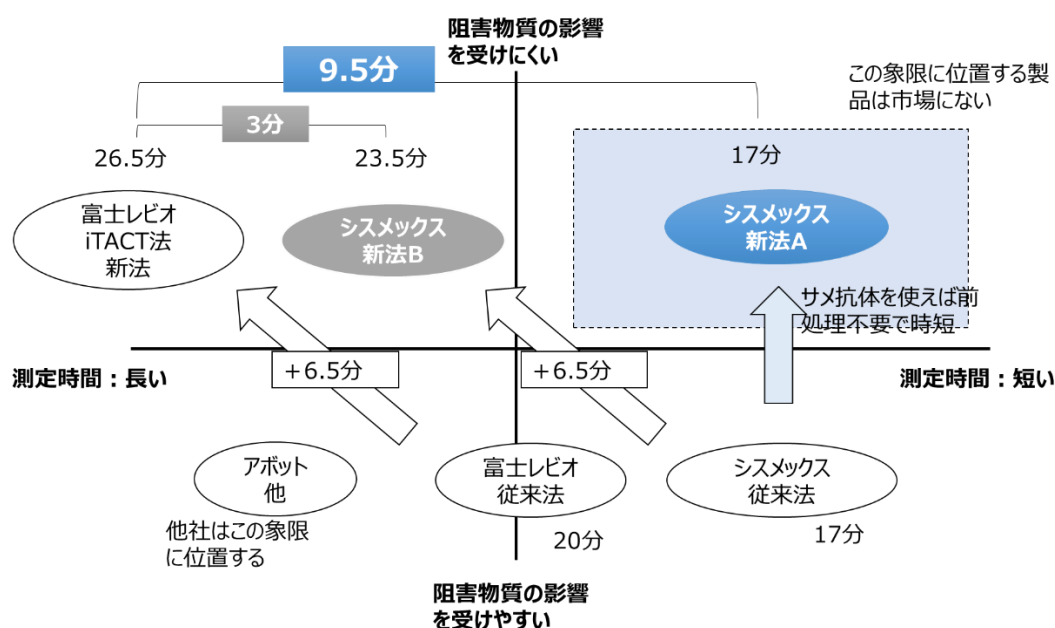


図 5.1 各社の免疫測定試薬のスペック(出所：筆者作成)

5.2.2. 技術戦略まとめ

筆者は、免疫測定試薬の正確性を低減するピットフォールの解決に向けた技術戦略の構築を目指した。必要な技術は、標的分子に結合する阻害物質が解離する条件でも結合を維持するユニークな特性をもった抗体の取得方法であった。先端技術研究で見出した VNAR の取得技術は、図 5.2 に示す通り、社会実装されているマウス抗体と同等の反応性を有し、且つ、阻害物質が解離する条件において結合を維持する VNAR の創出を実現する可能性がある。この象限に位置する機能を有する原料抗体は現状存在しないため、他社と比較して競争優位性が高い。

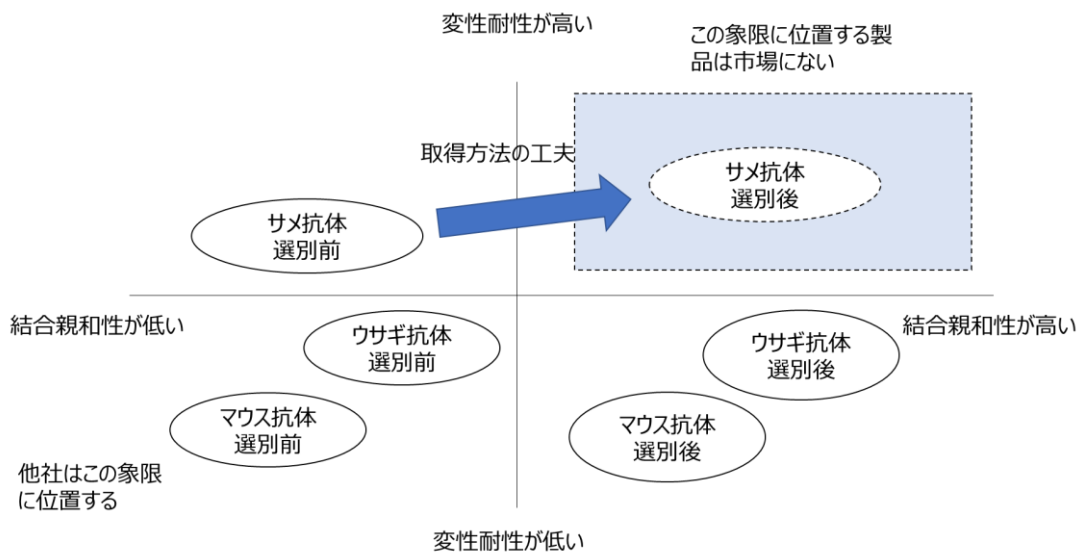


図 5.2 サメ抗体の機能に関する 2 × 2 (出所：筆者作成)

5.3. 知財戦略

免疫検査分野における競争は近年ますます激化している。また OTC 検査薬などの代替品の脅威も増している。免疫検査分野において安定的な収益、および研究開発を推進するには、知財戦略の構築が必要不可欠である。第 5 章では、抗体関連特許の一般概論、サメ抗体の出願状況および免疫検査分野の製品の特許の傾向についてまとめた。その後、本事業の知財戦略を構築した。

5.3.1. 抗体に関連する特許

抗体の特許は、抗原の配列が既知か未知か、抗体の配列が既知か、未知かによって分類される(図 5.3)。

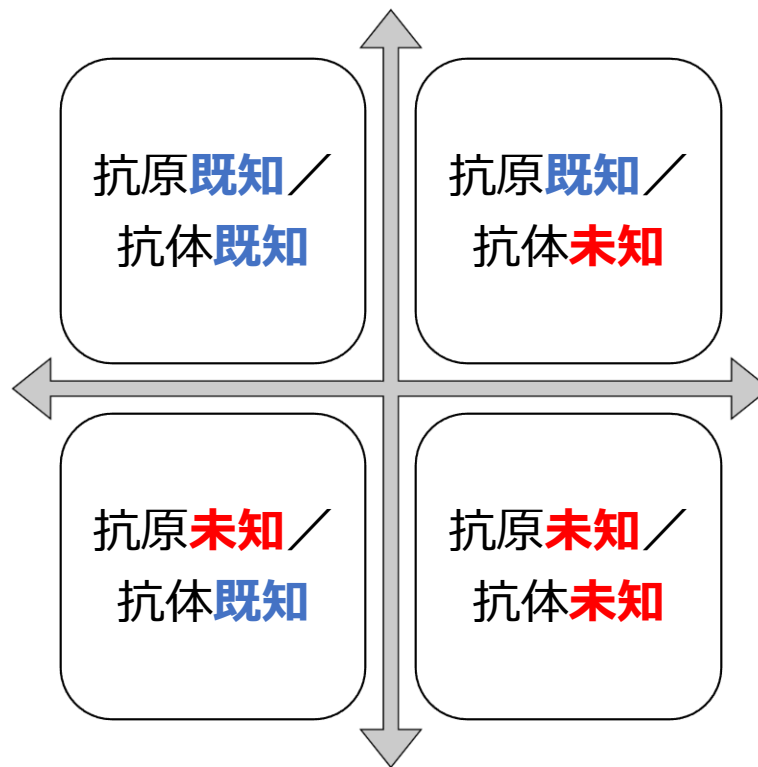


図 5.3 抗体特許の分類(出所：筆者作成)

抗原・抗体ともに未知の場合は新規性および進歩性があり、特許を取得できる。逆に抗原・抗体ともに既知の場合は、新規性がないため、物の特許として取得することは困難である。ただし、用途が新規である場合は、新規性および進歩性が認められる可能性がある。抗原が既知で、抗体が未知である場合は、新規性はあるが、進歩性は容易には認められない。本論文においてはこの象限に分類される事例が多い。この場合、抗体の取得困難性、または予期しない顕著な効果(例えば顕著なピットフォールの低減効果)がある場合に進歩性が認められる。抗体が既知で抗原が未知の場合は、新規性は未知の抗原に対して認められ得る。進歩性に関しては、従来法と比較して顕著な効果を示す必要がある。

日本の抗体自体の特許出願(物の出願)においては、CDR の特定が必要とされる。すなわち、マウス抗体であれば、重鎖 3 か所、軽鎖 3 か所の合計 6 か所の CDR 配列の開示が必須となる。また、日本においてはフレームワーク領域(FR)も抗体骨格を支える重要な配列・構造であるという考えから[17]、FRの開示が求められる場合がある。

サメ抗体の年間論文数、ブレイクスルー、および特許／買収に関する変遷を図 5.4 にまとめた。サメ抗体(IgNAR)は 1995 年に Greenberg らによって発見された[18]。2003 年に、Nuttall らによって、世界で初めて IgNAR の可変領域が単離され、VNAR と呼ばれるようになった。Spotted Wobbegong(*Orectolobus maculatus*)と呼ばれる 150–180 cm のサメに

免疫し、ファージディスプレイ法によりサメ抗体の単離に成功した。サメは、体の大きさや歯の鋭さなどの人への危険性に加え、飼育方法の難しさがあり、サメ抗体を扱う研究者は少数であった。2003 年から Aberdeen 大学発のベンチャー企業である Elasmogen 社がサメ抗体製造における基本特許の実施権を保有することとなった。2010 年代からは治療薬用途への適用に関する論文が増加した。また、治療薬への適用に際してサメ抗体のヒト化技術が Kovalenko らによって研究された。2016 年にサメ抗体の論文数が増加したが、これは 2013 年のラクダ抗体の基本特許(Hamers 特許)の失効に伴う、シングルドメイン抗体への注目度向上が起因したものと考えられる。

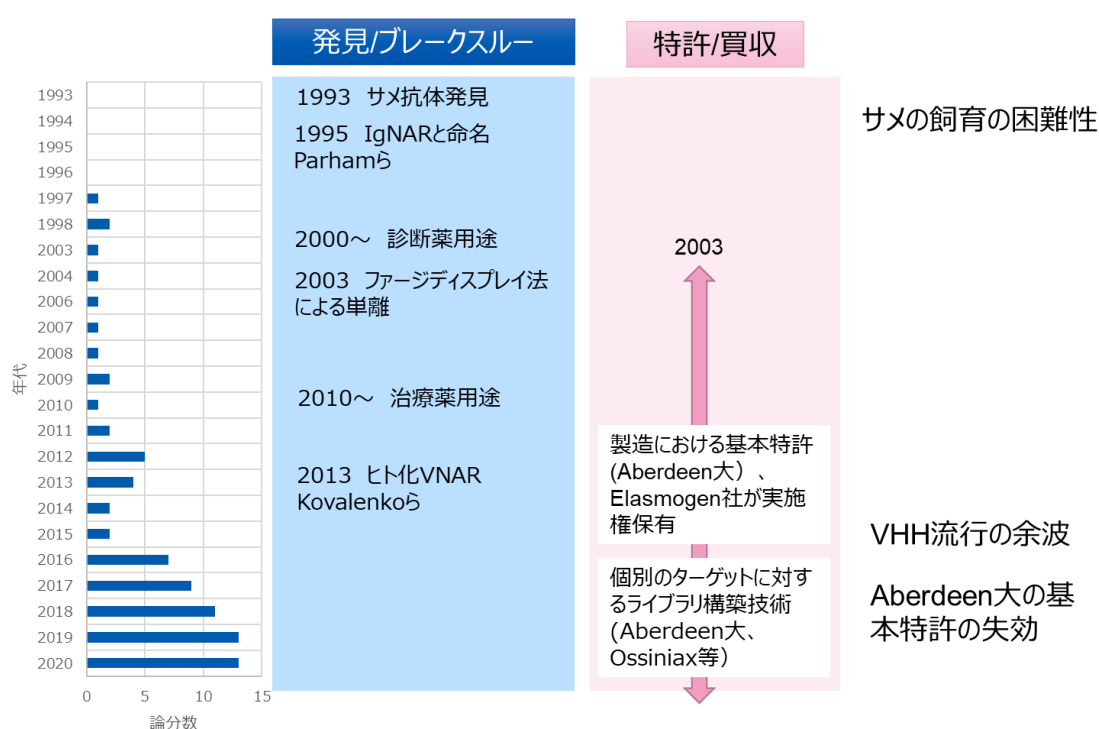


図 5.4 サメ抗体に関わる歴史(出所：筆者作成)

Elasmogen 社以外にも、サメ抗体に関する特許出願を行っている企業がある。サメ抗体に関する特許を「抗体の単離」、「製造」および「用途」の3つに分類した。まず、サメ抗体の単離に関しては図 5.5 に示したようにいくつかの研究機関から出願されている。Elasmogen 社の特許は 2003 年に提出されたサメ抗体遺伝子ライブラリ作製に関する特許は失効していた。一方で、2013 年に提出されたサメ抗体合成ライブラリ作製技術に関しては特許が取得されている。オーストラリアの Adalta 社はヒト化したサメ抗体ライブラリの作製技術を保有しており、そのライブラリから単離された分子が治療薬パイプラインとして臨床試験が行われている。



Aberdeen大学 (Elasmogen)

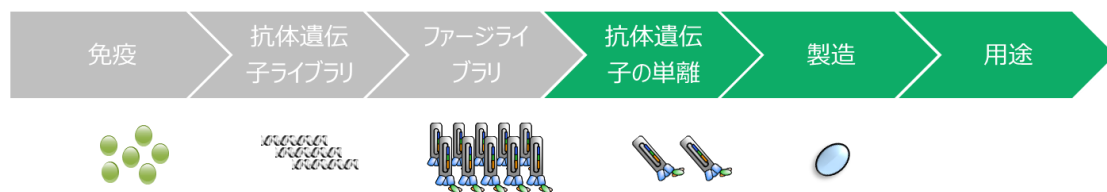
- 遺伝子ライブラリ作製技術
WO 03/014161 ANTIGEN BINDING DOMAINS FROM FISH⇒
失効
WO/2005/118629 BINDING MOIETIES BASED ON SHARK
IgNAR DOMAINS
- 合成ライブラリ作製技術
WO/2013/167883 SINGLE DOMAIN BINDING MOLECULE

Adalta

- ヒト化VNARライブラリ作製技術

図 5.5 免疫からサメ抗体単離までの工程における特許(出所：知財ポータルサイト IP Force 特許ランキング –出願人詳細情報– をもとに筆者作成)

図 5.6 には、製造および抗体原材料の免疫測定試薬への適用について示す。まず、製造の特許は愛媛大学、東京大学が共同出願しており、加圧条件下にサメ抗体を晒すことでリフォールディングを促進することで製造量を増加させる。製造に関しては、愛媛大からの特許のみ該当した。一方で用途特許については、おもに治療薬に対する特許が取得されており、Aberdeen 大が $\text{TNF}\alpha$ 、ICOSL(Inducible T-cell co-stimulator)をターゲット抗原にしたサメ抗体と、サメ抗体に薬剤を修飾した ADC(Antibody drug conjugate)について特許出願している。その他、Adalta 社は CXCR4 について、Ossianix 社は TfR、CD98HC についてそれぞれ VNAR を取得し特許を取得している。



Aberdeen大学 (Elasmogen)

- 抗Tumour Necrosis Factor alpha (TNFα)
- 抗human Induced Co-Stimulatory Ligand (ICOSL)
- 抗体薬物複合体 (Antibody Drug Conjugate (ADC))

Adalta

- 抗CXCR4

Ossianix, inc.

- 抗Transferrin receptor (TfR)
- 抗CD98HC

愛媛大学

特願2019-49400 V N A Rのリフォールディング方法およびV N A Rの製造方法

図 5.6 製造方法、および特定の抗原に対する治療薬開発(出所：知財ポータルサイト IP Force 特許ランキング –出願人詳細情報– をもとに筆者作成)

免疫測定試薬の原材抗体は必ずしもその配列の開示は必要とされていない。例えば、「診断マーカーXの測定方法、およびキット」であれば、マーカーXのエピトープ領域(抗体の結合領域)の配列を限定することで新規性を主張できるため、抗体配列はこのエピトープ領域を認識する抗体であれば制限はなく、広い請求項を取得することができる。それに加え、ピットフォールを従来よりも短時間に低減することができることを進歩性として主張することで、特許の取得可能となる。

5.3.2. 免疫測定試薬の開発、および製造プロセスと参入障壁の関係

技術志向型のビジネスの場合、他者が容易に実施できないように、参入障壁を高める施策が極めて重要である。知財戦略の基本方針として、先端技術研究をノウハウとして秘匿することで、他者が容易に模倣できないように技術的障壁を高めるか、特許として権利化することで、ビジネス領域を確保するかを判断する必要がある。サメ抗体の新規取得方法をノウハウとして秘匿する場合、免疫検査分野において、新規企業および既存の競合他社と比較して、製品の製造プロセスの観点でどのような場面で優位性を確立し、これらの企業の参入を阻止できるだろうか。

免疫測定試薬の研究開発を3工程、販売後を1工程とし、それぞれの工程と参入障壁に関連する情報を述べる。研究開発は1)原料抗体の開発、およびコンセプト検証、2)量産化

に向けた製造工程の設計、3)薬事申請および特許出願であり、販売後は 4)製品の安定的な製造である。

1)の工程は、特定の反応条件で機能する抗体の取得が重要であり、本論文で記載していないサメ抗体取得に関連する種々の知識とノウハウを必要とする。取得する抗体やターゲット抗原によって最適な抗体取得方法が異なるため、他者は公開論文の内容のみでは模倣することが極めて困難である。

2)は高品質な免疫測定試薬を安定的に製造するための工程を検討する。同じ原材料を使用しても、精製および製造プロセスが変化することで、免疫測定試薬としての品質が大きく異なる。よって本工程において、最低 3 ロット分の量産試作した免疫測定試薬を評価することで、プロセスバリデーションを行うことが慣例となっており、参入するには膨大な設備費用を要する。もし品質が安定しない場合は、原因を究明し、次工程に進む前に解決することが求められる。

3)薬事申請および特許出願についても免疫測定試薬に関連する独自のノウハウ、知見が存在するため、他者は容易に参入することができない。社内に十分な人的リソースがない場合はアウトソーシングする場合がある。

4)免疫測定試薬の販売には、QMS(Quality Management System)省令に適合した施設での製造が求められる。取り扱うタンパク質の技術的進歩から、製品を一定の水準で安定的に作製する必要性が高まっている。高機能なタンパク質原材料が製品に適用され、機能が向上した一方で、高い機能を一定期間維持することは、様々な技術や設備を必要とする。QMS 省令は医療機器の品質マネジメントに特化した ISO13485 および、薬機法に基づいて作成されており、医療機器の製造管理、品質管理の審査の基準となる省令である。QMS 体制の構築は商品開発・製造・販売に必須である一方で、その構築には多大な労力と時間、費用を要する。QMS に適合したシステムを持つことは他者との差別化となる。

5.3.3. 免疫測定試薬におけるリバースエンジニアリングの可能性

製品から原料抗体の配列や特性を解析できるか否かは、模倣困難性に関連するため重要である。リバースエンジニアリングとは他社の製品を詳しく解析し、その原理や製品構成に必要な技術を抽出することで、その技術を他の製品に適用することである。免疫測定試薬に含まれる抗体配列を解析できるか否かについて以下に示す。

まず抗体のアミノ酸配列を解析するには、例えば、製品に含まれる抗体成分のみを分離・精製し、アミノ酸シーケンサーで配列を決定する必要がある。アミノ酸シーケンサーの分析においては、1)高度に単離精製されていること、2)pmol–nmol レベルのタンパク質資料を準備することが求められる。

免疫測定試薬には、偽陽性や偽陰性を低減するために、牛血清アルブミン(BSA)や乳タンパク質のカゼインなどのブロッキング用タンパク質が 10 mg/mL 程度含まれる。一方で捕捉用抗体の濃度は、それらのタンパク質の 1/10,000 程度の量しか含有していない。今回使

用するサメ抗体は一般的な抗体の精製で用いられる Protein A や Protein G、Protein L 等には全く反応性を示さない。

免疫測定試薬中に含まれる原料抗体がごく僅かしか存在しない一方で他のタンパク質等の成分は過剰量含まれること、精製方法が不明であることを考慮すると、アミノ酸シーケンサーでの解析、およびリバースエンジニアリングは困難であると判断される。

他者が、VNAR を製品に適用した場合、上記の理由から、原料抗体の配列の分析を行うことは極めて困難である。反対に、他者が免疫測定試薬の原料抗体のアミノ酸配列を解析することは容易ではないと言える。

一方で、Buffer に含まれる pH や塩濃度、還元剤等の情報は、pH メーターや ICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析法)、酸化還元滴定等で比較的容易に分析が可能である。

5.3.4. 特許化と秘匿化の判断

特許化と秘匿化の判断はその内容により異なる戦略が必要である。サメ抗体取得技術に関しては表 5.3 に示す通り、3 通りの出願が考えられる。まずは取得された抗体自体を特許化するもので、物の特許(または物質特許)と呼ばれる。物の特許の場合は、基本的には抗体のアミノ酸配列を新規性として主張する。治療用抗体の場合は薬事申請上、抗体のアミノ酸配列を公開する必要があるが、免疫測定試薬においては不要である。また、免疫測定試薬におけるリバースエンジニアリングの困難性の高さから、他者の侵害の発見は困難である。そして物の特許は、配列限定の特許であるため、1 アミノ酸でも異なる配列であれば、他者は特許侵害を容易に回避することができる。従って、先端技術研究で取得したサメ抗体を物の特許出願する場合、デメリットが大きいと判断されるため、秘匿することとした。

次に方法の特許が考えられる。方法の特許は、例えば VNAR のスクリーニング方法に関する特許である。方法の特許の場合は、取得される抗体配列の公開は不要である。製造プロセスと参入障壁の項で述べた通り、他者の製造プロセスの詳細を知ることが困難であり、他者の特許侵害の発見は容易ではない。またファージディスプレイ法や NGS 解析は細かなノウハウが必要であり、他者が既報の情報から容易に模倣することはできない。このことから、方法の特許は一般に権利化せずに、ノウハウとして秘匿することが重要とされている。高機能な VNAR の取得プロセスには、サメの飼育・免疫技術、VNAR 提示ファージライブラリの構築技術、VNAR 選別技術の 3 つの技術が必要である。愛媛大学では、エイラクブカの飼育・免疫技術、ファージライブラリ構築技術に関するノウハウを単独で有している。本研究で確立した特殊条件で強い抗原反応性を有する VNAR を取得するノウハウは愛媛大学とシスメックス社とで共有している。他者がシスメックス社の同意なく、本研究で確立した方法で VNAR を取得することは困難と言える。従って、本研究で確立した VNAR 選別方法は特許出願せずに、ノウハウとして秘匿することを基本戦略とした。

最後に、用途特許としての出願が考えられる。用途特許とは、既存物質に関して新しい用途を見出した場合に出願する特許である。例えば、取得したサメ抗体について、ピットフ

オールを排除する条件で CEA を検出する用途を見出した場合である。用途特許の場合は、抗体配列の公開は不要である。一方で、測定条件等を請求項に記載する必要がある。用途特許では、他者の特許侵害かを検知できるかが重要であるが、pH や塩濃度、還元剤等の測定条件に関する情報は比較的得やすい。従って、免疫測定試薬の原料としてサメ抗体を使用する場合は、そのキットを用途特許として出願することが、知財戦略の方針となる。

表 5.3 本研究で関係する特許(出所：筆者作成)

	物の特許	方法の特許	用途特許
例	高安定性抗 CEA 抗体	抗 CEA VNAR の選別方法	CEA 免疫測定試薬またはキット
配列の公開	基本的には必要 中には非配列限定型の特許もある*	不要	不要
他者の特許侵害の 発見困難性	低い	低い	比較的高い

*エピトープの限定等、先行技術への差別化が重要

5.3.5. 知財戦略まとめ

先端技術研究の内容は、サメ抗体の取得方法であるため方法の特許に該当する。免疫測定試薬のタンパク質原材料はリバースエンジニアリングが難しく、且つその取得方法を判断することは極めて困難である。このことから、サメ抗体の取得方法は、ノウハウとして秘匿することが知財戦略としては重要である。一方、取得された抗体で作製した免疫測定試薬(キット)については用途特許として権利化することが可能であり、各検査項目に限定した特許網の構築が基本的な戦略となる。

5.4. 事業戦略

5.4.1. 外部環境分析

戦略策定にあたり、まず本論文で取り扱う業界を定義する。本論文では、国内の IVD の免疫検査分野について分析を行う。IVD には、図 5.7 に示す通り、血球計数分野(ヘマトロジー分野)や免疫検査分野、血液凝固分野などで構成されている。本論文においては特に免疫検査分野について分析した。免疫検査分野では、測定方法により分類することができ、シスメックス社が商品を有する化学発光法について特に詳しく分析した。

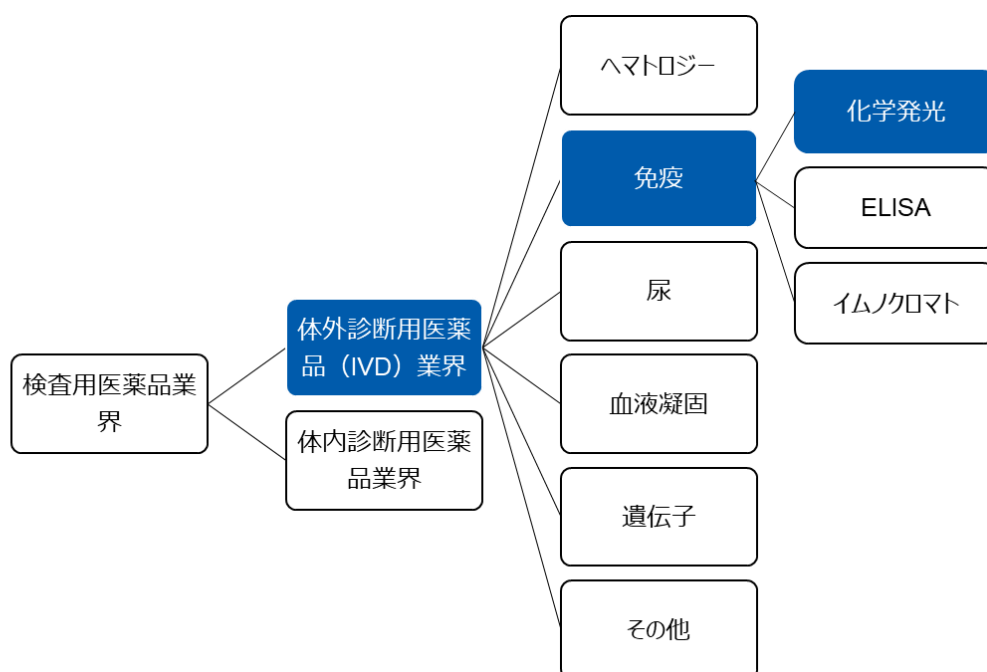


図 5.7 IVD 業界と免疫検査分野の定義(出所：筆者作成)

また本論文では、CLEIA(Chemiluminescent enzyme immunoassay)、CLIA(Chemiluminescent immunoassay)、ECLIA(Electro chemiluminescent immunoassay)をすべて化学発光法として定義する。各社、表 5.4 に示すように原理の異なる化学発光法を使用している。

表 5.4 化学発光法の種類(出所：筆者作成)

会社	シスメックス社	ロシュ社	アボット社	富士レビオ社
化学発光法	CLEIA	ECLIA	CLIA	CLEIA

表 5.5 には国内の免疫検査分野の企業情報を示した。2019 年度の国内の免疫検査分野の市場規模は、219,822 百万円、前年度比 101.5%で、そのうち化学発光法は 99,732 百万円で、前年度比 103.0%であった[15]。一方、新型コロナウイルス感染症拡大後の 2021 年度では、免疫測定市場が 249,386 百万円で、前年度比 119.6%、化学発光法は、125,107 百万円、前年度比 115.4%と劇的な変化が見られた。2021 年度、免疫検査分野において化学発光法およびイムノクロマトグラフィー法を原理とする製品が市販され、検査数および市場拡大に大きく影響した。新型コロナウイルスのアウトブレイクにより、一時的に市場規模が拡大しているが、国内の免疫検査分野の年成長率は数%と予測されており[15]、成熟した市場と言える。

表 5.5 国内の免疫検査分野の企業情報(出所：参考文献[19]をもとに筆者作成)

国内 順位	企業名	2020 年度売上高 免疫市場(百万 円)	前年度比	親会社(国)	商品
1	アボットジャパン	30,000	94%	Abbott Laboratories(米)	機器、試薬、POCT
2	ロシュ D	24,000	112%	Roch(スイス)	機器、試薬、POCT
3	富士レビオ	20,450	152%	H.U.グループホールデ ィングス(日)	機器、試薬、 POCT、原料
4	オーソ CD	16,000	101%	Ortho Clinical Diagnostics(米)	機器、試薬、POCT
5	栄研化学	11,420	108%	—	機器、試薬、POCT
6	サーモフィッシャー S	10,570	100%	Thermo Fisher Scientific(米)	試薬
7	シーメンス HCD	9,700	96%	Siemens Healthcare(独)	機器、試薬
8	富士フイルム和光純 薬	8,240	97%	富士フイルムホールディ ィングス(日)	機器、試薬、POCT
9	積水メディカル	8,240	99%	積水化学工業(日)	試薬、POCT
10	デンカ	6,600	98%	—	試薬、POCT
11	東ソー	5,800	100%	—	機器、試薬
12	シスメックス	5,042	104%	—	機器、試薬
13	大塚製薬	5,000	86%	大塚ホールディングス (日)	試薬、POCT
14	LSI メディエンス	4,100	91%	PHC ホールディングス (日)	受託検査
15	ミナリスメディカル	3,350	72%	昭和電工マテリアルズ (日)	機器、試薬、POCT

PEST 分析

マクロ環境のトレンドを把握するため、免疫検査分野を対象に PEST 分析を行った(表 5.6)。政治については 3 点記載した。まず、免疫検査分野は、診療報酬改正の影響を強く受ける。社会保障費増大への対応の一つとして、免疫検査分野においてはマイナス改正が続いている。次に、免疫測定試薬が薬事承認を必要とすることから、国内では、厚生労働省や PMDA、医師会が決定した指針やガイドラインに従う。3 点目に、国外の場合は、各国の規制当局の定めた法律に従い、薬事承認や特許出願、製造販売承認などを取得しなければならない。

次に経済について 4 点記載した。まず、免疫検査分野のメーカーは商品を輸出している場合が多いため、貿易による為替変動の影響を強く受ける。2 点目に、医療に対する需要が非常に高いことから、景気の変化による影響を大きく受けることなく、免疫検査分野のメーカーは営業活動を展開することができる。3 点目に新型コロナウイルス感染症のような新興感染症の流行等により、需要が大きく変化する。4 点目に原材料費および輸送費の変化が免疫測定試薬の製造原価に影響を与える。特に、原材料を外注している場合はその影響を受けやすい。

社会については以下の 4 点を挙げた。まず、インターネットの普及により、健康増進に関する情報が入手しやすくなった。その影響で健康意識が向上し、より健康に、豊かに過ごすための検査需要が高まっている。2 点目に先進国においては患者一人ひとりに適切な医療を提供する個別化医療や、早期に疾患に対してアプローチを施す予防先制医療が注目を集めている。これらの実現には高度な診断技術が必要であり、技術革新が求められている。3 点目に、新興国においては、生活水準の向上による検査需要の高まり、市場規模の拡大が見られる。また適切な医療を求め、先進国への医療ツーリズムが流行している。最後に医療従事者の不足が挙げられる。ここで医療従事者とは、医療関係の業務に従事する人のことを指し、医師、臨床検査技師だけでなく、看護師や救急救命士等を含む。患者数に対して医療従事者数が不足していることから限られた時間の中で業務を遂行する必要がある。

次に技術について 2 点示す。AI、機械学習、IoT、ロボティクス、通信等の分野で技術革新が起こっているため、これらの技術の医療(治療、検査)技術への応用が検討されている。また、遺伝子関連技術(ゲノム解析技術、ゲノム編集技術等)の発展により、診断ガイドラインの変更が行われることから、免疫検査分野に大きな影響を与える。

表 5.6 免疫検査分野における PEST 分析(出所：筆者作成)

Politics：政治	● 診療報酬改正の影響を強く受ける ● 国内の場合、厚生労働省、PMDA および業界内規制(医師会等)の影響を強く受ける ● 国外の場合、各種法規制(FDA、CFDA 等)、貿易政策の影響を強く受ける
Economy：経済	● 海外売上比率が高い企業は、為替変動の影響を受けやすい ● 医療需要は景気の影響を受けにくい ● 新興感染症のアウトブレイクによる規制の変化により突発的な需要の変化が生じやすい ● 原料調達不安と原材料費・輸送費の高騰
Society：社会	● 健康意識の高まりによる検査需要増加 ● 先進国における個別化医療、予防先制医療実現への取り組み ● 新興国における市場拡大、先進国への医療ツーリズム ● 医療従事者の不足と病院の業務効率化の要求
Technology：技術	● AI、機械学習、IoT、ロボティクス、通信等の分野における技術革新と医療への応用 ● ゲノム解析技術、ゲノム編集技術での目覚ましい発展による診断ガイドラインの変更

免疫検査分野の産業構造

免疫検査分野の産業構造は図 5.8 のようになっている。免疫測定試薬は使用用途によって、LDT/RUO、RDx/GDx、および CDx の 3 つに大分でき、それぞれ商品開発のフローが異なる。

一つ目の LDT(Laboratory Developed Test、自家調製検査)、RUO(Research Use Only)は、薬事未承認の研究用検査試薬であり、一般用医薬品(OTC(Over the counter))に区分される。保険収載されていないため、検査価格(販売)価格は、各メーカー、販売店が自由に決定する。薬事申請不要なことから、開発期間が短く、患者または研究者は一般検査薬として薬局等から購入することができる。ただし、薬事未承認品であるため、病態を反映した結果とは必ずしも一致しない。これらの商品の顧客は、患者や研究者等、一般消費者である。

二つ目の RDx(Recommended/Referred Diagnostics)/GDx(General Diagnostics)は薬事承認を受けており、シスメックス社で主に取り扱う商品区分である。RDx は医薬品の効果/副作用の投与前の予測や投与後のモニタリングに参照情報を与える免疫測定試薬である。GDx は医薬品の投与判断に影響は与えないが、疾患スクリーニングや診断などの段階で価値提供する免疫測定試薬である。RDx/GDx の主な顧客は、大規模検査センターや大病院など、ハイエンドユーザーである。

三つ目の CDx(Companion Diagnostics)は、医薬品の効果／副作用の投与前の予測や投与後のモニタリングに必須の免疫測定試薬である。免疫測定試薬、機器の販売先は RDx/GDx と同様である。一方で、特定の医薬品の効能の予測およびモニタリングに使用されることから、製薬メーカーで実施される治療薬開発の初期段階から、IVD メーカーも CDx の開発をスタートする必要がある。CDx の主な顧客も、ハイエンドユーザーである。

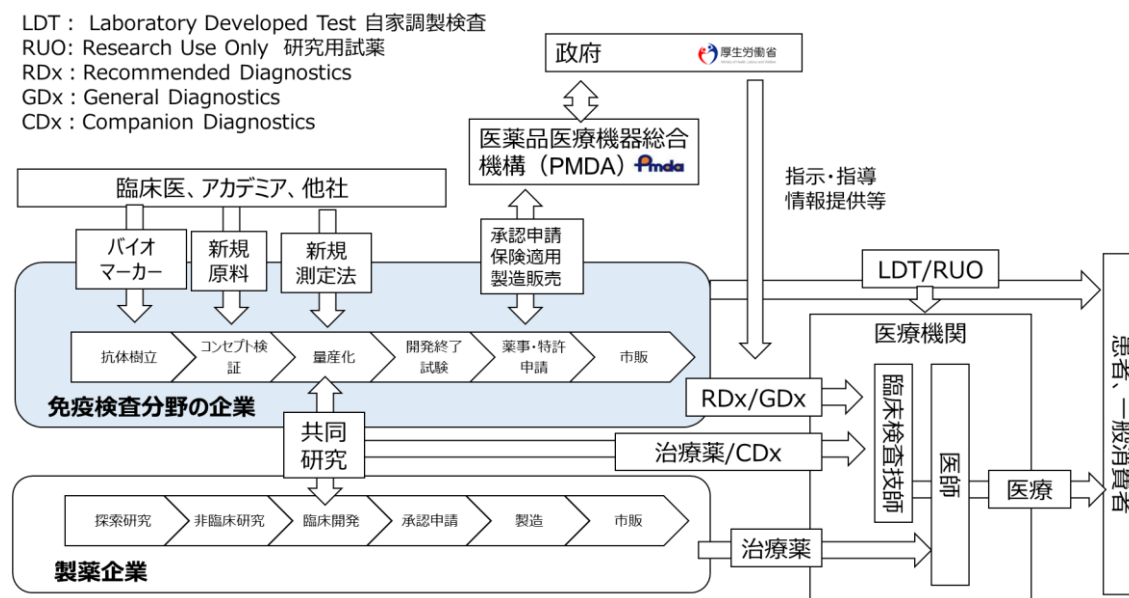


図 5.8 免疫検査分野の産業構造(出所：筆者作成)

LDT/RUO、RDx/GDx は、商品開発が行われ販売される。まず、アカデミア等で臨床的有用性が確認された標的タンパク質を診断マーカーとして免疫検査分野の企業が選定する。診断マーカーが決定された後は、その対象タンパク質を検出するための抗体を樹立する。抗体樹立に関しては、社内で動物免疫をして取得する場合と、外部に抗体樹立を委託する場合がある。原料となる抗体は、検体中の標的抗原を強く認識する必要がある、この性能が抗体樹立時のスクリーニング指標となる。例えばある疾患で抗原の特定部分が構造変化し、臨床所見に反映されるのであれば、その部位の構造を精密に認識する抗体の取得が必要となる。抗体が作製された後は、化学発光法で使用するために、捕捉用抗体はビオチンを、検出用抗体は ALP を修飾し、免疫測定試薬としての性能を発揮するかどうかコンセプト検証を行う。この工程では、専用の緩衝液で希釈した抗原や、陰性検体、陽性検体を測定し、感度、正確性および同時再現性について主に検証される。開発する診断マーカーの測定が、既に保険収載されている場合は、その方法を標準法として、化学発光法での測定結果と相関するように開発が進められる。商品開発工程と同時に大容量での量産化工程開発が行われる。抗体毎に物理化学的特性が異なるため、培養条件や精製条件の最適化が必要である。最適化した工程で数ロット分タンパク質を調製し、免疫測定試薬を作製した後、品質を確認することで、最

適化した工程のバリデーションを行う。LDT/RUO の場合はこの後商品が市場にリリースされることとなる。

一方、RDx/GDx はこの後、薬事申請用のデータ取りと薬事申請が行われる。必要なデータを PMDA への申請を行い、薬事承認、保険適用を受ける。またこの段階で特許申請と製造販売承認を取得する。市販後、検査施設への免疫測定試薬の配達は、IVD 卸が担っている。IVD 卸は、検査施設へ免疫測定試薬を配備する機能を持つと同時に、安定的な供給のため、数か月分の在庫を確保する必要がある。検査施設では、IVD 卸から配送された免疫測定試薬を臨床検査技師が専用のスペースに保管し在庫の管理を行う。医師からのオーダーに従い、臨床検査技師が測定を実施する。通常、在庫管理システムを用いて、在庫量をモニタリングし、不足した免疫測定試薬を発注し在庫を補充する。医師は臨床検査技師から報告された測定値から正確な診断を行い、患者に適切な医療を提供する。

CDx の場合、治療薬を開発する製薬メーカーが IVD メーカーに CDx の開発を委託、または共同開発を行う。医薬品の開発段階に合わせて、効能の予測／モニタリングするための免疫測定試薬の開発が進められる。CDx と RDx/GDx との違いは、治療薬の開発スピードと成功に、CDx の開発が大きく依存する点である。

セグメンテーションと顧客 KBF(Key Buying Factor)の特定

顧客セグメントによって、臨床検査技師を取り巻く環境が異なる。本論文においては、ハイエンドとミドルおよびローエンドの検査施設の 2 つの顧客セグメントについて、顧客を取り巻く環境と免疫検査分野の顧客 KBF を整理した。

免疫検査分野のハイエンドユーザーにおける顧客 KBF を表 5.7 に示した。まず、業務効率を向上させる商品スペックが顧客 KBF と言え、特に高いスループット性、迅速性、自動化が求められる。顧客は限られた業務時間の中で大量の臨床検査をする必要があるため、高いスループット性と迅速性が重要である。また自動化に関しては、測定スピードが早くても、測定準備やメンテナンス、マニュアル操作が多い機器であると、顧客の工数が増加するため必要なスペックである。近年では、限りなく全自動の測定機器が必要とされている。

二つ目の顧客 KBF は、正確な測定結果を得るための商品スペックである。顧客は医師からのオーダーに従い、正確な臨床情報を医師に報告しなければならない。そのため感度、特異度、再現性の高い測定結果の取得が求められている。早期に確定診断ができることで、早期治療による高額な治療の回避、または同じ病気で異なる医療機関を回る「はしご受診」を抑制することができる。

表 5.7 顧客を取り巻く環境と KBF(出所：筆者作成)

施設	顧客を取り巻く状況	KBF
大規模検査センター・大規模病院 (ハイエンド検査施設)	・検査スペース・機器の多さ ・測定数／日の多さ ・正確な臨床情報の提供	・高いスループット性・迅速性・自動化 ・高い感度／特異度／再現性
中規模病院、小規模病院・クリニック (ミドル、ローエンドの検査施設)	・検査スペースの限定 ・機器台数の限定 ・初期のスクリーニング検査	・操作の簡便さ ・省スペース

5F 分析

SWOT 分析のために、免疫検査分野の 5F 分析を行うことで、ステークホルダー間の関係性を整理した(図 5.9)。

新規参入の脅威は比較的弱い。新規参入業者の力が弱まる要因としては、薬事承認の必要性が挙げられる。薬事承認されていなければ研究用試薬としての扱いとなり、患者にとっては保険が効かず、コストを要する。研究用試薬は、必ずしも病態を反映しないことから、医師は薬事承認された免疫測定試薬を用いた測定を臨床検査技師に依頼する。また、販路の確保の必要性も新規参入業者の力を弱める。免疫測定試薬は、管理方法が薬機法に従うため、例えば適切な温度帯での管理が必須となっており、IVD 卸を介した商品の配送が必要となる。よって販路の確保のため IVD 卸とのコネクション構築が重要であり、それらの構築には多大な労力と時間を要する。また免疫検査分野は類似した性能(臨床有用性)を示す商品が多く、既存商品と比較して新しい価値を創出することが困難であることから、新規参入業者の力を弱める一つの要因となっている。さらに免疫検査分野で市場シェアを獲得している企業は、免疫測定試薬だけでなく、測定機器、サービスおよびサポートを総合的に提供(トータルソリューション)している。そのような既存の競合企業に対して、免疫測定試薬のみというような、サービス全体の一部の商材を顧客に提供したとしても、競争優位性を保つことが困難である。一方で、新規参入の脅威を強める要因としては、巨額の資本を有する大企業が、既存業者を買収することである。

代替品の脅威は中程度であると分析された。代替品の脅威を弱める要因としては、新規参入業者と同様、薬事承認と販路の確保の必要性が挙げられる。一方で脅威を強める要因としては、安価な検査技術の進化と普及が挙げられる。現行の化学発光法と同等のスペックで、医療機関のニーズにより適合する技術・製品が開発された場合、顧客は代替品を購入するだろう。また、OTC 検査薬の浸透も代替品の脅威を強める要因となる。OTC 検査薬は、前述の通り、薬事法の承認が不要の一般検査薬であり、薬局等での入手が可能な検査薬である。昨今、自分の健康は自分で責任を持ち管理するという「セルフメディケーション」という考

え方が重要視されており、免疫検査分野の OTC 検査薬への転用が進もうとしている(参考 URL②)。現在、国内の OTC 検査薬は尿糖、尿蛋白、妊娠検査、排卵日予測の 4 種類の検査項目に留まっているものの、アメリカでは 73 項目と日本に比べ、検査項目数が多い。このように OTC 検査薬による検査の信頼性が高まりつつあり、代替品の力を強める要因となっている。

売り手の交渉力は中程度である。免疫検査分野の企業における売り手は、例えば抗体のような原料開発メーカーである。国内外に多数の原料開発メーカーが存在していることから、IVD メーカーにとってのスイッチングコストが低いため、売り手の力を弱めている。一方で、原料調達不安から、安定的に高品質な原材料を供給できるメーカーへ注文が集中する場合があり、売り手の交渉力を強める要因となっている。

免疫検査分野の競合の力は非常に強い状況である。そのため各企業は、製品やサービスの差別化を図っている。製品の差別化は例えば、新規検査項目開発、付加価値技術の創出、機器のユーザビリティの向上等が挙げられる。新規検査項目開発は、例えば抗体を作製しにくいターゲットに対する免疫測定試薬である(参考 URL③)。付加価値技術としては、例えば、既存の原理よりも高感度化する技術である(参考 URL④)。機器のユーザビリティは例えば、他社よりも迅速測定や、微量検体測定を実現する機器スペックである。免疫測定試薬や機器のスペックだけでなく、商品開発の短期間化も差別化のポイントである。商品開発の迅速化のために、ノウハウを各社蓄積しており、新型コロナウイルス感染拡大時において各社の開発スピードに大きな差があることが示された。商品開発以外でも競合を強める要因がある。薬事申請に必要な検体を入手するためには、日ごろのロビー活動による、KOL(Key Opinion Leader)、厚生労働省や PMDA との良好な関係性構築が重要であり、競合の力を強める要因となる。また、中国においては、自国メーカー優遇による施策があり、競合の力を強めている。

免疫検査分野の買い手の交渉力も強い状況である。買い手の交渉力を強める要因としては、機器切り替えのタイミングの頻度の低さ(約 8 年に 1 度)、新規顧客の獲得の際のスイッチングコストの高さ、低コストに対する意識の高さ、類似スペック商品の多さが挙げられる。

新規参入の脅威（弱～中）		
	+ 薬事承認の必要性 + IVD専門卸を介した販路の確保 + トータルソリューションによる差別化 - コングロメリット型M&Aによる大企業の医療参入	
売り手の交渉力（中） + 調達先のスイッチングコスト小さい - 原料調達の集中	競合（強） - 技術的多様性 - 開発の迅速性 - 検体入手経路確保の困難性 - 自国ファースト	買い手の交渉力（強） - 切り替えのタイミングの少なさ - 新規顧客場合、スイッチングコストが高い - 低コストに対する意識 - 類似スペック商品の多さ
	代替品（中） + IVD専門卸を介した販路の確保 + 薬事承認の必要性 - 安価な検査技術の進化と普及 - 免疫測定試薬のOTC化	

図 5.9 免疫検査分野における 5F 分析(出所：筆者作成)

+は競争要因の力を弱める／－は競争要因の力を強める。この分析は機器および免疫測定試薬に関連する競争要因を含んでいる

免疫検査分野の顧客 KSF(Key Success Factor)

免疫検査分野の顧客 KBF を含む外部環境分析の結果、顧客 KSF は、3つの価値(バリュー)に集約された(図 5.10)。顧客に提供する価値は、オペレーショナルバリュー、クリニカルバリュー、マネジリアルバリューの3種類である。オペレーショナルバリューは、検査効率、安全性の高い製品スペックを意味する。例えば、検体当たりの測定時間の短縮や機器の自動化である。クリニカルバリューは高い臨床性能を発揮し、医師の適切な医療判断を促すことである。例えば、稀少疾患の診断の実現、または低濃度まで正確に測定できることで、疾患モニタリングを可能にする付加価値である。そしてマネジカルバリューは検査室、病院全体の業務効率・運営改善に貢献する。例えば、AI 技術を用いて臨床検査技師の動線と機器の配置、日々の検査の種類を考慮し、検査施設ごとに業務効率化を実現する。

免疫検査分野における国内売上高上位の企業(市場シェア 10%以上)は、この3つの価値すべてを提供し、国内市場シェア 10%未満の企業は、オペレーショナルバリューとクリニカルバリューを中心に価値を提供する。国内シェアが数%程度の企業においては、特定の顧客ニーズを満たすオペレーショナルバリューとクリニカルバリューの提供が重要となる。一方、国内売上高上位の企業は、広範な顧客ニーズを満たす3つのバリューの提供を目指す。マネジカルバリューの提供は、保有する免疫測定試薬・機器のラインナップ、IT ソリューションなど、多様な商品が必要となるため、当該価値の提供を実施できる企業は限定的である。これらの企業において測定数の増加、測定時間の制約が顕在化した大規模医療施設

に対する、マネジカルバリューの提供が望まれている。

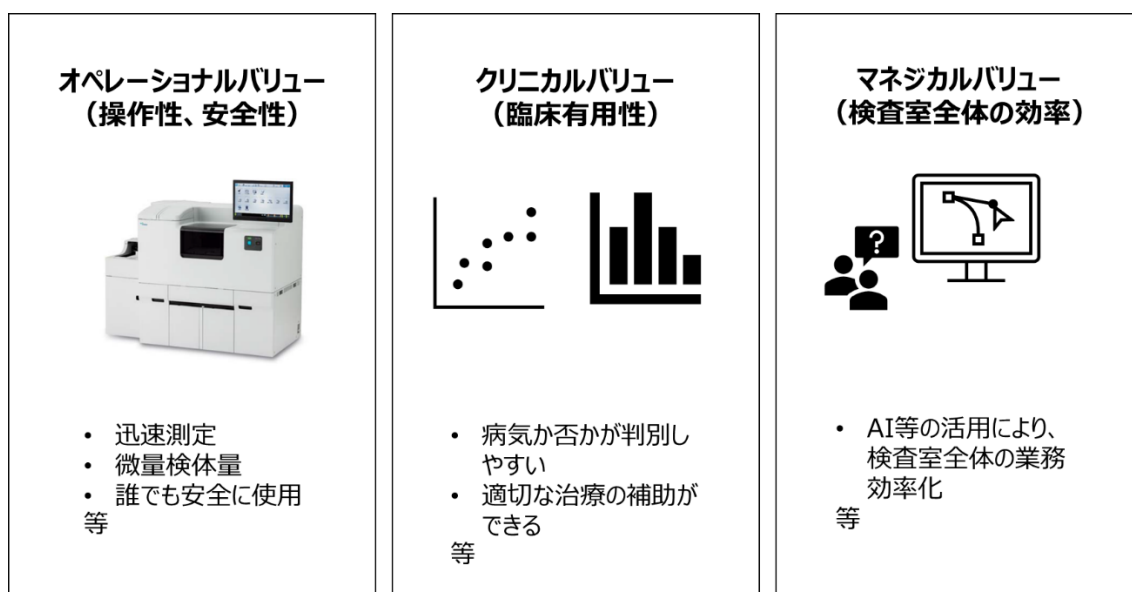


図 5.10 免疫検査分野の顧客 KSF(3つのバリュー)(出所：筆者作成)

ベンチマーク分析

免疫測定試薬を販売しているベンチマーク企業の分析を行うことで、対象企業の戦略上の特徴を見出し、成功要因を探る。さらに分析から得たインプリケーションを事業戦略に反映させる。免疫検査分野におけるベンチマーク企業として富士レビオ社を選定した。選定理由は、以下の3点である。1点目に、内資の免疫検査分野の企業で国内売上高が最も高いこと、2点目に、新型コロナウイルス感染症拡大前後の売上高の増加率が国内売上高ランキングトップ20の企業の中で最も高かったこと、3点目に、iTACT法のような独自性と臨床有用性の高い技術を開発していることである[16]。

事業戦略についてのインプリケーションは、バリューチェーン上で持続的な競争優位性を構築できる事業領域、および地域に限定することが、差別化集中戦略において重要である点だ。富士レビオ社は、免疫検査分野の企業における川上・川下統合により、川上にあたる原料メーカーが保有するマーカーや原材料を用いて免疫測定試薬を開発し、川下にあたる受託臨床検査会社で早期に開発品を導入し、顧客満足を獲得する戦略を取っている(図 5.11 および図 5.12)。

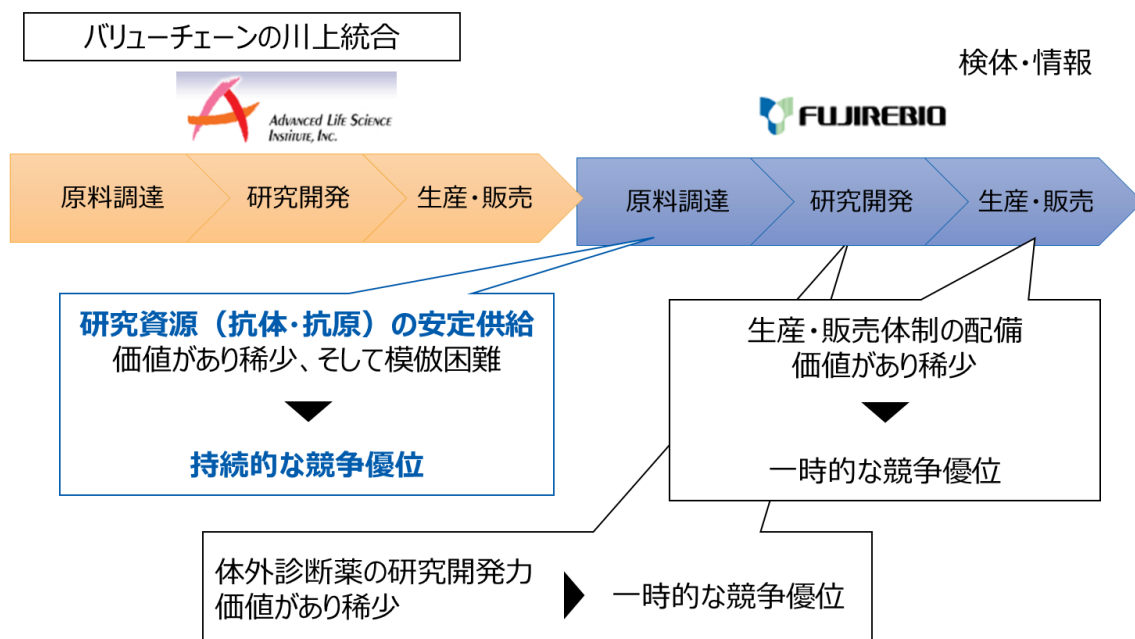


図 5.11 富士レビオ社の川上統合についての関係図(出所：筆者作成)

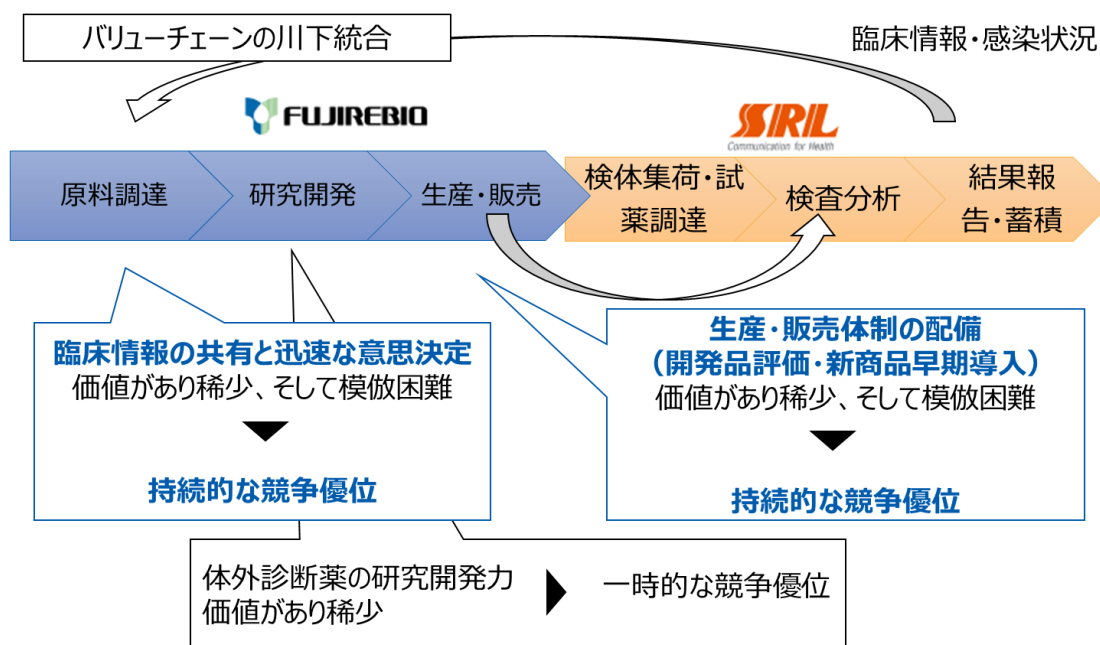


図 5.12 富士レビオ社の川下統合についての関係図(出所：筆者作成)

川上(売り手)にあたる企業((株)先端生命科学研究所や American Biological Technologies, Inc.)の専門領域がウイルス肝炎やがんの診断に特化していることから、事業領域を限定し

たものと考えられる。また、免疫測定試薬・機器の生産拠点、および営業地域が国内と米国、北欧に集中していることから、現場の設備とコネクションを最大限に生かした現地主導の営業戦略を行っていることが示唆された。シスメックス社は、市場シェア数%であり、差別化集中戦略が市場シェアを獲得する上で重要である。富士レビオ社のベンチマーク分析によって得られたインプリケーションは、検査項目と地域の限定の重要性であり、筆者の事業戦略および財務戦略の構築において十分考慮する必要がある。

IVD 事業のルミパルス事業については肝疾患系の検査項目が売上の多くを占めており、その原材料やライセンスを保有している(株)先端生命科学研究所を傘下に収めたことが大きく影響している。OEM 事業に関しては海外の売上比率が非常に高く、特にアメリカの売上が持続的な成長を牽引している(図 5.13)。

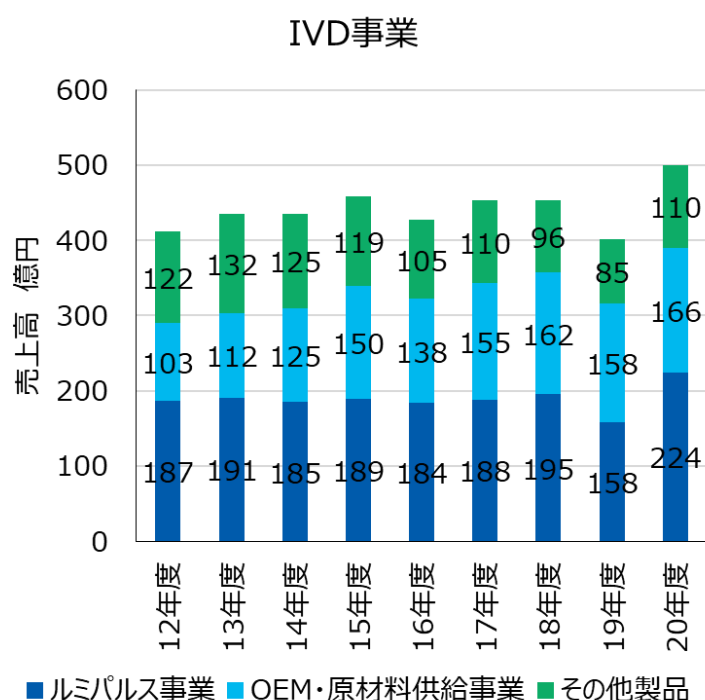


図 5.13 富士レビオ社の IVD 事業の売上高(出所：富士レビオ社アニュアルレポートをもとに筆者作成)

アメリカにおける OEM 事業の持続的な成長は、がん診断とバイオマーカーアッセイに強みを持つ American Biological Technologies, Inc.(のちに Fujirebio Diagnostics, Inc.と合併)の M&A が成功の要因である。富士レビオ社は、(株)先端生命科学研究所の統合により、感染症、特に肝炎ウイルス検査について強みを発揮しており、American Biological Technologies, Inc.はがん診断という既存の領域外に強みを持っており、M&A による相乗効果が発揮されたと示唆された。以上のことから、富士レビオ社の免疫検査分野の事業は、オ

ーガニックグロースだけでなく、巧みな買収戦略によって、買収先とのシナジー効果を発揮したと考えられる。シナジー効果を発揮するためには、他社の保有する特許、技術、設備を詳らかに調査・整理し、シスメックス社が従前保有していない、且つ有用な製品の作製に必要な技術を選別することが重要である。他社にはない独自性、臨床有用性のある製品作りに不可欠な技術の開発が、技術戦略策定に関わるインプリケーションである。

5.4.2. 内部環境分析

外部環境分析では、免疫検査分野の顧客 KBF および KSF を特定した。また 5F 分析により競合と買い手の力が特に強く、差別化集中戦略が重要であることを示した。さらに、ベンチマーク分析から、開発する検査項目とビジネスを展開する地域を限定してスタートすることをインプリケーションとして得た。ここでは内部環境分析を行い、内部資産・技術を整理し KSF とのギャップを考慮して、シスメックス社の強みを活かした戦略を構築する。なお、シスメックス社は、ヘマトロジー分野の成功とともに成長していることから、ヘマトロジー分野で培ったシスメックス社の特徴を、免疫検査分野の事業に展開させるために、内部環境分析では免疫検査分野だけでなく、ヘマトロジー分野の分析も一部取り入れた。

シスメックス社の沿革

シスメックス社の IVD 製品(ヘマトロジー分野、免疫検査分野を含む)における経営、海外、製品の 3 つの分類における沿革を以下にまとめた。

まずヘマトロジー分野についての沿革を示す。1968 年に東亜特殊電気株式会社が製造する医用電子機器の販売会社として東亜医用電子株式会社(以下、「東亜医用電子」)(現・シスメックス社)が設立された。設立当時、東亜医用電子はヘマトロジー分野の製品を開発しており、Coulter Electronics, Inc.(現・Beckman Coulter, Inc.、以下：コールター社)がグローバル No.1 のシェアを誇っていた。1975 年に東亜医用電子は国内初の全自動血球計数機器「CC-710」を発売し、徐々にヘマトロジー分野の市場シェアを獲得した。1983 年には、測定精度を飛躍的に向上させるシースフロー技術を採用した多項目自動血球計数機器「E-5000」を発売した。本機器では当時測定が困難だった血小板の測定を可能とし、従来の検査項目と合わせて 8 種類の検査項目の同時測定が実現した。

次に免疫検査分野に関する沿革を示す。1987 年には、収益事業であった血球計数分野以外への市場獲得を目指し、免疫検査分野用の機器である「PAMIA-10」を発売した。これによりヘマトロジー分野より大きな市場への参入を果たした。当時免疫測定には 2 時間要していた中、ラテックス凝集法を原理とする PAMIA-10 は、15 分間での測定を実現した。しかしながら、2000 年を過ぎると、免疫検査分野では化学発光法を原理とする高感度な機器が市場シェアの多くを獲得した。2002 年に完全子会社化した国際試薬株式会社のバイオ関連技術と、ヘマトロジー分野で培った機器・システム構築技術を組み合わせて、2007 年に「HISCL™-2000i」を発売した。当時、他社製品は 30 分以上測定時間を要していたが、本

製品は、化学発光法を原理とすることで、17 分間で高精度にターゲットタンパク質の量を定量することができる画期的な機器であり、競争力がある特徴と言える。その後、後継機である HISCL™-5000 を 2012 年にリリース、2014 年には、省スペース化した HISCL™-800 を発売した。

次に海外展開について記述する。1979 年のアメリカにおける現地法人設立に端を発し、後述の通り、海外の各地に現地法人、工場、研究開発拠点を設立した。海外の販路拡大に向けた業務提携については、1998 年に、F.Hoffmann-La Roche Ltd.(ロシュ社)との免疫測定試薬を含む、販売協力および共同研究開発に関するグローバルな業務提携に基本合意した。免疫検査分野におけるタンパク質原材料の重要性が増したことにより、M&A やアライアンスが活発化した。2002 年に、免疫測定試薬の作製技術、バイオ関連技術を保有する国際試薬を完全子会社化した。2007 年の HISCL-2000i 発売後の 2011 年には、カイコによる高品質なタンパク質生産技術を持つ片倉工業株式会社の生物科学研究所を譲受し、免疫測定試薬における開発・生産技術力の強化を行った。また、2022 年 2 月には、免疫測定試薬の生産・製造・販売ノウハウを保有するカイノス社との資本業務提携を行うことで、免疫検査分野における成長加速を行った。加えて同年 6 月には、免疫検査分野における原材料開発に関して免疫生物研究所(以下「IBL 社」)と業務提携契約を締結した。IBL 社は独自の抗体ライブラリを保有し、シスメックス社の求めるグローバル市場の診断ニーズに合致する抗体の取得が可能となるため、独創的で高品質な免疫測定試薬の開発に貢献することが期待される。以上のように、近年では主力事業であるヘマトロジー分野以外の免疫検査分野におけるアライアンスや M&A が活発化しており、積極的な投資がなされている。

シスメックス社の成功要因

次に、シスメックス社の歴史から免疫検査分野とヘマトロジー分野における成功要因を分析し、強みを明確化した。

1 つ目の成功要因は、付加価値の創出である。創業当時、コールター社がグローバル No.1 であり、常にシスメックス社がその背中を追いかける立場であった。E シリーズは、国内外でベストセラーとなり、その後継機もヒットとなり、シスメックス社は市場シェアを拡大した。機器のスペックが向上する一方で、検査の保険点数が下方修正された結果、医療機関における検査室の収益が悪化し、いかに運営コストを下げるかといった新たな課題が生じた。シスメックス社は、他社と熾烈な価格競争をするだけでなく、検査室全体の効率を向上させる「トータルソリューション」の実現に向けた取り組みを開始した。トータルソリューションは測定機器と、検体搬送コンベア、および情報処理ユニット等で構成され、検査室の人員、スペース、検体処理数など、顧客の環境に即したシステムを構築する、これまでにない商品コンセプトであった。これは「顧客業務負荷量の低減によるトータルコストの削減」という本質的な課題を解決するものであり、シスメックス社がヘマトロジー分野でフロントランナーになった大きな要因であった。従来は 1 台の測定時間に注目されていたのに対し、こ

のシステムでは検査開始から医師への結果報告まで掛かる時間の短縮という付加価値を実現した。

2つ目の成功要因は、コンカレント・エンジニアリングである。コンカレント・エンジニアリングは自動車業界で提唱された考え方で、設計、調達および生産の検討を同時に行う方法である。シスメックス社では、機器と免疫測定試薬の両方を販売しており、それらを同時に開発する必要があった。開発に必要な、生物、化学、物理、流体、ソフトウェア、薬事など様々な専門性を持つ人材が集まりプロジェクトを推進する。従来の開発方法は、ウォーターフォール型開発と呼ばれ、初期工程と後期工程の人材が交わることが少なく、後期工程の担当者は、開発が一定の段階まで進捗してから業務に携わる。ウォーターフォール型開発の場合、それぞれの専門家が各自の専門分野のみに拘るとプロジェクト全体の進捗が滞る。一方、コンカレント・エンジニアリングでは、後工程、あるいは専門性の異なる人材がプロジェクトを同時に推進することで、手戻りを排除し、効率的な開発を推進することができる。東亜医用電子設立当初から、このコンカレント・エンジニアリングを体現してきたシスメックス社にとって、他社にはない強みである。

VRIO 分析

シスメックス社の沿革から成功要因の分析を行うと同時に、バリューチェーンでの強みを特定するために免疫検査分野の VRIO 分析を行った(表 5.8)。なお、○は国内上位レベルの競合優位性を示し、◎は国内で最高レベルの競合優位性があることを示す。分析の結果、以下の2つが新たに強みとして明らかになった。

1点目は、免疫測定試薬の原材料の仕入れから製品の出荷までを一貫して行える全ての機能を、一つの拠点に集約していることである。シスメックス社では、免疫検査分野の事業の成長と収益拡大を目指している。特にタンパク質原材料が製品の性能を大きく左右する分野においては、原材料の品質担保が価値創造の原点であることから、2018年から研究拠点到隣接するようにバイオ診断薬拠点施設の建設を開始し、2019年に稼働した(参考 URL⑤)。本施設は、バイオポート、バイオスクエア、バイオキューブの3施設で構成される。バイオポートは、免疫測定試薬の原材料開発、分析機能を有し、品質向上および開発の加速に貢献することが期待される。免疫測定試薬に使われるタンパク質原材料(抗体や抗原)は、そのタンパク質を発現する動物細胞を大量(10 L 以上)に培養するための設備が必要となる。バイオポートにおいては、専用の設備を用いた動物細胞大量培養による目的タンパク質の大量調製が可能となった。このことから、商品開発から量産への移行をシームレスに行え、新規商品の迅速な市場導入が可能となった。バイオスクエアは、免疫測定試薬の生産、物流を担い、バイオポートや他施設で生産されていた原材料の仕入れから出荷までを担い、免疫測定試薬の製造に関する法令に遵守した施設となっている。この増強により、国際試薬株式会社での床面積あたりの生産能力を約3倍に向上させた。バイオキューブでは、タンパク質生産に必要な宿主であるマウスやラット、蚕の飼育、それら宿主動物への免疫など、原材料生

産環境を整えた。多様な原料タンパク質の要求仕様に対し、最適な宿主動物・免疫・選別方法の選択を行うことで、市場ニーズに合致した原材料生産を可能とした。以上のことから、シスメックス社では免疫測定試薬の原材料開発から製品の開発、大量生産、物流までを一気通貫で行うことが可能となり、価値があり稀少、そして模倣困難な体制を築いたことから、持続的な競争優位性を獲得したと考えられる。他社と比較して、原料開発から製品の出荷までを滞りなく実施でき、製品の品質や安全性に大きく寄与するため、経済価値が高いと判断される。また国内で原料開発から物流までを行える企業は稀であることから特に稀少性が高いと判断される。多大な設備投資を要することから模倣困難性も非常に高い。組織の観点では、原料開発から物流までの組織体制構築は免疫検査分野では進んでおらず、他社と比較して優位性がある。

VRIO 分析で明らかとなった強みの 2 点目は、国内外に広がる販売体制の構築である。シスメックス社の沿革で述べたように国内の販売体制構築が盤石であったからこそ、海外へ挑戦できたと言える。販売、サービス&サポート体制については、国内で全国に 7 支店・13 営業所・首都圏サービスセンターを設け、国内 No.1 の販売サービス体制を備えている(参考 URL⑥)。一方、海外では、ドイツ、アメリカ、中国などに現地法人を設け、190 か国以上の国々に供給されている。これらの国と地域においてグローバルな直接販売体制および協業先とのアライアンス体制を構築しており、安定的な供給が可能であり、免疫検査分野では価値があり稀少そして模倣困難な体制を築いていると言える。流通・販路については、模倣困難性と組織で特に他社と比べ優位であると分析された。他社と比較して国内の IVD 卸とのコネクションは強固でかつ広範である。コネクション構築には多くの工数を要することから模倣困難性が高いと分析された。また、社外とのコネクションを構築するための組織体制が構築されており、他社と比較して優位である。一方経済価値についてはシスメックス社よりも免疫検査分野の売り上げ規模が大きな競合が複数社存在することから、「○」とした。シスメックス社以外に数社、強固で広範な流通・販路を有する競合他社が存在することから「○」とした。

表 5.8 シスメックス社の免疫検査分野の VRIO 分析(出所：筆者作成)

	原料・商品開発・生産	流通・販路
Value(経済価値)	◎ 商品の品質、安定供給に寄与するため	○ シスメックス社よりも売上規模の大きな競合が数社存在するため
Rarity(稀少性)	◎ 原料開発から生産出荷までを行える IVD メーカーは稀	○ 強い流通・販路を持つが、シスメックス社を上回る競合が数社存在するため
Inimitability (模倣困難性)	◎ 免疫検査分野では原材料開発を外注するケースが多く、設備投資、人材獲得に費用を要することから模倣困難	◎ 他社と比較して多くの販路を有し、模倣には費用を要することから模倣困難
Organization (組織)	◎ 原材料開発を行う設備と人員が整った	◎ 全国に営業および技術サポートの人員を配備

免疫検査分野の顧客 KSF に対するシスメックス社の保有するケーパビリティとのギャップの整理

免疫検査分野の顧客 KSF として設定した 3 つのバリューの内、まずマネジカルバリュー(検査室全体の業務効率の向上)と、シスメックス社が保有するケーパビリティ(設備や商品ラインナップ等)とのギャップについて考察する。

マネジカルバリューを顧客に提供するには、「自動化工程の実現」と「ユーザーの工数削減」の対応が重要となる。各社がどのようにマネジカルバリューの向上を図ったのか、国内売り上げ 1 位から 3 位の、アボット社、ロシュ社および富士レビオ社を例示する(表 5.9)。

1 点目の自動化であるが、比較対象企業各社は、単体での測定機器(モジュールという)だけでなく、複数のモジュールを連結する「統合システム」を提供しており、前処理や搬送、生化学検査項目の同時測定等の処理を、可能な限り人の手を介在させることなく実行できる。シスメックス社の製品では前処理や検体の搬送は自動で行えるものの、生化学検査項目との併用はできず、また複数の機器を連結することもできない。よって自動化のためのケーパビリティが対象企業と比べてシスメックス社には不足している状況である。

2 点目のユーザーの工数削減に対する施策については、アボット社、ロシュ社はそれぞれ、

「Alinity pro」、「cobas® infinity 検査室ソリューション」という業務効率改善のためのサービスを展開していることを各 HP 上で紹介している(参考 URL⑦、参考 URL⑧)。これらのサービスは臨床検査技師と、測定器のパフォーマンスを最大化するための、IT を用いた解析と管理を行い、顧客に適切なワークフローを提案する。シスメックス社、および富士レビオ社は、業務効率化についての施策は行っているが、トラブル発生時の迅速な対応に関する施策が中心であり、アボット社、ロシュ社が行っているような、直接的にマネジカルバリューを提供する施策ではないと判断された。以上のことから、マネジカルバリューの提供と、シスメックス社のケーパビリティには、商品スペックに大きな乖離があると分析された。

続いて、オペレーショナルバリュー(操作性、安全性の向上)の提供とシスメックス社のケーパビリティのギャップの有無について分析する。シスメックス社が提供する免疫測定機器(HISCL™-5000)は、対象 3 社が販売しているモジュールのスペックと同等以上の性能であり、市場が求める機器スペックを満たすと分析された(表 5.9)。特に、測定時間は、他社が検査項目により変化する一方、シスメックス社は全検査項目で 17 分間での測定を実現している。これは国内最高レベルのスペックである。また、免疫測定機器・試薬の生産・流通・販路に関しては前述の通り、他社と同等以上のケーパビリティを有している。以上のことから、オペレーショナルバリューの提供とシスメックス社のケーパビリティに大きな乖離は見られない。

表 5.9 各社が販売する免疫検査分野の機器スペック比較(出所：参考 URL⑨、⑩、⑪および⑫をもとに筆者作成)

	HISCL™-5000 シスメックス社 参考 URL⑨	ARCHITECT i2000SR アボット社 参考 URL⑩	cobas e 601 ロシュ社 参考 URL⑪	ルミパルス ®L2400 富士レビオ社 参考 URL⑫
測定原理	CLEIA	CLIA	ECLIA	CLEIA
同時検査項目数	24	25	25	24
検体処理能力 (テスト／時間)	200	200	170	240
反応時間	17 分	29 分 ¹⁾	18 分 ¹⁾	20 分 ¹⁾
検体架設数	最大 100 検体	最大 100 検体	最大 150 検体	最大 150 検体

1) 検査項目によって変化。通常方法での測定時間を記載

最後に、クリニカルバリュー(臨床有用性の向上)の提供とシスメックス社のケーパビリティのギャップについて述べる。クリニカルバリューでは、医師に適切な臨床的意思決定を促す必要があるため、正確な臨床情報の提供が求められる。このことから、偽陽性、および偽陰性の発生確率の低減が、正確な診断に向けた大きな課題となっている。この課題に対する

一つの解決方法は、ピットフォールの低減であり、各社(シスメックス社を含む)、添加剤により対象物質から阻害物質を解離させる前処理方法を検討することで対処した。シスメックス社は愛媛大学と共に「高安定性サメ抗体の取得技術」を開発したことにより、阻害物質を解離させる条件で、対象物質を認識する抗体が取得できるようになった。この技術開発により他社と比較して偽陽性・偽陰性率をさらに低減させることが可能となった。このことから、クリニカルバリューの提供とシスメックス社の保有するケーパビリティについては大きな乖離はなく、他社と同等以上の価値を提供できると分析された。

以上のことから、マネジカルバリューはシスメックス社の保有するケーパビリティとの乖離が大きい一方で、オペレーショナルバリューとクリニカルバリューに関しては他社と比較して同等以上の価値を提供可能な状況であることが示された。本事業においては、オペレーショナルバリューおよびクリニカルバリューの提供に集中した事業戦略の構築が必要な要件となる。

5.4.3. 事業化に向けた戦略

事業戦略への展開のために、シスメックス社の免疫検査分野における強みと弱みを特定する。シスメックス社の免疫検査分野の市場における国内シェアは、2020 年において 2.1%と後塵を拝している。免疫検査分野において、シスメックス社はニッチャーである。ニッチャーは業界全体でシェアは高くないものの、狭い市場に特化し、集中的に経営資源を活かす企業である。新型コロナウイルス感染症拡大前の成長率は約 2%であり、国内の免疫検査分野の市場は成熟していたと考えられる。国内シェアトップのアボットジャパン社のシェアが 12.6%であることから、国内は特定の企業による寡占状態とは言い難く、各社が市場シェアを取り合う熾烈な競争状態にある。ニッチャーは、独自性の高い検査項目等を開発することで市場シェアを獲得することが肝要である。

SWOT 分析とクロス SWOT 分析による戦略構築

前節までの外部環境分析および内部環境分析の結果から、SWOT 分析を行った(図 5.14)。

シスメックス社の強みは、過去のシスメックス社の成功要因、および VRIO 分析に記載の通りである。まず、国内外で広範な販路を持つことが挙げられる。販路は IVD 卸を介した、または直販体制を整えた仕組みであり、商品を世界中に供給できる点で大きな強みだと言える。2 点目に免疫測定試薬と機器の両方を取り扱い、様々な専門家集団を有することでコンカレント・エンジニアリングが実施可能な点もシスメックス社の強みである。3 点目に、原材料開発は、スタートアップや外部に委託するケースが多い一方で、シスメックス社では国内に原材料開発から免疫測定試薬の開発、大量生産まで一貫通貫に行える施設・人材・経験を集結させ、内製化を推進している。スピード感を持って製品開発する上で、タンパク質の遺伝子情報と、それを自由自在に改変できる点は他社と比較したアドバンテージとなる。最後に免疫検査分野以外の事業で安定的な収益を獲得できる点である。積極的な研究開発

投資が可能であり、新たな収益事業の確立に対して強みであると分析される。

弱みは、第一に、免疫検査分野での市場シェアが低い点が挙げられる。2点目に免疫測定試薬については他社と比較して検査項目数が少ない点である。富士レビオ社のルミパルスの検査項目数は72項目であるのに対して(参考 URL^⑫)、シスメックス社は、38項目である。3点目に免疫検査分野の測定機器のラインナップの少なさである。富士レビオ社では、高スペック大型機器のルミパルス®L2400、中程度機器サイズ・スペックのルミパルス®G1200 Plus、低スペック小型機器のルミパルス®G600 II を販売している。加えて、フュージョンプラス®では、前述の通り生化学検査項目との同時測定や機器の連結が可能であり、検査室の規模、環境に応じた商品の提案ができる。一方でシスメックス社では、高スペック大型機器の HISCL™-5000 と中程度機器サイズ・スペックの HISCL™-800 の2商品のみであり、他の機器との統合はできない。

次に外部環境について記述する。機会については、1点目に健康意識の高まりにより、医療業界全体として需要が非常に高いことが挙げられる。2点目に先進国においては市場規模が成熟しつつあるものの、患者の医療ニーズおよび顧客である臨床検査技師の働き方の多様化により、成長機会が見られる。3点目は新興国においては市場規模の成長率が著しく、検査需要が非常に高いことである。4点目にこれら市場の要求に伴い、検体数は増加しているため、病院や検査施設において人的リソースの不足が指摘されている点である。免疫検査分野の機器は、自動化が進んでおり、業務効率を向上させるため、人手不足に関連する施設は、免疫検査分野のメーカーにとって機会となる。

最後に脅威について記述する。1点目は、5F 分析で明らかにされたように、免疫検査分野では、新規顧客の獲得の際のスイッチングコストの高さ、機器の切り替えのタイミングの少なさ、類似商品などにより、買い手市場の状態が続いている点である。2点目は、競合企業の免疫検査分野の市場における競争が激しくなっている点である。3点目は、新型コロナウイルス感染拡大等により、原材料のコストや調達リスクが増加している点である。4点目に、製品輸出の際、為替変動の影響を強く受ける点である。

	プラス要因	マイナス要因
内部環境	強み - 国内外に広範で強固な販路を持つ - コンカレント・エンジニアリング - 国内で原料から試薬生産まで一気通貫に実行できる - 免疫検査分野以外で盤石な収益事業の存在	弱み - 免疫検査分野の市場シェアが低い - 免疫測定試薬の診断項目が少ない - 免疫検査分野の測定機器のラインナップが少ない
外部環境	機会 - 健康意識の高まりによる検査需要の増加 - 先進国における医療ニーズの多様化 - 新興国における検査需要の高まり - 検査施設での業務効率化の要求	脅威 - 買い手市場 - 免疫測定試薬に関する製品開発競争が厳しさを増す - 原材料の調達不安 - 為替変動リスクが高い

図 5.14 シスメックス社の免疫検査分野における SWOT 分析(出所：筆者作成)

次に戦略の絞り込みを行うために、クロス SWOT 分析を実施した(図 5.15)。クロス SWOT 分析では 4 象限それぞれについて戦略を考える。

まず、強みと機会の組合せについては、将来の事業拡大の機会にシスメックス社の強みを反映させた具体策が必要であり、「積極的戦略」の策定が望まれる。国内外での広範な販路は、免疫検査分野の安定供給に対して、大きな強みである。新製品が開発されれば早期に商品価値を訴求できる国内外の販売ネットワークを有している。そのため、顧客ニーズが多様化する日本国内(先進国)に向けては、他社にはないクリニカルバリューおよびオペレーショナルバリューの提供が重要だと分析された。国内でヒットした場合、他の地域への訴求を行うとともに、その地域の臨床検査技師のニーズに即した商品開発が必要となる。

二つ目に弱みと機会の組合せ戦略について記載する。前述の通り、検査需要が世界的に高まっている中で、特定の弱みが企業の成長の妨げになっている場合がある。ここでは、そのボトルネックを特定し、改善して成長する「課題改善戦略」の立案が重要である。シスメックス社の弱みは、免疫検査分野の検査項目数と、測定機器ラインナップの少なさが挙げられる。免疫測定試薬のビジネス戦略の方向性としては二つのパターンがあり、一つは今ある原材料で使われる抗体または免疫測定試薬の組成を変更し、オペレーショナルまたはクリニカルバリューを高める施策、もう一つが新規のユニークな検査項目を開発する方法である。また機器のラインナップについても、既存製品をバージョンアップするという方向性と、既存製品の組み合わせ等を含めた全く新しい商品を開発する方向性が考えら

れる。

三つ目に強みと脅威の組合せの分析を行う。先に示した脅威はシスメックス社に限らず、免疫検査分野のメーカーに共通した脅威であることから、シスメックス社が開発する商品次第では、シスメックス社のみが市場シェアを多く獲得することができる。ここでは、シスメックス社の強みを発揮できる「差別化集中戦略」の構築が求められる。脅威としては 5F 分析で示された、買い手と競合他社の交渉力の強さと、原料・製品の安定供給、為替変動リスクに関する点を記載した。買い手と競合他社の交渉力の強さを考慮すると、いかに他社よりも付加価値のある製品を提供できるかが重要である。安定供給、為替変動リスクを考慮すると、KOL(Key Opinion Leader)とのコネクションが形成されていて、他社と差別化できる製品を作るために必要な研究・生産拠点がある地域に限定した戦略の構築が必要と考えられる。

四つ目に弱みと脅威の組合せ戦略について分析した。この象限は、「撤退戦略」とも考えることができ、今後の脅威に対してシスメックス社の弱みによって収益を低下させないための打開策を構築することが出来る。つまり、設備や外部とのコネクションの構築が不十分な地域、および他社商品と差別化ができていない商品への経営資源の配分を最小限に留めることが必要であると考えられる。

シスメックス社は、免疫検査分野で市場シェア 2%程度のニッチャーであり、徹底した差別化集中戦略が重要である。富士レビオ社で得たインプリケーションによると、免疫検査分野における収益拡大には、場所と検査項目を限定することが重要であることが示唆されていた。本節においては、外部環境分析、内部環境分析を SWOT 分析により取りまとめ、クロス SWOT 分析により戦略の立案を行った。差別化集中戦略が重要であることから、「強み×脅威」の象限が重要であると考えられた。この象限においては、ベンチマーク分析で得られたインプリケーション同様、ケーパビリティの整った地域において、競争優位性の高い製品の提供が重要であることが示唆された。

		内部要因	
		強み	弱み
外部環境	機会	強み×機会 - 先進国向けの高付加価値製品の開発（クリニカルバリュー、オペレーショナルバリュー） - 新興国向けの項目開発、または既存製品の訴求	弱み×機会 - ユニークな免疫検査分野の診断項目の拡充 - ユニークな価値を出す製品の拡充 - 当社独自の機械の開発
	脅威	強み×脅威 ケーパビリティが充実した地域での高付加価値製品の開発・販売	弱み×脅威 ケーパビリティが整っていない地域での他社と類似の商品販売を最小限に留める

図 5.15 シスメックス社の免疫検査分野におけるクロス SWOT 分析(出所：筆者作成)

対象となる事業地域と検査項目

クロス SWOT 分析の結果、ケーパビリティの整った地域においてビジネス展開することが重要であることが明らかとなった。免疫検査分野の試薬ビジネスを展開する上で重要なケーパビリティがいくつか存在する。

シスメックス社の強みの一つである、原料から生産まで一貫通貫で行うためには大規模な設備とそれを的確に扱う人材が重要である。シスメックス社は、世界各国に工場や研究施設を保有している。しかし、抗体等の原材料を大量に調製できるのは日本の神戸に設立されたイーストサイトのみである。世界中に販路を持つシスメックス社であるが、支店・営業所およびサービスサポート拠点、あるいは人員が最も充実しており、他社との優位性があるのは日本国内である。また KOL との繋がりも国内が最も多い。KOL は各分野での権威であり、診断フローやガイドライン作成に大きく貢献するため、販売促進の観点から非常に重要な顧客である。

以上ケーパビリティの充実の観点から、日本国内に集中したビジネスを展開することが重要であると分析された。

クロス SWOT 分析やベンチマーク企業分析の結果、検査項目についても種類を限定し、開発を進めることが、売上に重要であると分析された。表 5.10 にはピットフォールの報告があり、シスメックス社がリリースしている検査項目を示した。検査項目の選別にあって

は、克服すべきピットフォールの対応が容易であるか（選別指標①）、国内市場規模が 5,000 百万円以上であるか（選別指標②）の 2 点を考慮した。

一点目のピットフォールの内容については、主に自己抗体が原因であるものと、抗原構造の複雑性に起因するものが考えられる。ピットフォールが自己抗体の存在に限定されている場合は、克服がしやすく、抗原の複雑性が含まれる検査項目は、克服の困難性が高まることで、開発可能性が低下すると考えられる。表 5.10 では、2027 年における売上予測順に検査項目を並び替えており、1 位が腫瘍マーカーの一つである CEA(Carcinoembryonic Antigen)、2 位が甲状腺ホルモンである TSH(Thyroid stimulating hormone)、3 位に肝炎ウイルスマーカーである HBsAg(Hepatitis B surface antigen)であった。HBsAg は細胞膜上に存在しており、細胞膜の破壊が求められ、より厳しい条件での変性が必要となるため、開発困難性が他の 2 つの検査項目よりも高い。CEA および TSH に関しては、主に自己抗体がピットフォールの原因であるため、その対処が比較的容易である。

以上 2 つの選択指標から、表 5.10 にまとめた検査項目の内、売上の最も高い CEA について第一の開発すべき検査項目として選択し、ビジネスプランの構築を行った。財務戦略では、CEA の開発に要する工数や費用、事業価値について計算した。

表 5.10 対象の検査項目候補(出所：参考文献[19]をもとに筆者作成)

疾患	抗原	選別指標①	選別指標②
がん	CEA	○	○
甲状腺	TSH	○	○
B 型肝炎	HBsAg	×	○
糖尿病	インスリン	○	×
SARS-CoV-2	N protein	×	×
B 型肝炎	HBeAg/Ab	×	×
C 型肝炎	HCVcAg	×	×
がん	PSA	○	×
SARS-CoV-2	IFN-λ 3	○	×
インフルエンザ	A/B 抗原	○	×

選別指標①：ピットフォールの解決難易度、○=対応が比較的容易、×=対応が比較的困難

選別指標②：化学発光法の 2027 年度売上予測(参考文献[20]を改変)、○=5,000 百万円以上、×=5,000 百万円未満

5.4.4. 事業戦略まとめ

前節で、臨床検査技師の業務効率の向上と医師への正確な臨床情報の提供が社会課題であることを明らかにした。そしてイノベーションアイデアとして、社会課題の大きな原因の一つであるピットフォールの低減の解決に焦点を当て、ピットフォールを迅速に排除する免疫測定試薬の創生を提案した。

本節では、まず外部環境分析の結果から、免疫検査分野における顧客 KBF、顧客 KSF を特定した。続いて、ベンチマーク分析を行い、事業領域と検査項目を限定することが事業成功に必要な要件であることを見出した。さらに内部環境分析の結果と顧客 KSF とのギャップを検証した結果、オペレーショナルバリュー(操作性、安全性)とクリニカルバリュー(臨床有用性)の向上に注力することの重要性が示された。クロス SWOT の結果では、「ケーパビリティの充実した地域で高付加価値製品の提供」が必要な戦略であることがわかった。本事業においては、捕捉用の抗体にサメ抗体を利用するという点以外従来の製品と同様の設備・人材が活用できることから、オペレーションの観点で最も充実した日本国内を事業地域として選定した。また年間の国内売上金額とピットフォール解決の難易度の観点からがん検査項目の一つである CEA を開発する検査項目として選定した。

5.5. 財務戦略

免疫測定試薬の開発過程では、様々な不確定要素が介入し、事業の成功を妨げる。企業の経営においては、その不確実性を考慮した上で、目まぐるしく変化する環境に適合する戦略

を提示することが重要である。ここでは、検査項目として選択した腫瘍マーカーである CEA の免疫測定試薬の事業を例に、損益計算書、貸借対照表およびキャッシュ・フロー計算書の予測を作成した。さらに DCF 法を用いて、フリーキャッシュ・フローから予測期間の割引現在価値および継続価値の割引現在価値を算出した。その後、リアルオプション理論に基づいた分析(リアルオプション分析)を実施するため、ディシジョンツリー法を適用し、算出した現在価値と開発フェーズ毎の成功確率を掛け合わせることで、期待値を計算し、各フェーズにおける成功または失敗した場合の、事業継続か撤退の判断に関して言及した。

ここでは、CEA の免疫測定試薬の事業開始から 15 年間(研究開発期間 5 年間、商品リリースから 10 年間)の財務三表(予測)を作成する。本事業はシスメックス社から資本金として 50 百万円の出資を受け、独立した会社として事業を開始することを想定した。なお、シスメックス社に対する配当金等の提供は考慮しないものとする。

5.5.1. 損益計算書(P/L)の予測

財務計画の策定にあたり、まず損益計算書(予測)を作成する。研究開発費用を最小、標準および最大の 3 通り、商品リリース後に獲得する市場シェアを 1%、3%、5%および 10%の 4 通り、それらのすべての組み合わせである、合計 12 通りについて、研究開発開始から 15 年間の損益計算書を作成する。

まず、研究開発費用について、最小、標準および最大の 3 通りについて想定した。研究開発フェーズを「原料抗体開発およびコンセプト検証(2 年間)」、「量産工程設計(1 年間)」、「開発終了試験、薬事申請、特許申請(2 年間)」の 3 つに大分した。表 5.11 に各年度の実施事項とフェーズ、成功確率について記載した。

抗体樹立の成功確率については、5 つの実施事項の成功確率のうちで最も低い 70%とした。これは、対処すべきピットフォールは主に自己抗体の影響の除去であり、HBsAg のような抗原の変性を伴う検査項目と比較すると難易度は低いものの、変性剤中で抗原認識能を維持するという全く新しい特性を有する抗体を取得する必要があることを考慮したためである。次いでコンセプト検証および開発終了試験の難易度が高く、成功確率を 80%に設定した。工程設計、および薬事・特許申請については、他の工程と比較して、難易度は低いと判断し、90、95%にそれぞれ設定した。従って、フェーズ I の成功確率は、56%(70%×80%)、フェーズ II の成功確率は 90%、フェーズ III は 76%(80%×95%)とした(表 5.11)。

表 5.11 各年度における実施事項とフェーズ、成功確率(出所：筆者作成)

フェーズ	年目	実施事項	年度毎 成功確率	フェーズ毎 成功確率
フェーズⅠ	1 年目	抗体樹立	70%	56%
	2 年目	コンセプト検証	80%	
フェーズⅡ	3 年目	量産化	90%	90%
フェーズⅢ	4 年目	開発終了試験	80%	76%
	5 年目	薬事・特許申請	95%	

続いて、損益計算書(予測)を作成し、図 5.16 に示した。この予測は、市場シェアが「3%」、研究開発費用が「標準」の場合の試算である。事業開始 1 年目から 7 年目までは、営業損益の累計がマイナス予想であるため、法人税等の支払い額をなしとし、税引き後営業損益と営業損益の金額を同値とした。8 年目から 15 年目までは営業損益の累計がプラスとなるため、営業損益の 30%分を法人税等の支払額とした。8 年目は累計の営業損益がプラスに転じる年度であるため、7 年目までのマイナス分を差し引いた、6.8 百万円に対して法人所得税等を適用した。市場シェアが 1%の場合は約 40 百万円／年であることから、最も保守的である「市場シェア 1%のシナリオ」であっても、シスメックス社の新規事業として十分な売上規模が期待される(イノベーション・ストラテジー研究成果書に詳細を記載)。

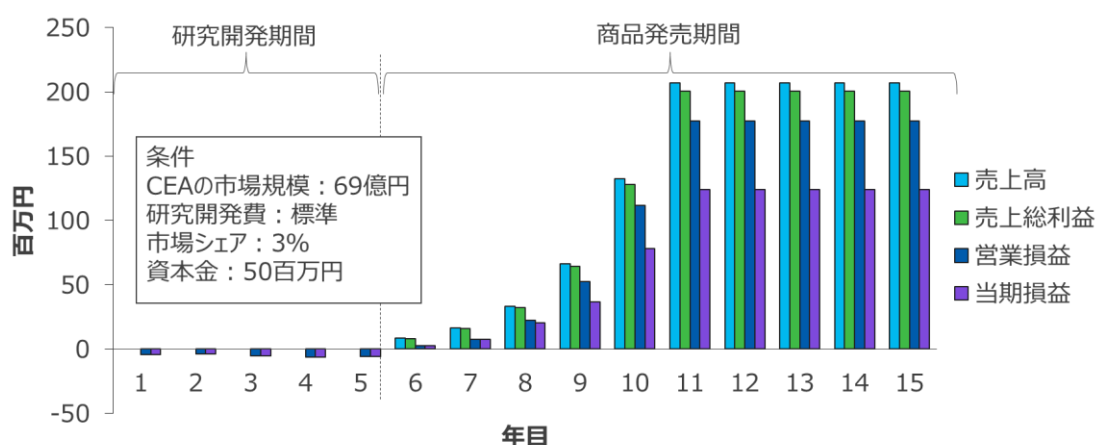


図 5.16 損益計算書(予測)(出所：筆者作成)

5.5.2. 貸借対照表(B/S)の予測

貸借対照表作成に必要な諸条件は以下の通りである。まず資本金は、事業開始 1 年目にシスメックス社から 50 百万円の資金を受け、独立した事業を開始したものと仮定した。売掛金、受取手形の回転期間は 3 か月とした(月商×3 か月)。棚卸資産(原材料、貯蔵品)の回転期間は消費期限の長さを考慮し、12 か月に設定した(売上原価(1 か月)×12 か月)。買

掛金の回転期間を1か月に設定した(売上原価(1か月)×1か月)。

図 5.17 には研究開発費用標準、市場シェア 3%の場合の貸借対照表(予測)を示した。この結果から決算時点での財産状況を把握することが可能となった。

本条件においては、純資産の部に関して、資本金が 50 百万円のため、純資産合計がマイナスとなることはないものの、5 年目までは研究開発費の影響で減少が続く。本条件で純資産の合計が 50 百万円以上(資本金以上)となるのは、事業開始 8 年目以降であることが予測された。なお、研究開発費が最大の場合は、現預金がマイナスとなる。そのため、適時シスメックス社より資金を得る必要がある。市場シェア 1%では 5 年目から 9 年目まで、3%の場合は 5 年目から 7 年目まで、5 および 10%の場合は 5 年目から 6 年目まで現預金がマイナスとなる。市場シェア 1%の場合は、資金ショートシナリオに基づき、4 年目にシスメックス社から追加で 15 百万円の資本金を受けるものとして試算した(イノベーション・ストラテジー研究成果書に詳細を記載)。

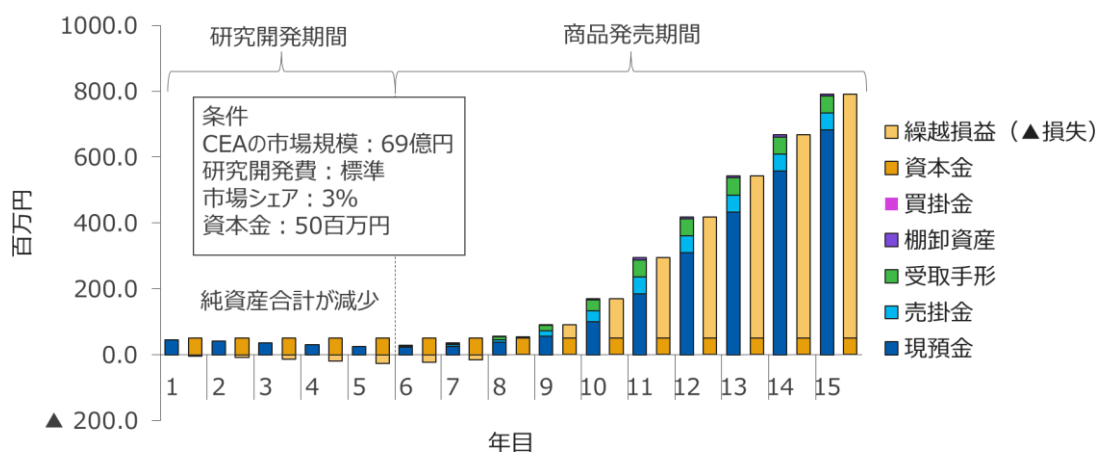


図 5.17 貸借対照表(予測)(出所：筆者作成)

5.5.3. キャッシュ・フロー計算書(C/S)の予測

続いて上記と同様の条件(市場シェア：3%、研究開発費：標準)でキャッシュ・フロー計算書(予測)を作成した(図 5.18)。継続価値の割引現在価値算出のため、16 年目の予測を含む。営業損益に対する税率は 30%とした。売掛金、受取手形、棚卸資産(原材料、貯蔵品)および買掛金の回転期間は貸借対照表と同条件とした。

本条件においては、営業 CF のマイナス分は商品発売後に縮小し、事業開始から 7 年目にプラスに転じると予想された。営業損益(営業利益)の増加により、キャッシュ・フローの改善が見込まれる。期末の現預金残高は研究開発期間中に減少し、商品発売後に増加する。本条件では、現預金残高が資本金の額を上回るのが 9 年目以降であることが試算された。なお、研究開発費が最大の場合は、期末現預金残高がマイナスとなる。そのため、適時シスメックス社より資金を得る必要がある。市場シェアが 1%の場合は 5 年目から 9 年目、市場シ

シェアが3%の場合、5年目から7年目、市場シェアが5%および10%の場合、5年目から6年目で期末の現預金残高がマイナスとなる予測である。資金ショートのスナリオに基づき、4年目にシスメックス社から追加で15百万円を資本金として受けるものとして試算した(イノベーション・ストラテジー研究成果書に詳細を記載)。

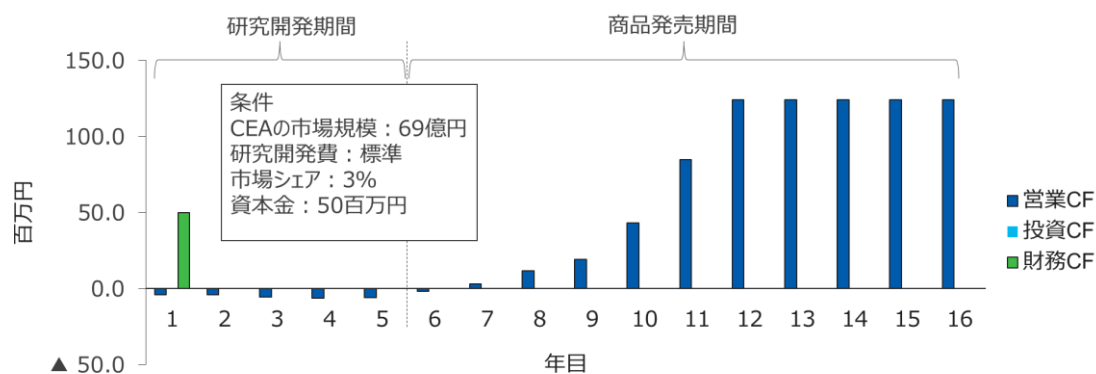


図 5.18 キャッシュ・フロー計算書(予測)(出所：筆者作成)

5.5.4. DCF 法による事業価値評価

DCF 法で事業価値を評価するために、キャッシュ・フロー計算書(予測)からフリーキャッシュ・フロー(FCF)を求めた。FCF は、営業 CF と投資 CF を通算することで算出した。今回の事業においては、追加の土地や建物・備品の取得は不要であるため 0 円としており、営業 CF と FCF は同値となる。

FCF から割引現在価値を算出するために必要な加重平均資本コスト(WACC(Weighted Average Cost of Capital))を算出した。WACC の算出のため、自己資本コスト(r_e)を式 1 から求めた。

$$r_e = r_f + r_p \times \beta$$

…式 1

例) 本事業の場合

$$r_e = 4\% + 5\% \times 1.07 = 9.35\%$$

r_f はリスクフリー・レートで10年物国債の平均利回りから4%とした。 r_p はマーケット・リスクプレミアムで、過去の市場実績データや、DCF 法の実務における一般的なレベルから5%と想定した。 β は日本市場における過去5年間のシスメックス社の個別銘柄の情報を参考に1.07と設定した。各値を代入した結果、9.35%と算出された。続いてWACCを式2より算出した。

$$WACC = \frac{E}{D+E} \times r_e + \frac{D}{D+E} \times r_d \times (1-T)$$

…式 2

例) 本事業の場合

$$WACC = \frac{1}{0+1} \times 9.35\% + \frac{0}{0+1} \times 5\% \times (1-30\%) = 9.35\%$$

ここで E は株主資本価値(株式時価総額)で、今回、実質無借金の資本構成とすることから 1 とした。D の有利子負債の時価については、シスメックス社がネットキャッシュ(純有利子負債がマイナス)であることも勘案して保守的に 0 とした。 r_d は有利子負債の利率で、銀行借入金利を 5.0%と推定した。T は法人税率でシスメックス社の有価証券報告書の情報を参考に 30%とした。それぞれの値を式に代入した結果、WACC は 9.35%と算出された。

次に、各年度における DF_t (Discount factor)は式 3 より算出した。

$$DF_t = \frac{1}{(1+r)^t}$$

…式 3

例) 事業開始 1 年目の場合

$$DF_1 = \frac{1}{(1+0.0935)^1} = 0.914$$

ここで r は WACC を示し、 t は研究開発スタートからの時間(年度)を表している。例に示す通り、事業開始 1 年目の場合、 DF_1 は 0.914 となる。

各年度における割引現在価値(PV_t)は式 4 より算出した。

$$PV_t = CF_t \times DF_t$$

…式 4

例) 事業開始 1 年目の場合

$$PV_1 = -4.1 \text{ 百万円} \times 0.914 = -3.7 \text{ 百万円}$$

ここで、 CF_t は事業スタート t 年目の FCF を表す。例には事業開始 1 年目の割引現在価値を示しており、-3.7 百万円と算出された。

本条件(市場シェア：3%、研究開発費：標準)における予測期間の FCF の割引現在価値の合計は 194.3 百万円と算出された(図 5.19)。図 5.20 に研究開発費用と市場シェアの全パターン別 DCF 法による事業価値算出結果を示す。

次に継続価値の割引現在価値を算出する。継続価値は予測期間以降に生み出される FCF の価値であり、式 5 より算出した。

$$\text{継続価値} = \frac{CF_{t+1}}{r - g}$$

…式 5

例) 市場シェア 3%、研究開発費用「標準」の場合

$$\text{継続価値} = \frac{124.2 \text{ 百万円}}{9.35\% - 0} = 1328.8 \text{ 百万円}$$

ここで、 CF_{t+1} は予測期間後 1 年目(16 年目)の FCF であり、124.2 百万円と算出された。
g はキャッシュ・フローの超長期での成長率を示し、0%とした。それぞれの値を代入した
結果、継続価値は 1328.8 百万円となった。

継続価値の割引現在価値は式 6 から計算した(図 5.19 および図 5.20)。

$$\text{継続価値の割引現在価値} = \text{継続価値} \times DF_{t+1}$$

…式 6

例) 市場シェア 3%、研究開発費用「標準」の場合

$$\text{継続価値の割引現在価値} = 1328.8 \text{ 百万円} \times 0.262 = 347.7 \text{ 百万円}$$

ここで DF_{t+1} は予測期間最終年度(15 年目末)時点での Discount factor であり、0.262 となる。従って、継続価値の割引現在価値は、347.7 百万円となる(図 5.19)。

DCF 法による事業価値は、1 年目から 15 年目までの FCF の割引現在価値の合計(194.3 百万円)と継続価値の割引現在価値(347.7 百万円)の合計であることから、542.0 万円と算出された。予測期間の割引現在価値よりも継続価値の現在価値の方が高い値を示した(図 5.20)。

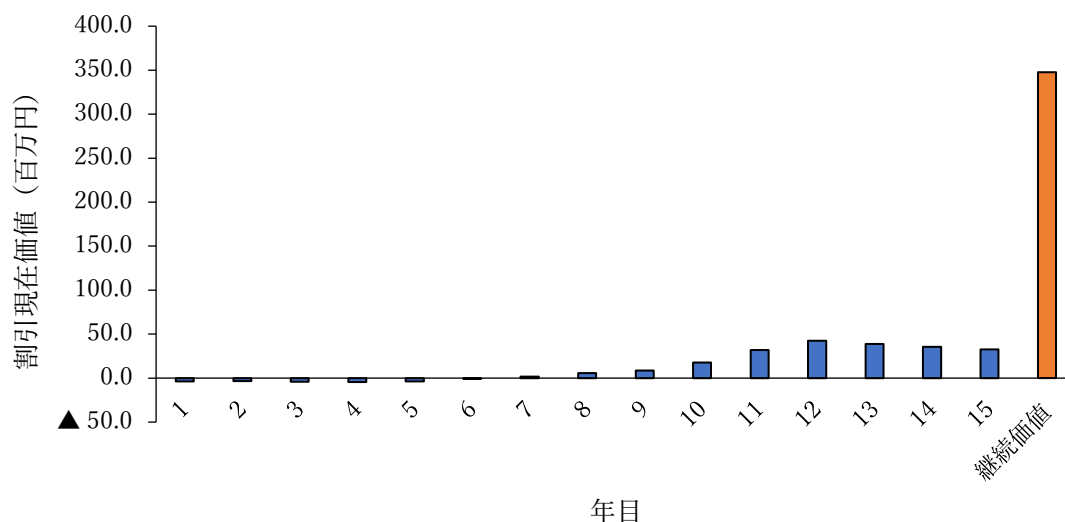


図 5.19 割引現在価値(予測)(出所：筆者作成)

市場シェア 3%、研究開発費標準の場合の割引現在価値を示した。予測期間の割引現在価値を青色で、継続価値の割引現在価値をオレンジ色で示した。数字は事業開始からの期間(年目)、継続価値は事業開始 16 年目以降で予測

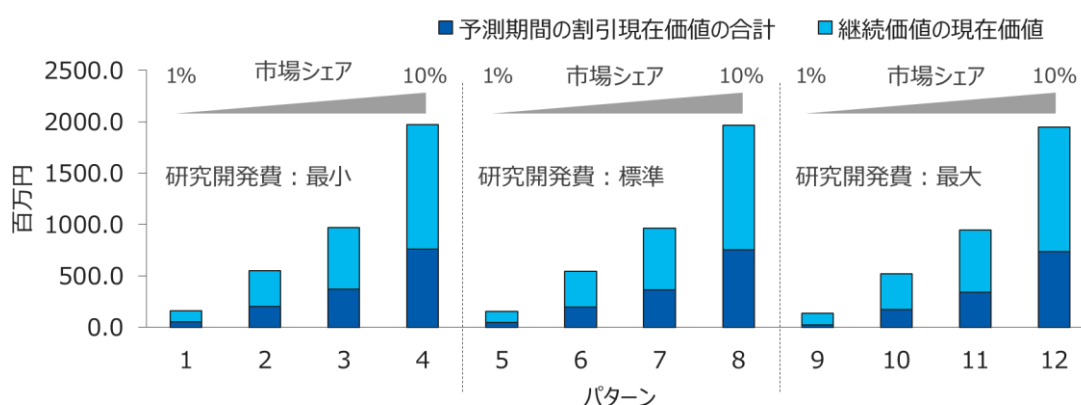


図 5.20 DCF 法による事業価値評価(出所：筆者作成)

予測期間の割引現在価値(A)と継続価値の割引現在価値(B)の合計(A+B)が DCF 法による事業価値である

図 5.20 では、研究開発費用が最小、標準、最大の 3 通り、市場シェアが 1%、3%、5%、10%の 4 通り、全組み合わせ 12 通りについて、DCF 法による事業価値算出結果を示した。上記までの計算の条件(市場シェア：3%、研究開発費：標準)はパターン 6 に該当する。DCF 法による事業価値は、予測期間の FCF の割引現在価値の合計(A)と 16 年目以降の継続価値の割引現在価値(B)の合計であり、A+B で表される。

図 5.20 の結果から DCF により算出された事業価値は、133.0 百万円から 1974.6 百万円

であり、全ての条件でプラスであった。ただし、研究開発費最大の場合、資金ショート为了避免のため、追加の資金を得る必要がある。獲得できる市場シェアによって事業価値に大きな差が生じることから、特に獲得できる市場シェアを正確に予測することが事業開始にあたって重要であることが示唆された。後述するリアルオプション理論に基づいた分析においてはオプション(柔軟性)を行使するタイミングが重要となる。例えば、別の事業の方が高い価値を創出する可能性がある場合は、本事業を戦略的に撤退する選択肢を考慮する必要がある。

12 通り全てで、継続価値の現在価値が、予測期間の割引現在価値の合計の値を上回っていた。DCF 法による事業価値はこれらの通算であることから、継続価値が事業価値に大きく寄与することを示しており、高い予測精度が求められる。

以上の DCF 法による事業価値の評価結果から、予測した 12 パターンの全てで事業価値がプラスとなる予測がなされた。事業成功の要件として、「研究開発費」、「獲得できる市場シェア」、「継続価値の現在価値」の予測の精密化が重要であることが示された。

5.5.5. 事業価値のリアルオプション理論に基づいた分析

免疫測定試薬の場合、商品化する確率が比較的低いことから、各研究開発フェーズの費用と成功確率を考慮して、事業推進をすることが求められる。免疫検査分野の商品化の困難性が高い一つの要因としては、各研究開発プロセスにおいて不確定要素が多く存在する点が挙げられる。従来の正味現在価値の評価理論は、不確実性に対応するための柔軟性が考慮されず、また既存プロジェクトとはリスクやリターンが異なる場合は、適切な価値評価が困難となる。このような将来が不確実なプロジェクトにおいて、企業が持つ経営の柔軟性はリアルオプションと呼ばれる[21]。企業が持つ柔軟性は権利であって義務ではない。企業が持つ柔軟性が、金融商品のオプション(コール・オプションやプット・オプション)と類似した性質を持つことから、柔軟性のことをフィナンシャル(金融)オプションと対応する形で、リアル(実物)オプションと呼ぶ[21]。リアルオプションは不確実性が有利に動く場合は柔軟性を行使する考え方であり、環境変化が大きく、それに対する柔軟性(選択肢、オプション)が高いほど、大きな威力を発揮する[21]。リアルオプション理論はこのような不確実性に対し、適切なタイミングで柔軟性を行使し、リスクに対応することができるか評価する。

そこで筆者は、リアルオプション理論に基づいた分析(以下、「リアルオプション分析」)を行い、不確実性に柔軟性を加味した事業価値の予測を試みた。まず、前述の通り、免疫測定試薬の開発プロセスを 3 段階に分け、それぞれの段階における成功／失敗確率をディシジョンツリーに取りまとめた。次にこれらの確率と各プロセスで生じる研究開発費用を掛け合わせた。研究開発が成功した場合は、フェーズⅢを成功とし、成功確率と DCF 法による事業価値と掛け合わせた数値を算出した。この作業をパターン 1 から 12 までの事業プランについて計算することで、各開発プロセスでの成功／失敗確率を考慮した事業価値評価を行った。なお、図 5.21 は研究開発費用が標準、市場シェアが 3%の条件の結果を提示して

いる。

ディシジョンツリー法を適用した結果を図 5.21 に示した。各フェーズにおける成功／失敗確率は以下のように計算した。フェーズⅠは、1 年目がサメ原料抗体の取得で成功確率 70%、2 年目がコンセプト検証で 80%としており、フェーズⅠの成功確率は 56%(70%×80%)、失敗確率は 44%(100%－56%)とした。3 年目のフェーズⅡは工程設計段階であり、フェーズⅡ単独の成功確率 90%で、フェーズⅠの成功確率と組み合わせると、フェーズⅠ－フェーズⅡの成功確率は 50%(56%×90%)、失敗確率は 6%(56%×10%)とした。フェーズⅢは 4 年目に開発終了試験を想定しており成功確率 80%、5 年目は成功確率 95%の薬事・特許申請の工程を予定している。フェーズⅢの単独の成功確率は 76%(80%×95%)、失敗確率は 24%(100%－76%)とした。フェーズⅠ－Ⅲまでの成功確率は 38% (56%×90%×76%) で、失敗確率は 12%(56%×90%×24%)とした。

上記の各割引現在価値と、成功／失敗確率を掛け合わせて計算した結果、本条件では期待値の合計が 198.9 百万円と算出された。さらに、フェーズⅠで失敗する確率が 4 種類のパターン(フェーズⅠ失敗、フェーズⅡ失敗、フェーズⅢ失敗、フェーズⅢ成功)の内最も高く 44%であった。フェーズⅡでは 6%、フェーズⅢでは 12%であった。フェーズⅠが商品開発で最も成功確率が低いことから、この段階での事業継続可否の判断が重要となる。

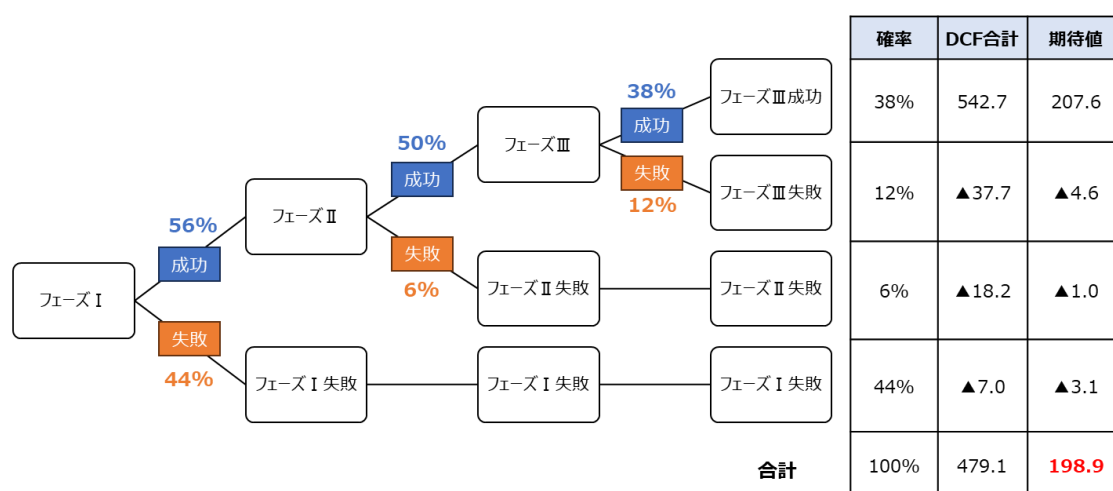


図 5.21 研究開発費用が「標準」、市場シェアが 3% の場合のディシジョンツリー(出所：筆者作成)

図 5.22 には、全 12 通り(研究開発費用 3 通り×市場シェア 4 通り)における期待値を示した。これらの結果、各条件における期待値の合計は、28.9 百万円から 750.7 百万円で、全てのパターンでプラスと評価された。DCF 法による事業価値評価の結果同様、獲得できる市場シェアによって期待値が大きく変化した。このことから、事業開始の早い段階で、獲得できる市場シェアの予測精度を高めることが重要である。

研究開発費最大のパターン 9、10、11 および 12 は、資金ショートを避けるため、研究開発期間に追加で資金を得る必要があることから、研究開発費用が「最大」を上回らない財務のマネジメントが重要で、特に、成功確率の低いフェーズⅠにおいて適切な事業継続の判断が要求される。期待値が、研究開発費用を上回る範囲であれば、高い確率で収益を上げることが可能であると予測される。

本論文においては、各フェーズで研究開発が失敗した場合、研究開発費用をマイナス分として記載しているが、実際には別事業に展開可能な原材料や知見が獲得される。例えば、フェーズⅠにおいて結合力の強い抗体が取得できなかった場合でも、自己抗体が抗原から分離する条件の見極めは測定対象が変わっても流用できる知見であり、研究開発費用のマイナス分を減少させる事業価値を生み出すことができる。またフェーズⅡの原材料の量産化で失敗したとしても、コンセプト検証まで完了した原材料が獲得されているため、例えば研究用途として利用されるアフィニティー精製カラムへの適用等、原材料自体の販売やライセンス交渉が可能である。フェーズⅢの開発終了試験で、既存の免疫測定試薬との相関性が取れない場合は、例えば、他の検査項目との組み合わせ試験を行い、新たな臨床有用性を示すことで、フェーズⅢまでに要した研究開発費用を一部補てんする事業価値を創出することができる。国内の薬事申請が承認されなかった場合でも、他の地域で承認される可能性があり、事業価値を生み出していると言える。いずれのフェーズで失敗したとしても、検査項目を CEA から TSH や HBsAg に変更する場合、CEA で得た知見により開発の加速化や成功確率の向上に寄与する。このように途中で研究開発が失敗となった場合でも、事業価値が創出されるため、各研究開発フェーズで適切なレビューを実施し、柔軟性を行使する際の判断材料になる成果の抽出と、それらの事業価値評価が求められる。

リアルオプション分析により、研究開発費用と獲得できる市場シェアを正確に予測することでより大きな事業価値を創出できる可能性が高まることが示された。さらに、研究開発段階で失敗したとしても、他の事業に有用な知見等が獲得でき、柔軟性を行使する際の重要な判断材料となるため、各フェーズにおいて適切な事業価値評価が必要となることが示された。

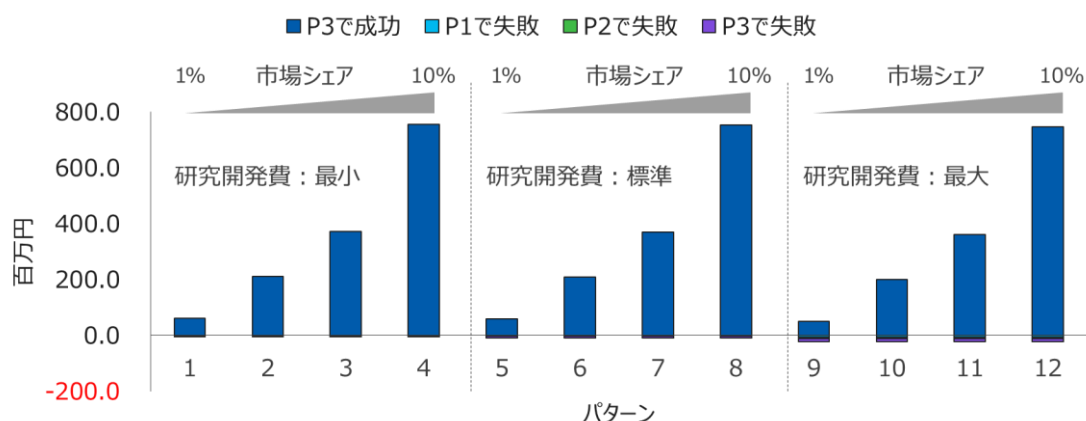


図 5.22 各フェーズにおける DCF 法による事業価値と研究開発費用(割引現在価値)(出所：筆者作成)

P1: フェーズ I (抗体樹立、コンセプト検証の工程)、P2: フェーズ II (量産化に向けた製造工程の設計)、P3: フェーズ III (開発終了試験、薬事・特許申請)

5.5.6. 財務戦略まとめ

免疫測定試薬の開発の不確性の高さと柔軟性を考慮して事業価値を評価するため、リアルオプション理論に基づいた分析(リアルオプション分析)を実施した。本成果書においては研究開発費用を 3 通り、獲得する市場シェアを 4 通り、合計 12 通りの場合で、まず DCF 法による事業価値評価を行った。その結果全てのプラスの事業価値が創出され、最大約 20 億円と分析された。またリアルオプション分析による結果でも、すべての検討条件でプラス評価となった。財務戦略の構築の要件として、事業開始の初期段階での、「研究開発費用」と「獲得できる市場シェア」、「継続価値」、「研究開発の各段階で創出される事業価値」の正確な予測が重要であることを見出した。これらの要件を満たし、適時柔軟性を行使することで事業の成功確率を上げることが可能である。

参考文献

1. Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of clinical investigation*, 39(7), 1157-1175.
2. Van Weemen, B., & Schuurs, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS letters*, 15(3), 232-236.
3. Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
4. Kricka, L. J., & Thorpe, G. H. (1983). Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry. A review. *Analyst*, 108(1292), 1274-1296.
5. 測定法の分類 (免疫測定法 基礎から先端まで、講談社 (2014)、小林典裕、上田宏、

三宅司郎、荒川秀俊、一部改変)

6. Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*, 256(5517), 495-497.
7. Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-12.
8. Spieker-Polet, H., Sethupathi, P., Yam, P. C., & Knight, K. L. (1995). Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9348-9352.
9. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.
10. Parmley, S. F., & Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73(2), 305-318.
11. Scott, J. K., & Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249(4967), 386-390.
12. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *nature*, 348(6301), 552-554.
13. Fleischman, J. B., Pain, R. H., & Porter, R. R. (1962). Reduction of gamma-globulins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 174-180.
14. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., & Salemme, F. R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243(4887), 85-88.
15. 清口 正夫、(2020) “2020 臨床検査市場 No.1 –イムノアッセイ市場–” 株式会社富士経済
16. 青柳 克己 (2020) 検体前処理法を用いた免疫測定法のポテンシャル、*生物試料分析*, 43(2)
17. Makabe, K., Nakanishi, T., Tsumoto, K., Tanaka, Y., Kondo, H., Umetsu, M., ... & Kumagai, I. (2008). Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1156-1166.
18. Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *nature*, 374(6518), 168-173.
19. 清口 正夫 (2020) 2 0 2 1 有力臨床検査企業戦略・業界トレンド分析、株式会社 富士経済
20. 菊地 弘幸、IVD イムノアッセイと注目 POC 検査市場 2022～新型コロナウイルスで激変する臨床検査・免疫血清検査にフォーカスト、(2022) 株式会社 富士経済

21. 今田潤一（2004）リアル・オプション、中央経済社

参考 URL

- ① Abcam、「RabMab®技術：その必要性、挑戦、ブレイクスルー」：
<https://www.abcam.co.jp/primary-antibodies/rabmab-technology-the-need-the-attempts-and-the-breakthrough-ja>
- ② 内閣府、「体外診断用医薬品から一般検査薬への転用（スイッチ OTC 化）の推進」：
<https://www8.cao.go.jp/kisei-kaikaku/kisei/meeting/wg/iryou/20200213/200213iryou02.pdf>
- ③ NEDO Web Magazine、「世界初、糖鎖の変化を測定して肝臓の線維化進行度を測定」：
<https://webmagazine.nedo.go.jp/practical-realization/articles/201504sugar-chain/index.html>
- ④ シスメックス株式会社、「シスメックスの技術」：
<https://www.sysmex.co.jp/rd/technologies/protein.html>
- ⑤ シスメックス株式会社、「バイオ診断薬拠点「テクノパークイーストサイトをオープン」～バイオ診断薬の原材料開発から診断薬開発、生産、物流の一貫体制により診断薬機能を強化～」：
<https://www.sysmex.co.jp/news/2019/190508f.html>
- ⑥ シスメックス株式会社、「よくあるご質問」：
https://www.sysmex.co.jp/faq/sales_support-services.html
- ⑦ アボット株式会社、「ALINITY」
<https://www.corelaboratory.abbott/int/ja/offerings/brands/alinity.html>
- ⑧ ロシュ株式会社、「cobas® infinity 検査室ソリューション」：
<https://diagnostics.roche.com/jp/ja/products/instruments/cobas-infinity-central-lab-ins-4113.html>
- ⑨ シスメックス株式会社、「製品・サービス 全自動免疫測定装置 HISCL™-5000」
<https://products.sysmex.co.jp/products/immunology/ST000911/index.html>
- ⑩ アボット株式会社、「全自動化学発光免疫測定装置 ARCHITECT®アナライザー i2000SR」：
<https://www.abbott.co.jp/our-products/architect-i2000sr.html>
- ⑪ ロシュ株式会社、「cobas® 6000 シリーズ」：
<https://diagnostics.roche.com/jp/ja/products/systems/cobas-6000-analyzer-series-sys-65.html>
- ⑫ H.U.フロンティア、「ルミパルス®シリーズ」：
<https://huf.co.jp/service/clinical/lumipulse.html>

第 6 章 結言

本研究では、次世代の医薬品(治療および診断用途)原料として注目される VNAR を対象とし、VNAR 取得プロセスの先端技術研究を行い、VNAR の社会実装に必須となる選別技術に関する技術の構築を目的とした。VNAR 取得技術は、これまで scFv や Fab など他のフォーマットに至適化されたファージディスプレイ法を適用しており、十分な検討が行われていなかった。ファージディスプレイ法は、大腸菌における発現バイアスにより、望まない抗体の濃縮が生じる。本研究における技術課題は、大腸菌における発現バイアスが生じた VNAR のライブラリの中から、所望の機能を有する VNAR を効率的に見分けることであった。

第 2 章では、多様な VNAR を取得するための新規の方法を提案した。バイオミメティクスของ考えに基づいて、VNAR の物理化学的特性と、サメの体内環境を考慮し、選択圧を検討したことで、低頻度ながらもパニング条件に特異的な抗体の選別が可能となった。各ライブラリ中の選択された VNAR の出現頻度は 0.1% 以下であり、選択圧と NGS の活用が必要性が示された。各条件でファージライブラリの濃縮過程の違いが明らかとなった。低温および予熱条件で、選択圧特異的に濃縮されたユニーククローンは僅かであったものの、抗原非特異的に濃縮する抗体クラスターは低頻度であった。一方高尿素条件、高塩濃度条件で、選択圧特異的に濃縮されたユニーククローンは、低温および予熱条件と比較して高頻度であったが、それらの大半は抗原非特異的に濃縮されたクローンであった。出現頻度と Fold change の解析を行うことで、全てのパニング条件において、選択圧特異的に濃縮されたユニーククローンの選別が可能であった。

第 3 章では、立体構造予測および、精製した VNAR の均一性の観点から、至適なコンストラクトを決定した。IgNAR は、他の宿主動物が産生する抗体と異なり、ヒンジ領域を持たない。C1 領域の一部を付加したコンストラクト(コンストラクト 1)は、付加しないコンストラクト(コンストラクト 2)と比べ、SDS-PAGE での均一性が顕著に低いことが示された。またコンストラクト 1 は AlphaFold2 による立体構造予測の結果、 α ヘリックス構造を形成する可能性が示唆されたことから、均一性を低下させる原因の一つと予測された。さらに C1 領域は IgNAR の形成(2 量体化)に寄与することから、不均一性を増加させる一因と考えられた。これらの結果から、VNAR を免疫測定試薬の原材料として利用するには、C1 領域を付加しないコンストラクト 2 が至適であることを明らかにした。

第 4 章では、大腸菌のバイアスにより、濃縮される VNAR(Z11)と、第 2 章に記載の方法で選別したクローン(L3-5、S3-1、H3-5)とを相互作用解析および熱安定性解析を行うことで物理化学的特性の比較を行った。選択圧特異的に濃縮された VNAR は、従来法で取得された抗体よりも反応性が同等以上で、かつ各選択圧に応じた物理化学的特性を示した。まず反応性に関しては、通常の ELISA 条件において、Z11 よりも、提案法で取得された VNAR は 1 倍から 16 倍の反応性の向上が見られた。VNAR は CDR2 が欠損しており、産業応用

されるマウス抗体などと比較し、親和性を向上させることが困難だが、提案法により通常法で取得された VNAR と同等以上の反応性を有する VNAR が取得可能であることが示された。次に、特殊条件での反応性を ELISA で評価した。選択圧で設定した、低温、予熱、高塩濃度、高尿素濃度の条件は、単独で検体中の自己抗体が解離し得る条件であるため、どの選択圧に対応した耐性であるかの評価が重要である。上記の ELISA 条件での評価の結果、低温条件および高塩濃度条件を変更し取得された抗体は、それらに対する耐性を示した。一方で、予熱条件で取得された抗体は、予熱条件に対しては耐性を示さず、 T_m 値の向上に寄与した。尿素条件では、クライテリアを満たすクローンが取得されなかったが、選別されたすべてのクローンが高濃度の尿素に対し耐性を示したことから、VNAR が元来持つ物理化学的特性であることが示唆された。これらの結果は、追加の候補抗体取得のための抗体取得方法の確立に向けて重要な知見である。

第 5 章では、先端技術研究を活かすイノベーションアイデアとして、IVD の免疫測定試薬の原料として、本研究で提案した方法で取得した抗体を適用することで、臨床検査技師が抱える、業務効率と臨床データの正確性に関する社会課題の解決を提示した。これらの課題の解決には、高親和性と高安定性を兼ね備えた結合分子が必要であり、技術戦略では、ユニークな変性条件でも結合性を維持するユニークな特性を持つサメ抗体を選別する技術を開発した。外部環境分析により、顧客 KBF が業務効率の改善と正確な臨床情報の提供に関連すること、顧客 KSF が 3 つのバリュー(オペレーショナルバリュー、クリニカルバリュー、マネジカルバリュー)であることを特定した。顧客 KSF とシスメックス社のケーパビリティを比較した結果、オペレーショナルバリューとクリニカルバリューは他者と同等以上の価値を提供できることから、これらに注力した商品開発の重要性が明らかとなった。さらに内部環境分析の結果、広範な販路、コンカレント・エンジニアリング、付加価値創出、原料開発から商品出荷まで一貫通貫で実施可能な施設がシスメックス社の強みとして抽出された。これらの情報をもとに SWOT 分析、クロス SWOT 分析を行った結果、差別化集中戦略が重要で、ケーパビリティの整った地域において、競争優位性の高い製品の提供が肝要であることが明らかとなった。さらに事業地域と検査項目を、それぞれ国内と CEA に絞ることを事業戦略の基本方針とした。知的財産戦略の方針としては、技術戦略で提示したサメ抗体の取得方法はノウハウとして秘匿し、取得されたサメ抗体を活用した免疫測定試薬は用途特許として出願することとした。財務戦略では、開発の不確実性を考慮するために、各研究開発工程の成功確率と費用、獲得する市場シェアを複数組み合わせるシミュレーションを行うことで、事業成功に必要な要件を抽出した。その結果、研究開発段階での「獲得できる市場シェア」「継続価値」「研究開発費」「各研究開発ステップにおいて創出された事業価値」を正確に予測することが必要であることを見出した。

研究業績

【本研究に関する発表論文】

Nakada-Masuta, T., Takeda, H., & Uchida, K. (2023). Novel Approach for Obtaining Variable Domain of New Antigen Receptor with Different Physicochemical Properties from Japanese Topeshark (*Hemitriakis japonica*). *Marine Drugs*, 21(11), 550.

※本研究は、AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業(助成金番号：JP23ae0121018)、JST START プロジェクト推進型 SBIR フェーズ 1 支援(助成金番号：JPMJST2162)、JST Peace & Science Innovation Ecosystem(PSI)(助成金番号：JPMJST2283)、JST スタートアップ支援プログラム(SCORE)(助成金番号：JPJ010717)、およびシスメックス株式会社から支援を受け、推進した。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多くの方々にご支援いただきました。本論文の作成に際し、大変お忙しい中、終始多大なご指導を賜った神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 内田和久特命教授に深謝致します。

先端研究の社会実装に向けて、技術戦略、知財戦略、事業戦略、財務戦略に関し、幅広くご指導を賜りました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 山本一彦教授に深謝致します。

本論文の副査をお引き受けいただき、大変貴重なご助言とご指導を賜りました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 吉田健一教授、石井純准教授に厚く御礼申し上げます。

先端研究の社会実装に向けて、技術戦略、知財戦略、事業戦略、財務戦略をイノベーション・ストラテジー研究成果書の執筆にあたり、様々な観点からご指導を賜りました神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 蔭山広明教授、尾崎弘之教授、福家信洋准教授、幸田徹客員教授に深謝致します。

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の博士課程後期課程での就学に際し、シスメックス株式会社 福田和也氏、福永淳氏、井出信幸氏、横瀬範子氏、前田真吾氏、夜久晃治氏には、日常業務に関し多大なご配慮・ご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

愛媛大学プロテオサイエンスセンター 竹田浩之准教授には、本研究を遂行するために必要な実験データ取得、結果の考察、論文執筆など、貴重なご助言とご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。内田研究室、竹田研究室の皆様には多くのご支援をいただきました。お礼申し上げます。

最後に、平日、休日に関わらず3年間研究活動に集中できるよう支え続けてくれた家族・友人に心より感謝します。特に、入学時に息子が生まれ、育児と業務で多忙を極める中、絶えず励まし続けてくれた妻に深謝致します。本当にありがとうございました。

神戸大学博士論文「迅速かつ高感度な免疫測定試薬開発に向けたサメ抗体取得技術の適用」全 104 項

提出日 2024 年 1 月 23 日

本博士論文が神戸大学期間リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日(公開日)はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

©升田 智史

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。

本論文に基づく学位審査にあたっては、以下の参考論文とともに審査された。

・イノベーション・ストラテジー研究成果書(本論文著者の作成物)