

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）  
「新興・再興感染症のリスク評価と危機管理機能の実装のための研究」  
分担研究報告書

新型コロナウイルスの迅速検査法に関する研究

研究分担者 梁 明秀（横浜市立大学大学院医学研究科微生物学）

研究要旨

新型コロナウイルスの感染拡大を制御するためには、臨床現場で即時かつ簡便に検査可能な抗原検査法の普及が重要である。既存の抗原検査キットには、SARSコロナウイルスに対するモノクローナル抗体が流用して用いられており、感度や特異度に関して、今後のウイルス変異に対して対応できなくなる等の懸念があった。そこで我々は、新型コロナウイルスにのみ反応し、SARSコロナウイルスを含む他のヒトコロナウイルスとの交差反応性を示さないモノクローナル抗体を樹立した。これらの抗体のエピトープを解析したところ、多数の臨床分離株の中で保存性が高い領域を認識しており、実際に、抗原性や伝搬性の増加が懸念されている501Y.V1-3変異株についてもプロトタイプ株と同等に検出可能であった。そして、これらの抗体を組み合わせるサンドイッチELISAを構築し、本抗体が臨床検体中のウイルス抗原の特異的な検出に有効であることを明らかにした。さらに、これらの抗体を複数の企業に導出し、既存の検査キットよりも、性能に優れたキットを実用化することに成功した。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の検査法のゴールドスタンダードはRT-PCR法を中心とした遺伝子検査法である。遺伝子検査法は感度・特異度共に優れるものの、検出機器が必要なことに加えて、検出までに時間がかかるといったデメリットがある。臨床現場で即時に診断が可能な検査法として、ウイルス抗原を検出する抗原検査法を原理とした簡易迅速検査キットが各社から上市されている。抗原検出キットの性能は、特定のウイルス抗原を正確かつ高感度に検出できる高品質のモノクローナル抗体に大きく依存することが知られている。しかしながら、これまでに市販されている検査キットのほとんどは、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）だけでなく、SARSコロナウイルス（SARS-CoV）にも反応する抗体が流用されていた。さらに、抗体の認識するエピトープ領域が十分に明示されていないものが多く、ウイルスの変異に伴って感度や特異度が低下するリスクをはらんでいた。そこで本研究では、新型コロナウイルスを特異的に検出するモノクローナル抗体を開発し、感度・特異度に優れた簡易迅速検出キットに応用することを目的とした。

B. 研究方法

新型コロナウイルスのヌクレオカプシドタンパク質（NP）の内、他のヒトコロナウイルスとの相溶性が高いN末端領域を欠損させたタンパク質（ $\Delta$ N-NP）をコムギ胚芽無細胞系により合成し、Niカラムにより精製した後、これを免疫源としてBALB/cマウスに注射した。免疫したマウスからリンパ球を回収し、ミエローマと融合させて144種類のハイブリドーマを作出した。作製したハイブリド-

マについて、一次スクリーニングとして、間接ELISA、AlphaScreen、OctetRed96による親和性測定により解析し、二次スクリーニングとして、ウエスタンプロット法により各ヒトコロナウイルスのNPとの交差反応性を解析し、SARS-CoV-2と特異的に反応するクローンを選択した。抗体のエピトープを、欠損変異体を用いたELISA法により解析し、ホモロジーモデリングにより構築したNPの立体構造を用いてその局在を調べた。また、各抗体について、OctetRED96により解離定数を算出するとともに、培養ウイルスの免疫染色および剖検例の免疫組織化学染色への適用性を調べた。加えて、種々の臨床分離株におけるエピトープ配列の保存性を調べるため、NCBIデータベースからゲノム配列を入手してアラインメントし、各部位におけるシャノンエントロピーを解析した。抗体の組み合わせを検討し、抗原検出サンドイッチELISAを構築した。そして、サンドイッチELISAの検出限界を算出するとともに、呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性の有無を調べた。さらに、COVID-19の行政検査の残検体（PCR陰性72件、陽性72件）を供して、ROC曲線解析を行い、感度・特異度を調べた。各抗体を企業に導出し、簡易抗原検出キットの実用化を試みた。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた研究は、横浜市立大学の倫理委員会の承認を得た上で実施した（IRB No. B20 0800106）。研究対象とした検体は、既に採取・保管された検体であるため、被験者への直接的な利益・不利益や危険は発生しない。また、検体は匿名化した上で使用・解析し、個人情報特定されない形とした。さらに、医学系研究に関する倫理指針ガイドライン第12 1 (3) ア (ウ) に則り、臨床研究の

実施にあたり、HP上で情報を公開し、被験者が拒否できる機会を保障した上で実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 新型コロナウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

まず、抗原タンパク質として、NPの内、他のヒトコロナウイルスとの相同性が高いN末端領域を欠損させたタンパク質 ( $\Delta$ N-NP) をコムギ無細胞タンパク質合成系により可溶性のタンパク質として大量に調製した。Ni カラムにより精製した後、これを免疫源として BALB/c マウスに注射した。

免疫したマウスからリンパ球を回収し、ミエローマと融合させて 144 種類のハイブリドーマを作出した (図 1A)。作製したハイブリドーマについて、一次スクリーニングとして、間接 ELISA、AlphaScreen、OctetRed96 による親和性測定により解析し、抗原との反応性と親和性の高い 12 クローンを選択した (図 1B)。そして、二次スクリーニングとして、ヒトコロナウイルスの NP タンパク質との交差反応性をウエスタンブロット法により解析し、SARS-CoV-2 とのみ反応する 3 つのクローン (#7, 9, 98) を選択した (図 1C、D)。

次に、SARS-CoV-2のNPの欠変異体を作製し、

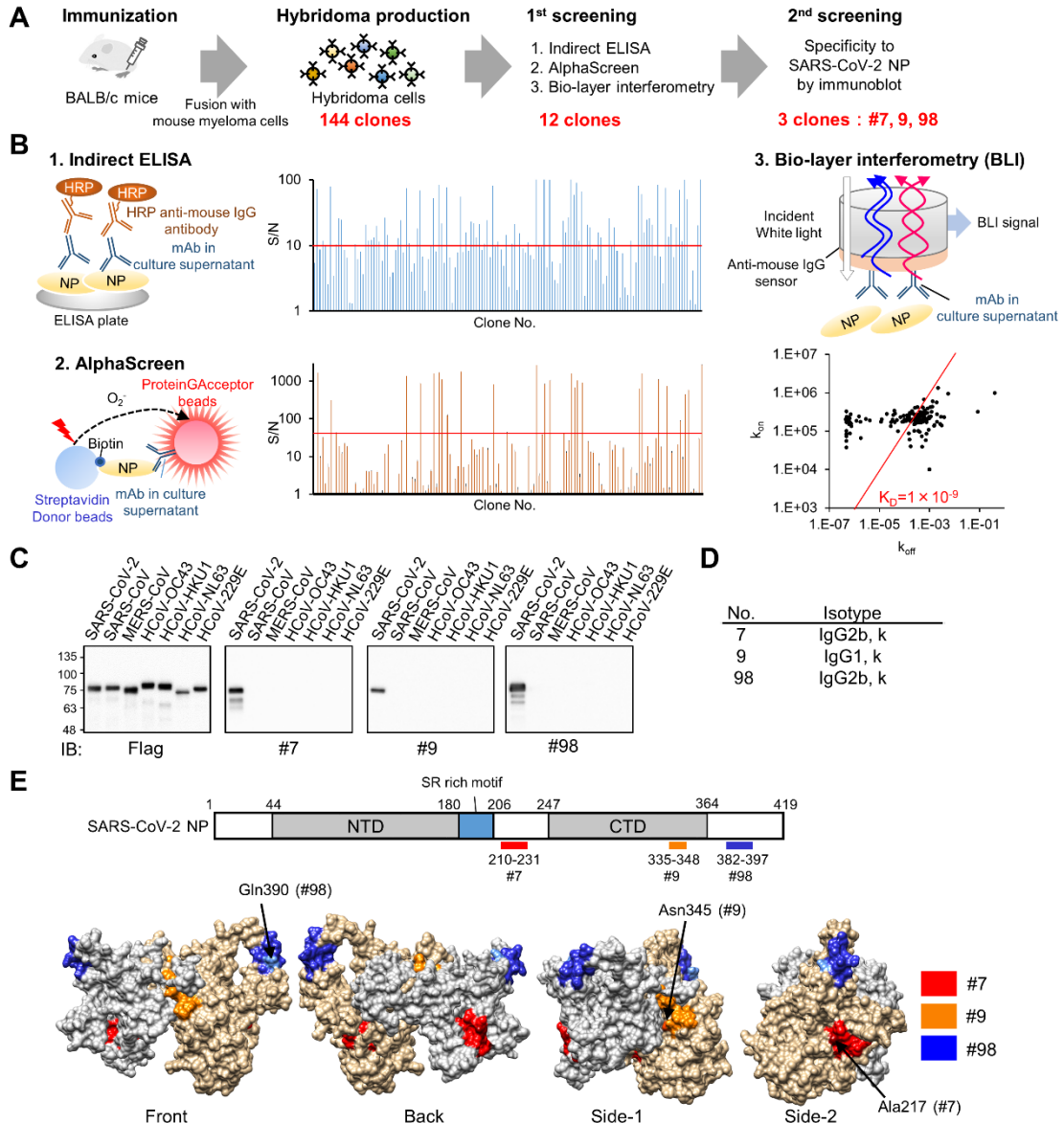


図 1 NP に対するモノクローナル抗体の作製

(A) モノクローナル抗体の作製の概要 (B) 間接 ELISA、AlphaScreen、Bio-layer interferometry (BLI) による抗体のスクリーニング。赤線はスクリーニングのカットオフラインを示す、ELISA : S/N=10、AlphaScreen : S/N=40、BLI : KD=1.0 × 10<sup>9</sup> (C) ウエスタンブロットによる抗体の特異性解析 (D) 選択した抗体のアイソタイプ (E) SARS-CoV-2-NP のドメイン構造と抗体のエピトープの模式図。NTD : N-terminal ドメイン、LKR : フレキシブルリンカー領域、CTD : C-terminal ドメイン。SARS-CoV-2 NP の部分構造 (PDB ID.6yun, 6m3m) を用いたホモロジーモデリングにより構築した、全長の二量体を形成する NP の立体構造モデルにおけるエピトープの位置。

間接ELISA法によるエピトープマッピングを行い、抗体の結合部位を解析した。その結果、今回開発した抗体は、NPの3つの異なる領域を認識し、#7は210-231aa、#9は335-348aa、#98は382-397aaに結合した(図1E)。

## 2. 抗体の性状解析

次に、選択した抗体についてNPとの解離定数(K<sub>d</sub>)をOctetRed96を用いて測定したところ、#7:  $4.4 \times 10^{-10}$ 、#9:  $3.7 \times 10^{-10}$ 、#98:  $1.6 \times 10^{-10}$ であり、いずれも抗原と高い親和性を示した(図2)。

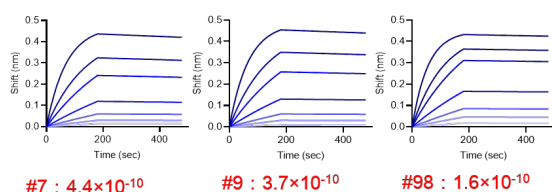


図2 各抗体の解離定数の測定

続いて、SARS-CoV-2を感染させたVero E6-TMPRSS2細胞を用いた免疫蛍光染色で、これらのmAbの適用性を検証したところ、#7と#98は、感染細胞のNP抗原を特異的に染色できた(図3A)。さらに、mAb #98は、COVID-19患者のパラフィン包埋肺組織を用いた免疫組織化学的解析により、感染細胞中のNP抗原を検出することができた(図3B)。

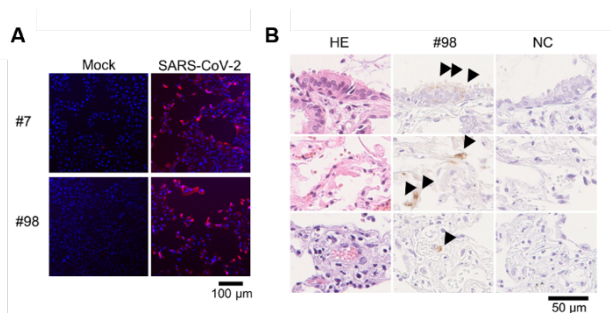


図3 抗体を用いた免疫染色/免疫組織化学染色によるウイルス抗原の検出

(A) VeroE6/TMPRSS2細胞にSARS-CoV-2に感染させ、各抗体(赤)およびDAPI(青)で免疫染色した。(B) COVID-19の症例から採取したパラフィン包埋肺生検標本を、抗体を用いて免疫組織化学染色した。気管支上皮細胞(上)、肺細胞(中)、内皮細胞(下)に陽性のシグナル(矢頭)が認められた。

## 3. 多様なSARS-CoV-2の分離株に対する抗体の反応性の予測

次に、種々の臨床分離株に対する抗体の反応性を予測するため、データベース上から約8,000のSARS-CoV-2のゲノム配列を入手し、NPの領域を抽出してアラインメントし、シャノンエントロピーにより各アミノ酸部位の保存性を調べた。その結果、各抗体が認識するエピトープ領域は変異が少なく、保存性が高い領域であった。加えて、抗原性や伝搬性の増加が懸念されている501Y.V1-3をはじめとする変異株においても、エピトープのアミノ酸配列は保存されていた(データ未掲載)。

## 4. 抗原検出サンドイッチELISAの開発

続いて、開発した抗体を組み合わせることで、NP抗原を検出可能なサンドイッチELISAを構築した。構築したELISAの検出限界を調べたところ、組換えNPタンパク質で3.2 pg/mL、培養ウイルスで $3.3 \times 10^4$  copies/mLであった。ヒトコロナウイルスや呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性を調べたところ、これらとは交差反応を示さず、SARS-CoV-2だけを特異的に検出可能であった(図4A)。一方で、501Y変異を有する3種類の変異株との反応性を調べたところ、構築したサンドイッチELISAで、いずれの変異株のウイルスも検出することが可能であった(図4B)。

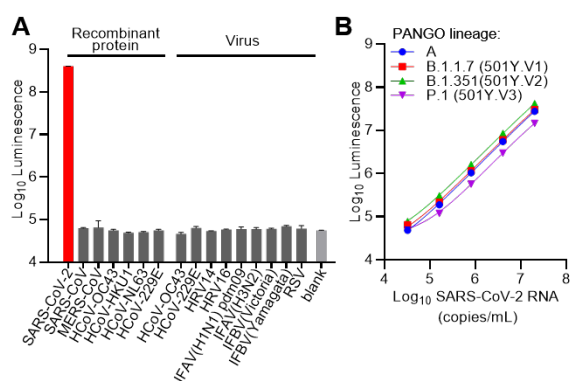


図4 開発した抗原検出サンドイッチELISAの特異性

(A) 各ヒトコロナウイルスの組換えNPタンパク質および、呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性 (B) 各変異株に対する反応性

次に、構築したELISAにCOVID-19の行政検査の残検体を供し、ROC曲線解析を行って感度・特異度を算出した。その結果、特異度は100.0%、感度は75.0%であった。また、各検体について、遺伝子検査法で測定された各Ct値での感度を調べたところ、Ct<28未満では100%、Ct:28-31では92.3%、Ct>31では32.0%であった。

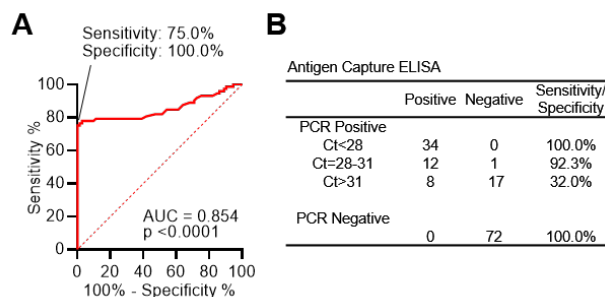


図5 開発した抗原検出サンドイッチELISAを用いた臨床検体の検出

(A) ROC曲線解析 (B) (B) RT-PCR法で判定された検体毎の感度・特異度

## 5. 抗体を用いた簡易迅速抗原検出キットの開発と実用化

最後に、これらの抗体を複数の企業に導出し、簡易迅速抗原検出キットの開発を試みた。これまで

に、複数の企業に抗体を提供し、可能性検討を実施している。この内、富士フイルムとキャノンメディカルシステムズ株式会社については、既存キットよりも優れた性能を示すキットが開発できており、PMDAによる体外診断薬としての承認が得られている。

[発明者] 梁 明秀、山岡 悠太郎、菊池 沙也香  
[出願日] 令和2年6月29日

#### D. 考察

これまでに市販されている抗原検出キットは、そのほとんどがSARS-CoV-2だけでなく、SARS-CoVにも反応する抗体が使用されている。本研究では、抗原検査法への活用を目的として、SARS-CoV-2だけを特異的に、かつ高い親和性で結合するモノクローナル抗体の開発に成功した。本抗体のエピトープはNPの立体構造において分子表面に存在していることから、変性処理等を行うことなく、ウイルス抗原の検出が可能であると考えられた。また、本抗体のエピトープは、現在懸念されている変異株を含む種々の臨床分離株で保存されている領域であり、多様なウイルス株に対して広範に反応を示すと推察された。

これらの抗体を用いた抗原検出サンドイッチELISAは、他のヒトコロナウイルスを含む呼吸器感染症を引き起こすウイルスと反応しない一方で、臨床検体中のウイルス抗原を高感度に検出可能であった。実際に、本抗体を用いることで、既存の抗原検査キットよりも性能に優れた検査キットの実用化に成功した。以上から、本抗体は、抗原検出キットの開発に有効な性能を示すと考えられた。

#### E. 結論

今回作製した抗体は、SARS-CoV-2を特異的にかつ高親和に結合し、種々の変異株に対する結合性も有していることから、信頼性の高い抗原検出キットの開発に有効である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamaoka Y, Miyakawa K, Jeremiah SS, Funabashi R, Okudela K, Kikuchi S, Katada J, Wada A, Takei T, Nishi M, Shimizu K, Oza wa H, Usuku S, Kawakami C, Tanaka N, Morita T, Hayashi H, Mitsui H, Suzuki K, Aizawa D, Yoshimura Y, Miyazaki T, Yamazaki E, Suzuki T, Kimura H, Shimizu H, Okabe N, Hasegawa H, Ryo A. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen for accurate diagnosis of COVID-19. *Cell Reports Medicine*. 2021 (Accepted).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特願2020-111984

[発明の名称] SARS-CoV-2に対する抗体、該抗体を用いてSARS-CoV-2を検出する方法および該抗体を含むキット

[出願者] 公立大学法人横浜市立大学、関東化学株式会社