

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

『迅速診断キットのための抗体作製』に関する研究

研究分担者 森田公一 長崎大学熱帯医学研究所

研究要旨

本研究では新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の抗原検出に活用する単クローン抗体を樹立して、イムノクロマト法による抗原検出迅速診断キットの実用化を目指した。SARS-CoV-2のN遺伝子をクローニングし、ヒトコロナウイルスに保存されている領域を除いたSARS-CoV-2 N Δ 121タンパク質を作製しマウスに免疫して多数の単クローン抗体を樹立した。この抗体の中からウイルス感染細胞に高い結合性を示すクローンを選び民間企業との協働でイムノクロマト抗原検出キットを試作した、試作したキットではヒトコロナウイルスとの交叉は認められず、感度は数十感染価の検体まで検出できた。本キットは令和3年1月に認可され市場に提供された。

A. 研究目的

COVID-19への対策においては、なによりも感染者の早期発見と隔離が重要であり、迅速診断法の実用化が望まれる。現在、PCR法が高感度・特異度にすぐれた方法として使われているが、これに加えて、安価・短時間で利便性の高い抗原検出キットの実用化とさらなる高感度化が望まれる。本研究では病原ウイルスであるSARS-CoV-2の抗原検出キット作製に資する単クローン抗体の樹立とキットの実用化を目的とした。

B. 研究方法

1. SARS-CoV-2をVero細胞で培養し、培養液中のウイルス粒子からNタンパク遺伝子のcDNA（ヒトコロナウイルスに近似している121残基領域を削除したもの）を作製し、発現ベクター、pQE-30に挿入した。（文科大臣承認実験）
2. 上記プラスミドを大腸菌(*E. Coli*. XL-1 Blue)に導入して発現させアフィニティクロマト法により当該タンパク質を精製した。
3. 精製したタンパク質をマウスに免疫（脾臓免疫と腸骨免疫）して、定法により単クローン抗

体を複数樹立し、ウイルス感染細胞への結合度等により力価の強い抗体を選出した。

4. 選出した単クローン抗体を持ちいて、イムノクロマト法による抗原検出キットを試作した。
5. キットはウイルス感染細胞上清、患者検体を用いて、感度、特異度を検証した。

（倫理面への配慮）

患者サンプルの利用については、長崎大学熱帯医学研究所倫理審査委員会の了承を得た。

C. 研究結果

1. 抗原の作製：アフィニティクロマトグラフで精製したSARS-CoV-2 N Δ 121タンパク質はポリアクリルアミドゲル電気泳動法で予想通りの位置（分子量33KDa）に確認された。
2. 上記抗原をマウスに免疫して、124個の単クローンを樹立した。そのうち、感染細胞等での力価判定により14個の単クローンを選出して抗体を精製した。高い力価をしめしたものは

すべて腸骨免疫から樹立されたクローンであった。

3. 精製した抗体を用いて抗原検出イムノクロマトキットを試作しもっとも検出感度の高い抗体の組み合わせをきめた。
4. 最適化されたキットについて、PCR陰性サンプル、鼻腔拭い液と鼻咽頭拭い液、それぞれ102検体で非特異反応について検証した結果、一致率は100%であった。
5. ヒト呼吸器系微生物（細菌15種、呼吸器系ウイルス20種、インフルエンザウイルス9種、マイコプラズマ4種）との交叉反応試験を実施した結果、交叉反応はみとめられなかった。
6. ヒト検体を用いて実施した感度・特異度は既存品と比較して、97.1%、98.2%であった。

D. 考察

今回の単クローン抗体の作製においては免疫方法により抗体の力価に大きな差異が生じた。この現象が抗原の特異性によるものかどうか検証することが今後の同様の研究の実施のために有用である。

さらに検出感度を高める手法が開発可能と考えられる。今後も感度を高めるための研究の継続が望まれる。

E. 結論

研究期間内に目的としたSARS-CoV-2のNタンパク質に対する力価の高い単クローン抗体を樹立することが出来た。またこの抗体を使って新型コロナウイルス用の抗原検出イムノクロマトキットが完成し、上市された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Thi Quynh Mai Le, Taichiro Takemura, Meng Ling Moi, Takeshi Nabeshima, Le Khanh Hang Nguyen, Vu Mai Phuong Hoang, Thi Hong Trang Ung, Thi Thanh Le, Vu Son Nguyen, Hong Quynh Anh Pham, Trtan Nhu Duong, Hai Tuan Nguyen, Duy Nghia Ngu, Cong Khanh Nguyen, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe, Duc Anh Dang, Severe Acute Respiratory Syndorome Coronavirus 2 Shedding by Travelers, Vietnam, 2020, Emerg Infect Dis; 26(7), 1624-1626, 2020.

Takeshi Nabeshima, Takahiro Takazono, Nobuyuki Ashizawa, Taiga Miyazaki, Shingo Inoue, Mya Myat Ngwe Tun, Koichi Izumikawa, Hiroshi Mukae, Meng Ling Moi, Kouichi Morita, COVID-19 cryptic transmission and genetic information blackouts: Need for effective surveillance policy to better understand disease burden. Lancet Reg Health West Pac, 7: 100104, 2021

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

単クローンに関する物質特許を申請予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他