

## 2. 公募研究 8)濃縮カセットとタンパク質断片相補アッセイを使った新規簡易検査技術の開発

研究代表者：谷村 明彦（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

研究分担者：根津 顕弘（北海道医療大学歯学部薬理学分野）

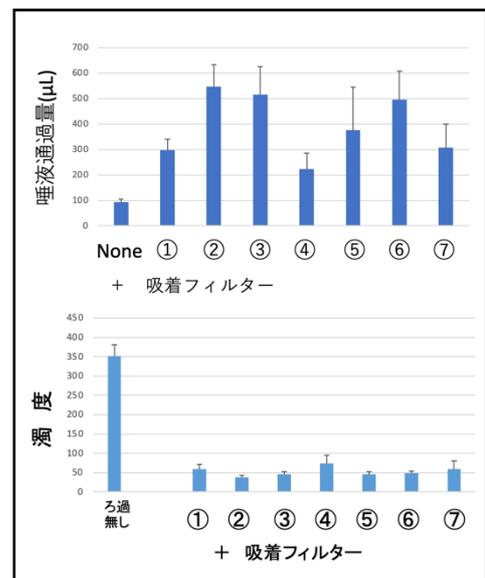
### 【背景と目的】

唾液を使ったPCR検査や定量抗原検査は、新型コロナウイルス感染症の診断において世界的に大きな役割を果たしている。しかし、一般のクリニックや個人での検査に使用される簡易抗原検査キットでは、唾液サンプルでは十分な検出感度を得るのが困難である。本研究では、唾液中のウイルスを簡単に濃縮するフィルターカセットとスプリット酵素を利用したタンパク質断片相補アッセイによる新しい検出方法を確立を目的とする。

### 【結果と考察】

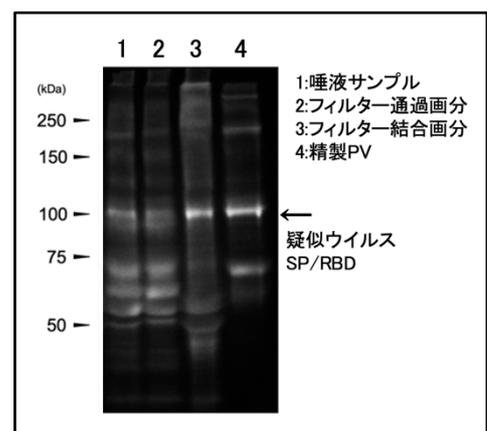
#### （1）唾液前処理法の開発

フィルターを使った唾液中の抗原濃縮のために、唾液中の不要成分を除去して目詰まりを起こさずに唾液を通過させるクリンナップ・フィルターとウイルスを捕捉する吸着フィルターで構成されるフィルター・システムを構築した。この実験では、7種類のクリンナップ・フィルター（不織布フィルター）と吸着フィルターを使い、唾液サンプルのフィルター透過性と透過したサンプルの濁度を調べた。右図（上）に示すように、クリンナップ・フィルター無しでは、100  $\mu$ L程度しか通らなかった唾液が、クリンナップ・フィルターの組み合わせによって300  $\mu$ L-500  $\mu$ L透過する事が明らかになった。また右図（下）に示すように、これらのフィルターを透過したサンプルの濁度を唾液原液と比較すると、10%程度に低下した。これらの結果から、クリンナップ・フィルター2と吸着フィルターの組合せによって、約500  $\mu$ Lの唾液をクリアアップできることが明らかになった。



#### （2）フィルター・システムによるウイルスの濃縮

このフィルター・システムを使ったウイルスの濃縮を確認するために、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質（SP/RBD）エンベロープを持つシュードタイプレンチウイルス（PV）を作成した。500  $\mu$ Lの唾液にPV（ $10^7$ コ）を加えた唾液サンプルを上記（1）のクリンナップ・フィルター②と吸着・フィルターを組み合わせたフィルター・システムを通過させた後、吸着フィルターに捕捉されたPVを100  $\mu$ LのSDS sample bufferで溶出させ、SDS-PAGEで分離後、抗SP/RBD抗体を使ったWestern blotでPVの吸着を調べた（右図）。その結果、フィルターを

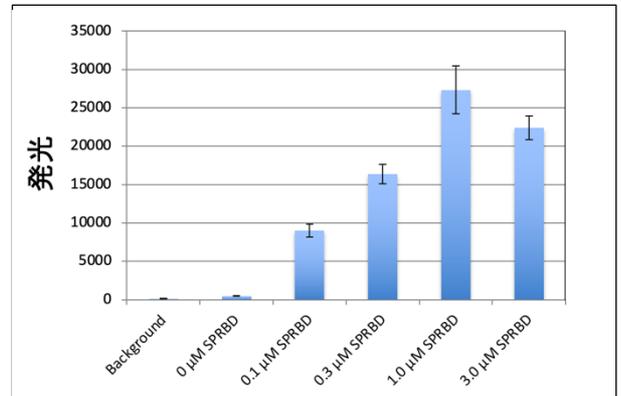


通す前の唾液中のPVIは、フィルターの通過によって減弱し、吸着フィルターからは、約5倍のシグナルが検出された。この結果からこのフィルターシステムを使って、唾液中のウイルスの濃縮が可能であることが確認された。

### (3) スプリット酵素を使った抗体センサーの開発

吸着フィルターに結合させたウイルスをイムノクロマト法を使わずに、直接的に検出する技術としてスプリット酵素を使った抗体センサー技術を開発した。

SP/RBDの異なる部位に結合する2種類のリコンビナント抗体 (single-chain variable fragment=scFv) を作成し、これらにスプリット酵素 (SE1 あるいは SE2) を結合させた新規発光センサー (抗 SP-SE1 と抗 SP-SE2) を作成した。抗 SP-SE1 を結合させた DYK ビーズに SP/RBD リコンビナントタンパク質 (0.1, 0.3, 1.0, 3.0  $\mu\text{M}$ ) 存在下と非存在下で抗 SP-SE2 を作用させ、複合体形成によって復元する酵素活性を発光で測定した結果を右図に示す。SP/LBD を添加せずに抗体ビーズに抗 SP-SE2 を作用させても酵素活性の復元は見られず、0.1~1.0  $\mu\text{M}$  の PS/RBD によって濃度依存的に発光が増大した。この実験系では、1.0  $\mu\text{M}$  の PS/RBD によって発光が約 50 倍に増大した。実験に用いた最低濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) の SP/RBD でも発光が約 20 倍に増大したことから、より低濃度の SP/RBD を検出できることが示唆された。この結果から、SE1 と SE2 を使ったスプリット酵素・抗体センサーが機能することが明らかになった。



### 【今後の展望】

本研究では、①簡便な唾液のクリンナップ・フィルター、②唾液中のウイルス濃縮技術、③スプリット酵素を使った新しい抗原検出技術の基本技術を開発した。今後、これらの新しい技術を唾液を使った既存の検査技術への応用や新規高感度簡易検査技術としての応用を試みる。

研究協力者

金久保千晶 (北海道医療大学歯学部小児歯科学分野)