

## 日本医療研究開発機構 ウイルス等感染症対策開発事業 事後評価報告書

研究開発課題名: 藻類由来レクチンによる濃縮と LAMP 法による迅速高感度 COVID-19 診断技術開発

研究開発実施期間: 令和 2 年 9 月 15 日～令和 3 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: 坂口 剛正

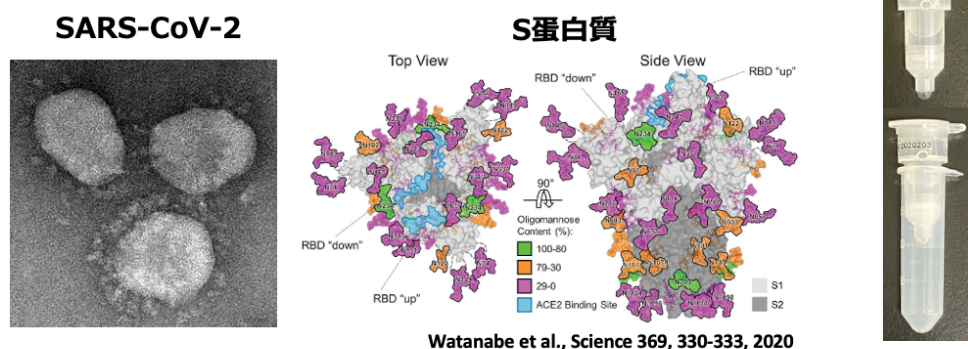
所属機関・部署・役職: 広島大学・大学院医系科学研究科・教授

### I 概要

高マンノース特異的結合レクチンを用いて唾液中の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を捕獲し濃縮する技術を確立することができた。

高マンノース型糖鎖は、N 結合型糖鎖の未成熟なものであると考えられ、病原体の糖タンパク質にしばしばみられる。SARS-CoV-2 だけでなく、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのスパイクタンパク質にもみられる。SARS-CoV-2 の S タンパク質に付加する高マンノース型糖鎖を利用して、ウイルスを濃縮・検出することを開発の目的とした(図)。

#### SARS-CoV-2は高マンノース型糖鎖をもっている(下図 緑の部位)



他に インフルエンザウイルス, HIV-1等にも高マンノース型糖鎖がある。

SARS-CoV-2 を含む唾液を、マイクロ遠心機を用いるレクチン・スピнкаラム(図)を通してウイルス粒子を結合させたのちに洗浄し、抽出/溶出液でウイルスゲノム RNA を溶出して LAMP 法で検出した。検出感度は、20 コピー/反応(10  $\mu$ l) で、従来の RNA 抽出 + RT-qPCR 法に匹敵する感度であり、検体を直接用いる Direct RT-qPCR 法よりも感度は優れていた。検査時間は、唾液前処理から LAMP 法での検出まで 59 分であり(合間のピペット操作などの時間は除く)、RNA 抽出 + RT-qPCR 法の 175 分、RNA 抽出 + LAMP 法の 92 分、Direct RT-qPCR 法の 140 分と比べて短く、短時間で診断できることが明らかになった。スピнкаラムを用いる場合には、実際に SARS-CoV-2 の迅速診断が可能であることを実証できた。社会実装のために、レクチンを結合させたチップカラムを作製し、プログラマブルピペッターを組み合わせた結合・洗浄・溶出システムを構築したが、溶液のチッ

プカラムの通過に問題が残っており、さらにカラムのマクロポア径の選択と送液速度および吸引・排出回数の最適化が必要である。

## II 個別事項

### 【唾液の前処理】

唾液を検体とする場合には、粘稠さを除去するために前処理が必要である。PBS で希釈した後、遠心分離、スプタザイム処理、市販の破碎用カラム等の使用を試みたところ、PBS 希釈/遠心法が最も適していることがわかった。スプタザイム処理ではもっとも粘調性を除去できるが、レクチンカラムへのウイルスの結合を阻害した。他の方法は、体積の減少などの不具合がみられた。

### 【レクチン選択】

12 種類のレクチンについて SARS-CoV-2 に対する中和能を測定し、はっきりと中和能のみられるレクチン 4 種類を選択した。中和能があれば結合すると考えた。また、5 種類についてはレクチンを固定化したカラムを用いて、SARS-CoV-2 が結合するかどうかを検討したところ、5 種類すべてのレクチンカラムで SARS-CoV-2 の結合を確認できたが、中和能とは必ずしも相関していなかった。カラムを用いた実験の結果を優先し、比較的低分子のレクチンで、以前から大量精製系が確立している 藍藻 *Oscillatoria agardhi* (OAA) 由来レクチンを選択し、当面のピペットチップ作製に用いることにした。

### 【SARS-CoV-2 を用いた濃縮】

健康人唾液中に SARS-CoV-2 を添加した模擬検体をレクチンカラムに通し、洗浄、抽出/溶出の後に、カラム通過液、洗浄液、抽出/溶出液、カラム残存物(最後の変性剤で溶出)の各液中のウイルスゲノム RNA を RT-qPCR 法で定量した。その結果、複数の実験において、80%~99%の回収率であることを確認した。

### 【インフルエンザウイルスを用いた濃縮と LAMP 法での実験】

レクチンカラムによる濃縮と LAMP 法を用いて、インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2) (香港型) を検出することができた。呼吸器症状を有する被検者について、SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスの同時濃縮が可能であると考えられた。

### 【社会実装に向けた取り組み】

マイクロ遠心機を用いないシステムとして、マイクロピペットのチップの先端にレクチンを結合させたチップカラムを作製し、プログラマブルピペッターを用いて、結合・洗浄・抽出/溶出を行うシステムを構築した。唾液は前処理を行っても、通過障害(目詰まり)が起こったので、これを回避するために、カラムのマクロポア径の選択と送液速度および吸引・排出回数の最適化が必要である。

Japan Agency for Medical Research and Development  
Development Project for Countermeasures against Infectious Diseases  
Post-evaluation report

Title: Development of Rapid and Highly Sensitive COVID-19 Diagnosis Technology Using Algae-derived Lectin Enrichment and LAMP Method

Research and development period: September 15, 2000 – March 31, 2021

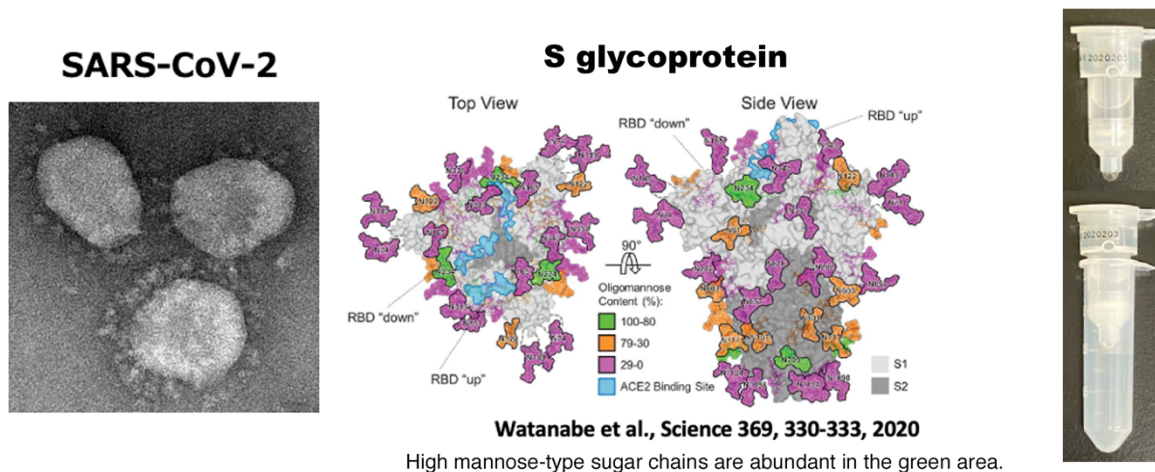
Principal Investigator: Takemasa Sakaguchi

Professor, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

### I Outline of Research and Development

We established a technique for capturing and concentrating a novel coronavirus (SARS-CoV-2) in saliva using a high-mannose-specific binding lectin.

High mannose-type glycans are considered immature N-linked glycans. They are often found in the glycoproteins of pathogens, not only in SARS-CoV-2 but also in the spike proteins of influenza virus and human immunodeficiency virus. High mannose-type glycans are added to the S protein of SARS-CoV-2. This study aimed to develop a method to enrich and detect the virus using high mannose-type glycans added to the S protein of SARS-CoV-2 (Figure).



Saliva containing SARS-CoV-2 was passed through a lectin spin column (Figure) followed by washing, and viral genomic RNA was eluted with extraction/elution solution and detected by the LAMP method. The detection sensitivity was 20 copies/reaction (10  $\mu$ l), comparable to that of the conventional RNA extraction + RT-qPCR method and superior to the Direct RT-qPCR method. The test time was 59 minutes from saliva pretreatment to detection by the LAMP method (excluding the time for pipette operation in between), which was shorter than 175 minutes for the RNA extraction + RT-qPCR method, 92 minutes for the RNA extraction + LAMP method, and 140 minutes for the Direct RT-qPCR method. Thus, we demonstrated that rapid diagnosis of SARS-CoV-2 is possible by using a spin column. For social implementation, we fabricated a lectin-bound chip column. We constructed a

binding, washing, and elution system combined with a programmable pipettor, but there is still a problem passing the solution through the chip column. It is further necessary to select the macropores of the column and optimize the pumping rate and the number of aspirations and discharges.

## II Individual items

### [Saliva pretreatment]

When using saliva as a specimen, pretreatment is necessary to remove viscosity; dilution with PBS and centrifugation, Sptazyme treatment (Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan), and commercial columns for disruption were tried. The PBS dilution/centrifugation method was found to be the most suitable. Sptazyme treatment removed the most viscosity but inhibited the binding of the virus to the lectin column. Other methods showed defects such as loss of volume.

### [Lectin selection]

We measured the neutralizing ability of 12 lectins against SARS-CoV-2. We selected four lectins that showed apparent neutralizing ability and considered that they would bind to SARS-CoV-2. We also examined whether SARS-CoV-2 binds to the five lectins using a lectin-immobilized column. We confirmed that SARS-CoV-2 binds to all five lectins in the lectin column, but the binding did not necessarily correlate with the neutralizing ability. To prioritize the results of the column-based experiments, we selected a lectin derived from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhi* (OAA). It is a relatively low-molecular-weight lectin and for which a mass purification system has been established. We thus decided to use it for the preparation of pipette tips.

### [Enrichment with SARS-CoV-2]

Mock specimens of SARS-CoV-2 added to healthy human saliva were passed through a lectin column. After washing and extraction/elution, viral genomic RNA in the liquid passing through the column, washing liquid, extraction/elution liquid, and column residue (eluted with the denaturant) was quantified by RT-qPCR. As a result, we confirmed that the recovery rate was 80% to 99% in several experiments.

### [Enrichment using influenza viruses and experiments with the LAMP method]

Using lectin column enrichment and LAMP method, we detected influenza virus A/Udorn/72(H3N2) (Hong Kong type). Simultaneous enrichment of SARS-CoV-2 and influenza virus was considered to be possible for subjects with respiratory symptoms.

### [Initiatives for social implementation]

As a system that does not use a microcentrifuge, a tip column with lectin bound to the tip of a micropipette was fabricated, and a programmable pipettor was used to perform binding, washing, and extraction/elution. Saliva caused passage obstruction (clogging) even after pretreatment. To avoid this, it is necessary to select the macropore diameter of the column and optimize the pumping rate and the number of aspirations and discharges.