

新型コロナウイルス抗原に対する超高感度検出と 17β -エスト
ジオールによる感染減少の解明

Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 and reduction of
infection by 17β -estradiol

2024 年 2 月

教誓 祐太

Yuta KYOSEI

新型コロナウイルス抗原に対する超高感度検出と 17β -エストラ
ジオールによる感染減少の解明

Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 and reduction of
infection by 17β -estradiol

2024 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

生命理工学専攻 物理生物学研究

教誓 祐太

Yuta KYOSEI

目次

目次	I
略称一覧.....	III
第 1 章本研究の背景と目的	1
1-1 研究背景.....	2
(1)新型コロナウイルスについて.....	2
(2)PCR 法による SARS-CoV-2 測定について	4
(3)COVID-19 の抗原検査について	5
(4)チオ NAD サイクリング ELISA の原理について	7
(5)新型コロナウイルスと性ホルモンについて.....	9
1-2 本研究の目的.....	11
第 2 章 SARS-CoV-2 リコンビナントタンパク質の測定.....	12
2-1 序論.....	13
2-2 材料と方法	14
(1)抗体.....	14
(2)抗原.....	14
(3)サイクリング試薬.....	14
(4)リコンビナントタンパク質によるチオ NAD サイクリング ELISA 法の開発	15
(5)JSTAT による統計解析.....	15
2-3 結果	16
(1)S1 タンパク質測定.....	16
(2)スクレオカプシドタンパク質測定.....	17
2-4 考察.....	18
第 3 章不活性化 SARS-CoV-2 を用いたチオ NAD サイクリング ELISA 測定	20
3-1 序論.....	21
3-2 材料と方法	22
(1)抗体.....	22
(2)抗原.....	22
(3)チオ NAD サイクリング ELISA 法について.....	22

(4)統計解析.....	23
3-3 結果.....	23
(1)S1 タンパク質検出抗体を用いた測定.....	23
(2)スクレオカプシドタンパク質検出抗体を用いた測定.....	24
3-4 考察.....	26
第4章 17β-エストラジオールによる新型コロナウイルス感染減少のメカニズム解明.....	30
4-1 序論.....	31
4-2 材料と方法.....	32
(1)細胞培養実験.....	32
(2)模擬 SARS-CoV-2.....	32
(3)模擬ウイルスの感染実験.....	32
(4)sACE2 ELISA kit による測定.....	33
(5)チオ NAD サイクリング ELISA 法による sACE2 添加模擬ウイルス測定.....	33
(6)統計解析.....	34
4-3 結果.....	34
(1)各エストラジオール濃度による VeroE6/TMPRSS2 細胞に対する蛍光強度の比較.....	34
(2)細胞培養液中 sACE2 の測定.....	35
(3)チオ NAD サイクリング ELISA による sACE2 添加模擬ウイルスの測定.....	37
4-4 考察.....	38
第5章 本研究の総括.....	42
付章.....	45
謝辞.....	49
参考文献.....	50

略称一覧

COVID-19 : Coronavirus Disease in 2019

SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

ACE2 : angiotensin-converting enzyme 2 (アンジオテンシン変換酵素 2)

ACE : angiotensin-converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素)

PCR : polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

RT-PCR : Realtime-Transfection Polymerase Chain Reaction

CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats

LOD : limit of detection (検出限界)

LOQ : limit of quantification (定量限界)

3 α -HSD : 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ)

A3P : 17 β -methoxy-5 β -androstan-3 α -ol 3-phosphate

ALP : Alkaline Phosphatase

BSA : Bovine Serum Albumin

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS : Fetal Bovine Serum

HRP : Horseradish peroxidase

3 α -HSD : 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase

NADH : Nicotinamide-Adenine Dinucleotide

Thio-NAD : Thionicotinamide-Adenine Dinucleotide

ALP : Alkane phosphatase

AngII : アンジオテンシンII

TMPRSS2 : Transmembrane protease serine 2

DMEM : ダルベッコ改変イーグル培地

第 1 章

本研究の背景と目的

1-1 研究背景

(1) 新型コロナウイルスについて

2019年12月に発見されてから現在に至るまで、新型コロナウイルス(COVID-19: coronavirus disease 2019)は感染の流行・拡大が広がっている。COVID-19の原因であるSARS-CoV-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)はそのゲノム配列からβ-コロナウイルス属のSARS関連コウモリウイルスであることが明らかになった[1]。この属に属するウイルスはプラス鎖の一本鎖RNAゲノムを持ち、王冠に似たエンベロープを持っていることが特徴である(図1-1)[2]。ウイルスの持つゲノムには、主要な構造タンパク質であるスパイクタンパク質、エンベロープタンパク質、膜タンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質の4つがコードされている[3]。

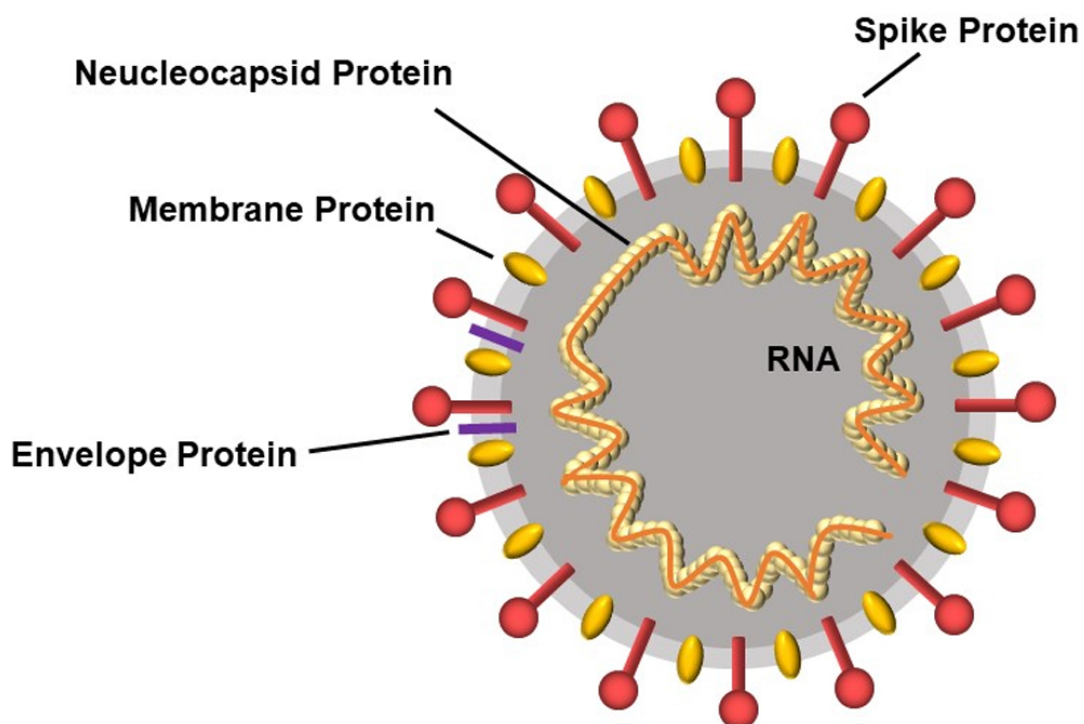


図 1-1 : 新型コロナウイルス概要図

(Kyosei Y, Yamura S, et al., Biophys Physicobiol. 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004.)[4]より CC-BY4.0 に基づき転載

ヌクレオカプシドタンパク質はRNAと相互作用し、螺旋状のヌクレオカプシド

を形成する。スパイクタンパク質は自身のもつ受容体ドメイン領域を用いて、感染時に主な受容体となる、ACE2 (アンジオテンシン変換酵素 2: angiotensin-converting enzyme 2) に結合する。SARS-CoV-2 は ACE2 を用いることで宿主細胞へ侵入が促されることになる[5]。したがって、スパイクタンパク質の受容体結合ドメインは COVID-19 の治療に関して重要な標的になる。例として、抗スパイクタンパク質抗体を用いたアッセイは、高力価の SARS-CoV-2 中和抗体を含んでいる血清のスパイクタンパク質のスクリーニングに使用される。この血清による測定は COVID-19 の重症患者に対しての治療に用いられる[6, 7]。

COVID-19 が出現して以降、多様かつ有用な診断方法が開発されてきた[8-10]。しかし、多くの研究者や研究機関、政府機関はリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を診断・検査に使用することが多く、COVID-19 の確定診断、すなわち「ゴールドスタンダード」としている[11-14]。その PCR 法を診断法として使用するには限界があると指摘する意見も一定数存在することから、胸部 CT と PCR 法を併用することが推奨される場合もある[15-18]。感染すると肺に異常が起こり、肺炎やその他の臓器にも異常をきたすため、胸部 CT によりの確に治療することができる。このことから胸部 CT による診断は重要な役割を果たすことができる。

ただし、胸部 CT 検査は専門性が高く、操作が難しい診断方法である。したがって、胸部 CT と PCR の併用ではなく、PCR を改良するアプローチが多く行われている[8-10, 12, 19]。例として挙げると、デジタル PCR や ddPCR などである。これらの手法は核酸に着目した手法になり、核酸を増幅させることで検出することが基本である。例に挙げたアプローチ以外にも様々あり、その一つとして核酸を増幅しない新規の方法の開発も行われている[20-22]。

PCR 以外の COVID-19 診断の一つとして、PCR 以外にも SARS-CoV-2 を構成するタンパク質を検出する抗原検査がある。抗原検査は診断方法の中でも安価かつ診断が簡便であることが知られている[23]。しかし、PCR 法と比較して測定対象に対する特異度は十分に高いものの、感度は一般的に悪いとされている[24]。この欠点は診断方法としては重要な問題点であり、改善が必要不可欠である。

生物物理学の観点からは、核酸とタンパク質の高感度・高特異度な測定の開発は、生物学と医学のあらゆる分野にとって非常に重要である。例えば、Kary Banks Mullis によって PCR が開発されて以来、生物学と医学の進歩は目覚ましいものがある[25]。また、PCR は核酸を増幅することができるため、少量の核酸でも検出

することができるが、タンパク質はそれ自体を増幅する方法がないため、微量のタンパク質では、測定することができない。しかし、生物のほとんどの場合、核酸ではなくタンパク質が機能していることに注目しなければならない。特に感染症や、特定の疾患などではタンパク質の働きによって体内環境に異常が生じる。しかし、これらのタンパク質は赤血球のような定常的に発現するタンパク質と比較して非常に微量な場合が多い。したがって、生物学や医学分野の発展には、微量タンパク質の正確で定量的な測定法を開発する必要がある。

(2)PCR 法による SARS-CoV-2 測定について

PCR 法の最大の強みはその検出限界 (Limit of Detection: LOD)の高さにある。核酸を増幅して測定することで最大、数 copies/assay もの高感度で測定が可能である[26]。これは SARS-CoV-2 の RNA 測定においても同様のことが言える[27]。しかし、PCR 法にも以下のような欠点が存在する[28]。1.非特異的増幅することがあり、偽陽性や偽陰性増幅が起こる可能性がある。この問題は様々な要因が存在するが、使用するプライマー、細菌・夾雑物によるコンタミネーションなどにより非特異的な核酸と交差反応を引き起こす。この反応によって偽陽性を引き起こしてしまうことがある。加えて、偽陰性は測定難易度と標的遺伝子の突然変異によって引き起こされる (図 1-2 a)。



図 1-2 : PCR 法の概要図

(Kyosei Y, Yamura S, et al., Biophys Physicobiol. 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004.) [4]より CC-BY4.0 に基づき転載

- (a)夾雑物などのコンタミネーションにより起こる非特異的増幅の概要図。
- (b)PCR 法の微量測定で考えられる偽陰性リスクを表した図。

2.測定対象のサンプル量の少なさも問題になる場合がある。標的核酸が少量のアッセイ量 (例えば、 μL 程度)に含まれる場合、PCR は標的核酸を検出することができる。しかし、通常、 μL のボリュームで実験操作を行うとき、標的核酸をサンプリングすることは難易度が高く、困難である。一方、 mL で標的核酸を得ることははるかに容易である (図 1-2 b)。さらに、3.結果を得るまでの時間がかかる、4.高感度での測定は高価である、5.PCR の操作中に使用する酵素が失活してしまう、などの問題がある。このような PCR 法の弱点により、SARS-CoV-2 のタンパク質に対する抗原検査の開発を進める要因の一つになっている。

(3)COVID-19 の抗原検査について

世界保健機関 (WHO)は 2020 年 4 月、「抗原検出迅速診断検査の性能と潜在的な診断的有用性に関する研究は大いに奨励されるが、患者ケアへの使用は推奨しない」と発表した [29]。これは、WHO の判断が抗原検査の主な弱点は感度が低く、偽陰性が多いということである。さらに、2020 年 5 月に Science 誌に掲載された論文では、コロナウイルスの抗原検査は検査の測定時間自体が短く安価だが、感度の低さから偽陰性のリスクがあるとしている[30]。これはインフルエンザウイルスの抗原検査と PCR 法との比較からも明らかである[31, 32]。

しかし、抗原検査の有用性は今のところ意見が分かれている。Schoy たちは SARS-CoV-2 に対するイムノクロマト検査は、PCR 法と比較して検出感度が低い (30.2%)ことを指摘しており、COVID-19 の診断・検査のために単独で使用することを推奨しないとされた[33]。Mak らも同様にイムノクロマト法と PCR 法を比較し、検出感度においてイムノクロマト法は PCR よりも 10^5 倍感度が低く、新型コロナウイルス感染者から得られた PCR 陽性の検体の 11.1%から 45.7%しか検出することができなかったと報告している[34]。これらの著者は抗原検査が PCR 法の補助的な役割しかこなせないと結論づけている。

その一方で、COVID-19 の診断検査の第一線に抗原検査を用いるべきだと主張するものも存在する。Mertens らは新型コロナウイルス抗原の検出にイムノクロマト法を用いて実験を行った結果、感度は 57.6%、特異度 99.5%、正確性は 82.6%を示した[35]。先ほどの論文と同様に感度は低いように見えるが、特異度は非常に高く、イムノクロマトによる測定時間は 15 分程度である。これらの結果から抗原検査は PCR 法を補完するものであることが示された。これ以上の感染拡大を防ぐためにも、SARS-CoV-2 感染に対する診断に抗原検査を同時に使用することが推奨されている[24]。

市販の迅速抗原検査の性能については、各国によって異なり、様々な報告がなされている[36-42]。これらの結果は全て抗原検査の感度 (70~100%)と高い特異度 (96~100%)を指しており、平均値においても同様の結果を得ることができたことを示している[23]。したがって、COVID-19 に対する抗原検査の特異性は非常に高く、有効な手段になり得る。また、WHO の緊急時使用リスト (EUL)によれば、2 種類の抗原検査で検出が可能であった： Abbott Rapid Diagnostics 社の Panbio COVID-19 Ag Rapid Test と SD BIOSENSOR 社の STANDARD Q COVID-19 Ag Test である[43, 44]。これらの抗原検査の感度は、EUL に掲載されていない抗原検査よりも少し良いものの、それほど高くないという意見も散見される[45-47]。

このように、基本的に抗原検査は感度が低く、特異度が高い。特異度の問題に関しては、日本で市販されている抗原検査に対する 2 つの論文に着目した[48]。1 つ目の論文では、PCR 法と化学発光酵素免疫測定法に基づく抗原検査を比較し、後者は感度 55.2%、特異度 99.6%であり、全体の一致率は 91.4%であったとしている[49]。彼らは、抗原検査の特異度が 99.6%と高い確率で検出できることから、抗原検査は、コロナウイルスによる入院患者のモニタリングに有用であると結論づけた。言い換えれば、偽陽性の確率は非常に低いと言える。しかし、また別の論文では、この抗原検査は偽陽性を示す可能性があるとして注目されている[50]。日本の厚生労働省は、抗原検査が陽性の場合、PCR を行わずに COVID-19 を確定診断することを認めている[51]。したがって、偽陽性を起こしやすい抗原検査を日本で使用することは、SARS-CoV-2 に感染していない偽陽性患者が院内感染の危険にさらされる状況を生み出す可能性があるとして警告している[50]。つまり、入院患者に対する抗原検査の使用は危険であることを示している。

PCR と同様に抗原検査でも SARS-CoV-2 の測定に対する新規の技術開発が進んでいる。蛍光免疫クロマト抗原検査を用いた研究では、1 週間以内に症状を呈した患者に対して、感度 93.9%、特異度 100%を示し[52]、分子生物学的手法へのアクセスが限られている状況において、この抗原検査法が重要なツールとなることを示した。別の免疫クロマトによる蛍光抗原検査測定を行った研究では、感度と特異度に関して良好なデータが得られており [53]、感度は 75.6%、特異度は 100%であった。これらの結果は、蛍光免疫クロマト抗原検査が感染の初期段階における COVID-19 の診断に有用である可能性を示唆している。さらに、ナノザイムと酵素化学発光免疫測定法をラテラルフローストリップで統合した迅速検出システムがある[54]。他のほとんどの検査がヌクレオカプシドタン

タンパク質を用いているのに対して、この抗原検査はスパイクタンパク質を標的としている。スパイクタンパク質は新型コロナウイルスに対して特異的なタンパク質である。そのため COVID-19 の検査に対して非常に有効なタンパク質である。しかし、その特異性の高さから変異株の多い新型コロナウイルスでは各変異株のスパイクタンパク質に対する検査法が必要になるデメリットが存在する。このシステムは、SARS-CoV-2 抗原検出のための高感度 POCT (point-of-care testing) を使ったアプローチである。

(4)チオ NAD サイクリング ELISA の原理について

抗原検査はタンパク質を検出する。PCR 法により増幅できる核酸とは異なり、タンパク質はそれ自体を増幅できない [24]。したがって、本手法は微量のタンパク質の検出可能なシグナルを増幅するものである (図 1-3)。微量なタンパク質の定量的検出は、標的タンパク質に特異的な 2 つの異なる抗体を用いたサンドイッチ ELISA によって構築されている。ELISA 法は、簡便、迅速、特異的、高感度な検出法であるため、医療における診断ツールや、様々な産業における品質管理チェックに広く用いることができる[55]。

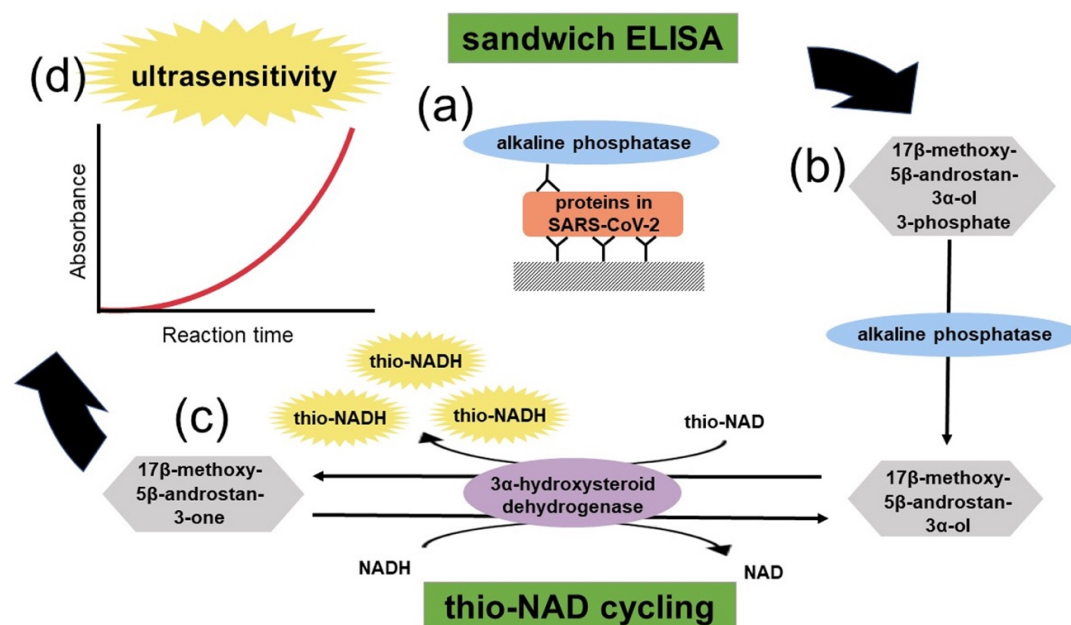


図 1-3 : チオ NAD サイクリング ELISA 法概要図

(Kyosei Y, Yamura S, et al., Biophys Physicobiol. 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004.) [4]より CC-BY4.0 に基づき転載

ELISA 法において、2 種類の抗体はそれぞれ、固相抗体、検出抗体とする。固相抗体は ELISA プレートの固相に定着することで抗原を取得するのに使用される。検出抗体は基質と反応する酵素を連結して使用される。例として、標準酵素としてアルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase : ALP)を用いると、リン酸化された基質を脱リン酸化することができる。この基質の変化は検出可能なシグナルとして生じる。このシグナルは他の基質による変化を加えない限り、時間経過とともに直線的に変化するため。直線的な変化ではタンパク 1 個に対してシグナルが 1 上がることと同義であるため、タンパク質量が多量でない測定できず、高い検出感度にするには非常に難しい。

そこで、高い検出感度をタンパク質測定法で実現するため、サンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法という 2 つの別々に存在する手法を組み合わせた (図 1-3)。酵素サイクリング法は酵素機能が連続的に反応する。その結果、基質が増幅される手法である[56, 57]。この手法では、一般的に 2 つの異なる酵素反応系を用い、各酵素が独立かつ協調的に同じ基質に対して作用する。しかし、本手法では ELISA に ALP を用いるため、酵素の数を減らし、1 つの酵素のみを用いて作用させた。

本手法で使用される循環酵素は 3α -HSD (3α -hydroxysteroid dehydrogenase)である[58]。このサイクリング反応では、過剰量の NADH (Nicotinamide-Adenine Dinucleotide)とチオ NAD (Thionicotinamide-Adenine Dinucleotide)は 3α -HSD の補酵素としてサイクリング反応を促進する[59]。すなわち、サイクルの各ターンにおいて、 3α -HSD は、チオ-NAD を補酵素として 3-ケトステロイドに酸化される。逆反応では、3-ケトステロイドは NADH を補酵素として 3α -HSD により 3α -ヒドロキシステロイドに還元される。

チオ NAD はチオ-NADH に還元されるが、これは、サイクリング中に発生する他の補酵素 (吸光度極大はすべて 340 nm 以下)の干渉を受けずに、400 nm、例えば市販のマイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度の増加によって直接測定することができる。この方法は現在、チオ NAD サイクリングと呼ばれている。これらの特徴により、チオ-NADH の累積量を測定することで、 3α -ヒドロキシステロイドの量を高感度で測定することが可能となる。しかし、酵素サイクリング法で得られる検出可能なシグナルも時間経過によって直線的な変化を生じる。

この 2 つの時間経過によって直線的なシグナルを取得できる手法を組み合わせることにした (図 1-3)。本手法によって ALP を直接測定すると、 10^{-20} モルもの

オーダーで検出できる。この高感度な検出システムを「チオ NAD サイクリング ELISA 法」と呼ぶ[20, 60]。

最近行われた実験では、チオ NAD サイクリング ELISA 法に最も適した一次基質は 17 β -メトキシ-5 β -アンドロスタン-3 α -オール 3-リン酸 (A3P)であり、405 nm で発生したシグナルは 660 nm のシグナルに対して正規化された[21]。この高感度な測定法は、比較的安価なマイクロプレートリーダー以外には最小限の装置しか必要としないため、ほとんどの研究室で実施可能である

本手法の測定限界を確認するため、Iha らは先行研究で標識酵素である ALP のみを添加し、サイクリングとの反応性を検討する実験を行った[61]。各濃度に調整した ALP を添加した各ウェルに酵素サイクリング試薬を添加することで、ALP の個数に対するサイクリングの反応を検討した。この実験により、チオ NAD サイクリング ELISA の検出限界の数値を確定することができる。この先行研究の結果から ALP のみの測定では 10^{-21} moles/assay まで検出できることがわかった。従って、ウイルスなどのタンパク質を測定する場合、この 10^{-21} moles/assay に近い値がチオ NAD サイクリング ELISA 法の検出感度としての限界値になることがこの結果からわかる。

(5) 新型コロナウイルスと性ホルモンについて

SARS-CoV-2 がヒトの細胞に感染する際、ウイルスエンベロープ上のスパイクタンパク質が宿主細胞上の ACE2 に結合する。ACE2 はアンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme : ACE) の同族体であり、レニン-アンジオテンシン系で重要な調整機能を果たす。レニン-アンジオテンシン系においてアンジオテンシン II (AngII) から Ang1-7 ペプチドに分離でき、心臓の保護、血管拡張などの役割がある (図 1-4)。SARS-CoV-2 感染時はこの ACE2 の作用が停止し、アンジオテンシン II からアンジオテンシン 1-7 (Ang1-7) の合成量が減少するため、アンジオテンシン II によって、アンジオテンシン 1 受容体 (AT1R) が活性化され血圧上昇など血管に対するダメージが増える。この結果、自然免疫によるサイトカインストームが発生すると考えられている。スパイクタンパク質は、宿主細胞上のセリンプロテアーゼ 2 膜貫通タンパク質 (TMPRSS2) によって活性化され、ウイルス粒子の内在化を可能にする[62]。その後、ウイルス RNA は宿主細胞質内に放出され、そこから宿主リボソームへと移動し、他の細胞に感染するための新しいウイルス粒子を産生する。

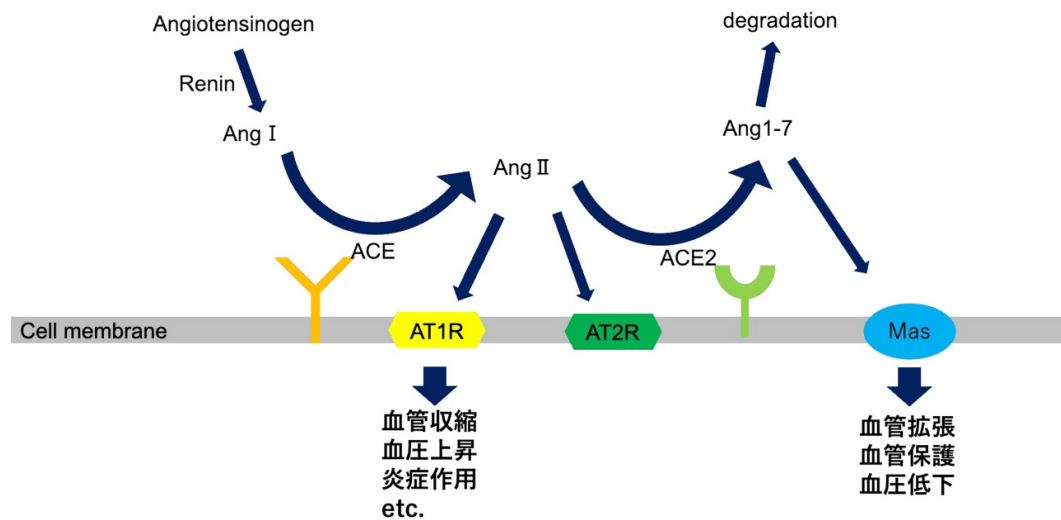


図 1-4：レニン-アンジオテンシン系概要図

ACE・ACE2によるレニンからアンジオテンシンを生成する経路の概要図。

COVID-19 は男女で感染の程度と重症度が異なり、女性は男性よりも感染しにくく、重症度も低い[63]。米国での詳細な調査によると、人種別では男性のCOVID-19 死亡率が女性より高く、黒人男性の死亡率が全人種性グループの中で最も高いことが示された[64]。この差の要因としては、食事、肥満、喫煙者数によって異なるいくつかの可能性がある[65]。これ以外の重要な要因として、免疫反応の強さにおける性差が挙げられる。感染に対する免疫反応は、男性よりも女性の方が強い傾向がある[66]。免疫反応の違いを説明するために X 染色体に注目した研究もある[67, 68]。X 染色体上に位置する重要な自然免疫遺伝子（例えば、Toll 様受容体 7 (TLR7) 遺伝子の発現が高いため、女性は樹状細胞においてより多くの抗ウイルスタンパク質とインターフェロンを合成することができ、その結果、重症の SARS-CoV-2 ウイルス性疾患を予防することができるより強固な免疫系を獲得することができる。

性ホルモンの違いも指摘されている。例えば、女性で多く発現している女性ホルモンのエストラジオールは、その作用機序はよくわかっていないが、SARS-CoV-2 感染の予防に重要な役割を果たしていると考えられている。Lemes たちは、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞由来の VeroE6 細胞を 17β-エストラジオールで処理すると、SARS-CoV-2 感染のウイルス量が減少することを示した[69]。しかし、SARS-CoV-2 の感染減少がなぜ起こるのか、その機序は明らかにされていない。

1-2 本研究の目的

COVID-19 は 2020 年初頭から現在に至るまで感染規模を拡大していき猛威を振るっている。感染拡大していく中、COVID-19 に対する高感度な抗原検査法は多く研究されている。しかし、測定法は現在でも PCR 法などの核酸測定が主流であり、検査・診断に使用されている。抗原測定法は、これらの手法と高感度な検出法と比較しても感度不足であると言える。加えて、COVID-19 感染患者の中で男女による感染度の違いが報告されており、特に女性においては有意に感染率・重症率が低いことがわかっている。これは SARS-CoV-2 感染の男女差は性ホルモンが関係していると言われていたが新型コロナウイルス感染にどのように影響して差が生まれているのかわかっていない。

したがって本研究では新型コロナウイルスに対する超高感度な抗原測定法の確立および 17 β -エストラジオールを用いた SARS-CoV-2 感染抑制の機序解明を目的とした。

本研究の目的を達成するため、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質とヌクレオカプシドタンパク質に着目した。各タンパク質のリコンビナントタンパク質および不活性化 SARS-CoV-2 を超高感度な抗原検出法である、チオ NAD サイクリング ELISA 法で測定を行い、確立に必要な検出限界・定量限界の算出・解析を行なった (2 章および 3 章)。また性別による SARS-CoV-2 の感染差を調べるためヒト TMPRSS2 を発現した VeroE6 細胞 (VeroE6/TMPRSS2) と女性ホルモンである 17 β -エストラジオールと SARS-CoV-2 を模した模擬ウイルスを用いて細胞への感染実験を行い、SARS-CoV-2 感染時の感染減少メカニズムの解明を試みた (4 章)。

第2章

SARS-CoV-2 リコンビナントタンパク質の測定

2-1 序論

新型コロナウイルスにはスパイクタンパク質、ヌクレオカプシドタンパク質、エンベロープタンパク質、メンブレンタンパク質の主要なタンパク質が 4 つ存在する。その中でもスパイクタンパク質とヌクレオカプシドタンパク質は感染のバイオマーカーとして広く使用されており、新型コロナウイルスに対する抗原検査でもこの 2 つのタンパク質が使用されている。しかし、現状の抗原検査では測定感度が高くないため、高感度化が望まれている。

現在、新型コロナウイルスの測定では RNA・タンパク質どちらにおいもヌクレオカプシドタンパク質を使用することが一般的である。ヌクレオカプシドタンパク質を使用する理由として、まず使用難易度が低いことが挙げられる。ヌクレオカプシドはウイルスの RNA の近くに存在し、抽出がしやすいタンパク質である。そのため測定の際に容易に採取が可能なタンパク質であると言える。次に変異が起きづらいタンパク質であるとされている点である。RNA の近くに存在することから変異株でヌクレオカプシド自体の変異はほとんどなく、PCR 法においては同様の配列を持つプライマーを使用しても測定することが可能であることが知られている。そのため、変異の起きやすい新型コロナウイルスにおいても等しく測定することが可能であり、検査においては有効なタンパク質であることがわかる。しかし、これらのメリットは同時にデメリットにもなる場合がある。確かにヌクレオカプシドタンパク質は測定に適したタンパク質であるが、変異株との差別化が難しい。これは通常株に感染したのか変異株に感染したのか区別することができず、同じ病棟で療養する場合、別株に感染するリスクが増加してしまうことなどが想定される。

そこで、もう一つ着目したのがスパイクタンパク質である。スパイクタンパク質は新型コロナウイルスに対して非常に特異性の高いタンパクであり、変異株においても変異の多いタンパクであることから感染した株を特定することが可能である。しかし、変異が多いということから測定難易度が高く、ヌクレオカプシドタンパク質ほど使用されない。このスパイクタンパク質のうち、測定対象として、ACE2 との結合部位である RBD (receptor binding domain : RBD) をもつ S1 領域を使用することにした。

本研究では、それぞれ特徴を持ったスパイクタンパク質 (S1 タンパク質) とヌクレオカプシドタンパク質の 2 種類のタンパク質に着目し、チオ NAD サイクリング ELISA によって測定を行った。また、本手法の感度がどの程度であるのか評価するため、得られたデータから検量線を作成し、検出限界および定量限界を算出することで評価を行った。

2-2 材料と方法

(1)抗体

チオ NAD サイクリング ELISA はサンドイッチ ELISA 法と同様に 2 種類の抗体を用いた。それぞれ抗原を捕捉する 1 次抗体と基質が標識された 2 次抗体として使用した。本研究では、S1 タンパク質及びヌクレオカプシドタンパク質の 2 種それぞれに対して特異的な抗体を使用するため計 4 種類の抗体を使用した。

- ・ S1 タンパクに対する抗体

S1 タンパク質に対する抗体はどちらもハカレル社から提供されたものを使用 (1 次抗体 : A1-1C7、2 次抗体 : A2-7G6)。

- ・ ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体

ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体は Meridian 社の抗体を使用 (1 次抗体 : Cat. No.9548、2 次抗体 : Cat. No.9547)。

(2)抗原

S1 タンパク

GenScript 社 (ヒト細胞由来、78.3kDa、Cat #Z03501)

ヌクレオカプシドタンパク質

East Coast Bio 社 (大腸菌由来、48kDa、Cat #LA600)

(3)サイクリング試薬

本研究で使用したチオ NAD サイクリング ELISA 法では 2 次抗体に標識された ALP とサイクリング試薬の反応によって、引き起こされる。このサイクリング試薬は 100 mM Tris-HCl (pH9.0) に 1.0 mM NADH、1.0 mM NADH (Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide, disodium salt; #10107735001 および #N1161-10VL ; Roche) , 2.0 mM thio-NAD (Thionicotinamide-Adenine Dinucleotide ,Oxidized Form; #306-51003;オリエンタル酵母), 0.4 mM A3P (北海道医療大学の吉村先生より提供)、および 10 U/mL 3 α -HSD (#T-58 ;旭化成ファーマ) を溶解させたものである。

(4)リコンビナントタンパク質によるチオ NAD サイクリング ELISA

法の開発

本研究では新型コロナウイルスに対する測定法として、チオ NAD サイクリング ELISA 法を用いて、ヌクレオカプシドタンパク質および S1 タンパク質の測定を行った。測定手順は以下の通りを行う。

1. 96 ウェルプレートに炭酸バッファーで 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した 1 次抗体を 100 μL 添加し、室温 1 時間静置で反応させる。
2. 96 ウェルプレートを 0.05% Tween20 含有バッファーで 3 回繰り返し洗浄を行う。
3. 1 次抗体をコートしたプレートに 1% BSA (牛血清アルブミン)/TBS バッファーを各ウェル 300 μL 添加し、ブロッキングを行う。室温 1 時間静置し反応させた。
4. 反応後に、96 ウェルプレートを 0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
5. ブロッキングしたプレートに 0.1% BSA/TBS で希釈したリコンビナントタンパク質 (1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL)を各ウェルに 100 μL ずつ添加する。添加後室温で 1 時間振とうを行う。
6. 反応後、0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
7. 抗原まで反応をさせたプレートに 0.1% BSA+0.02% Tween20 を TBS に含んだバッファーによって 2 次抗体を 100 ng/mL に調整し、各ウェルに 100 μL 添加し、室温で 1 時間振とうさせる。
8. 反応後、0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
9. 最適条件に調整したサイクリング試薬を各ウェルに 100 μL 添加する。
10. サイクリング試薬添加後、マイクロプレートリーダーを 37°C に調整し、60 分の間、5 分おきに吸光度の測定を行う。このとき、405 nm の吸光度で測定を行い、660 nm の吸光度によって正規化した。

(5)JSTAT による統計解析

本研究では 100 μL を 1 assay として定義し、実験で得られた測定データは平均値 $\pm\text{SD}$ (標準偏差: standard deviation) で表記した。有意差は FreeJSTAT Version 22.0E を用いて決定し、 $p<0.05$ を有意とみなした。

LOD は、サンプルの入っていないブランクの 3 倍 SD から推定した。LOQ はブ

ランクの 10 倍 SD を用いて推定した。変動係数(CV)はそれぞれ、アッセイ内再現性 (intra-assayCV)およびアッセイ間再現性 (inter-assayCV)をそれぞれ求めた。

2-3 結果

(1)S1 タンパク質測定

チオ NAD サイクリング ELISA 法を用いて SARS-CoV-2 のリコンビナント S1 タンパク質に対する測定を行った。3 人の実験者によって測定を行い、得られた結果から検量線を作成した。複数人の異なる実験者によって測定結果を示すことで、チオ NAD サイクリング ELISA 法による測定では実験者による手技の違いが反映されない正確性を示すとともに、どの実験者においても同等の検出感度を算出できる実現性を持つかの評価を行うことができる。これらの結果を作成した検量線から、LOD および LOQ を算出し、その結果からチオ NAD サイクリング ELISA の評価をした。

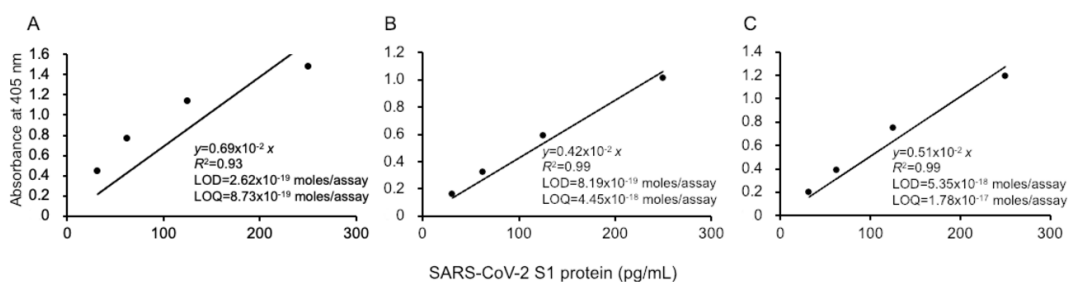


図 2-1：リコンビナント S1 タンパク質を使用した測定結果

(Kyosei Y, Namba M, et al., *Microorganisms*. 2021 Oct 25;9(11):2214. doi: 10.3390/microorganisms9112214.) [70]より CC-BY4.0 に基づき転載

すべての実験者で検出限界が 10^{-18} moles/assay を超えており、非常に高感度な結果を得ることができた。特に 1 人目の結果では、 10^{-19} moles/assay もの検出限界であり、濃度に変換すると約 200 fg/mL もの微量なタンパク質での測定が可能なが示唆された。また、変動係数は intra-assay では、1000 pg/mL で 0.7% を示した。加えて、inter-assay では、1000 pg/mL において 15% 以下を示した。これらの変動係数から正確性および再現性を保証する測定であることを示す結果となった。

(2)ヌクレオカプシドタンパク質測定

S1 タンパク質と同様にヌクレオカプシドタンパク質でも 3 人の実験者によって検量線を作成し、LOD および LOQ の算出を行った(図 2-2)。

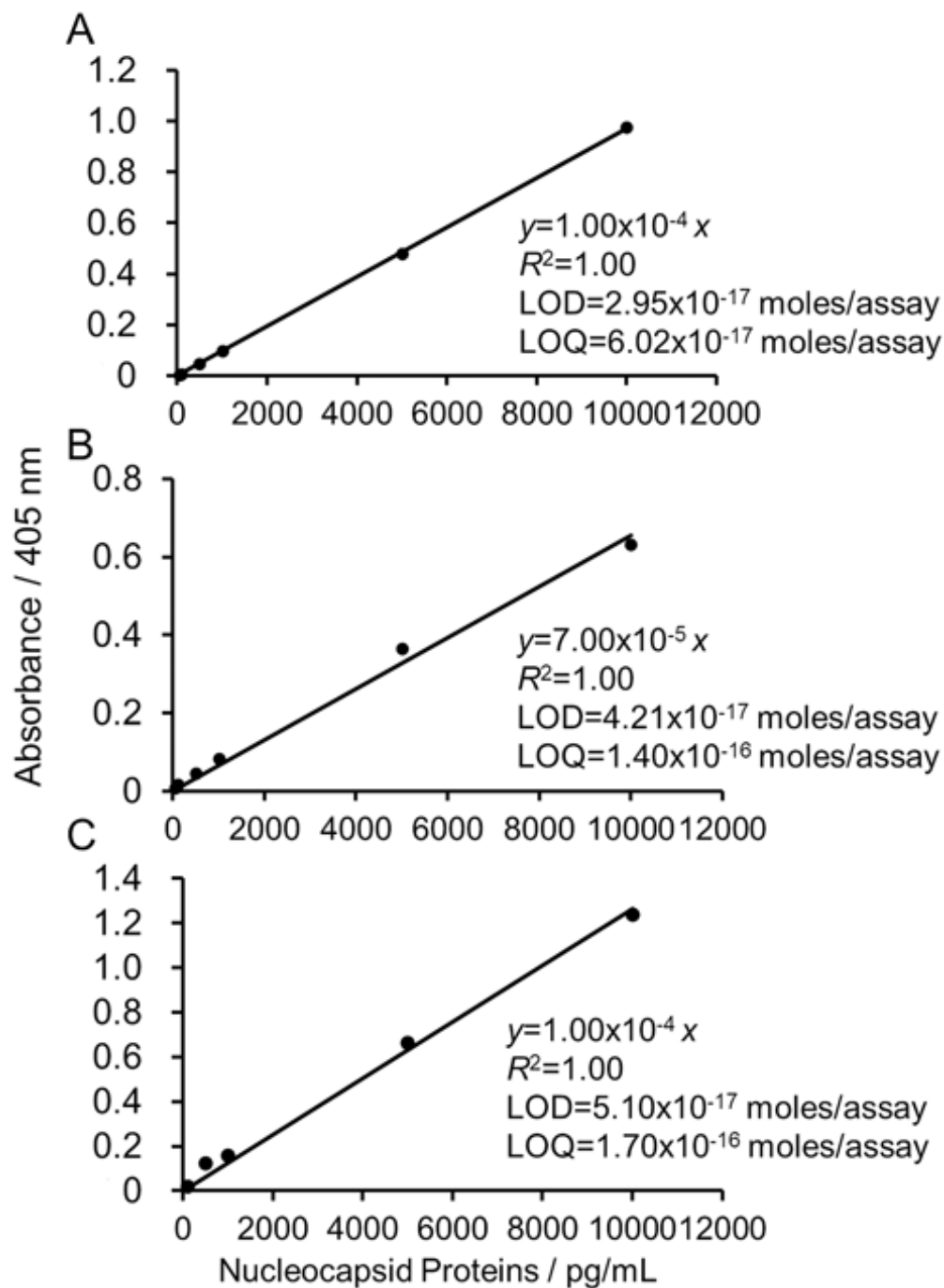


図 2-2：リコンビナントヌクレオカプシドタンパク質を用いた測定結果

(Kyosei Y, Namba M, et al., Biol Pharm Bull. 2021 Sep 1;44(9):1332-1336. doi: 10.1248/bpb.b21-00387. Epub 2021 Jun 19.) [71]より引用

図の結果から、どの実験者においてもブランクの標準偏差から算出した LOD は 10^{-17} moles/assay となり、S1 タンパク質と同様に高感度であることが示唆された。

2-4 考察

本研究の結果から、リコンビナントタンパク質を用いて新型コロナウイルスの S1 タンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質に対して最適なチオ NAD サイクリング ELISA の開発を行った。S1 タンパク質の測定では検量線から算出した検出限界が 10^{-19} moles/assay であり、ヌクレオカプシドタンパク質では 10^{-17} moles/assay であり超高感度な測定法であることが示唆された。

S1 タンパク質のチオ NAD サイクリング ELISA 測定は他の抗体での測定も行っている。この先行研究では、固相抗体および検出抗体がそれぞれ本研究結果で用いられたものとは異なる。この結果は、実験者は一人で行なったものであるが、本研究と同様に検量線から、検出限界および定量限界の算出を行った(図 2-3)。

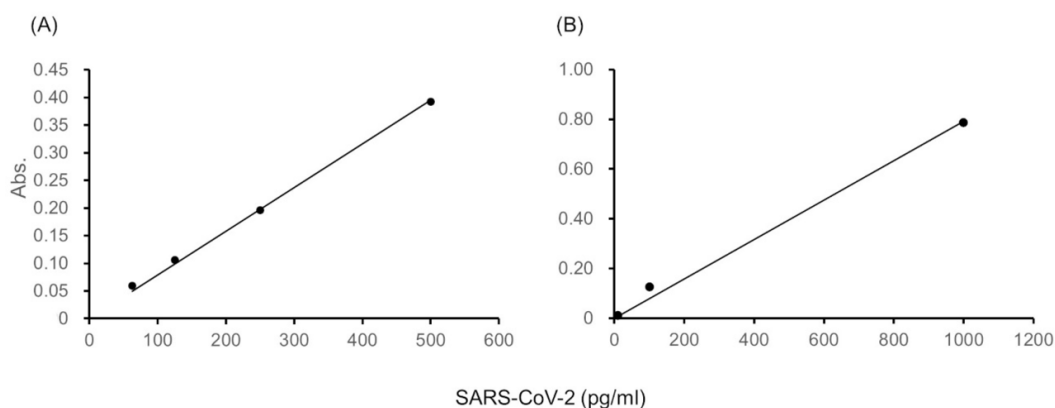


図 2-3：抗体の異なる S1 タンパク質の測定

(Kyosei Y, Namba M, et al., Diagnostics (Basel). 2020 Aug 14;10(8):594. doi: 10.3390/diagnostics10080594.)[72]より CC-BY4.0 に基づき転載

この結果から算出した検出限界では 10^{-18} moles/assay であり、高感度な検出が可能である範囲である。しかし、本研究の検出結果と比較すると、10 倍以上検出限界に差があり本研究結果が非常に高感度であることがわかった。したがって

本研究ではさらに感度の向上に成功したと言える。また、 10^{-19} moles/assay という検出感度は、非常に微量なタンパク質を測定可能な検出法である。

本研究の検出法であるチオ NAD サイクリング ELISA は超高感度な手法であるのか先行研究から定義する。Gooding は生物系の研究においてバイオセンサーに対する超高感度という言葉の定義をしている。この論文ではサブピコモル (10^{-13} moles/L)以下の検出を可能とする検出法を超高感度と定義している[73]。

この定義に従って、本研究の手法であるチオ NAD サイクリング ELISA が超高感度のバイオセンサーであるのか考察する。論文ではリットル単位であるので、これを ELISA 法のシグナル検出の際に使用する容量である 100 μ L に修正して、算出すると、100 μ L 単位での超高感度検出は 10^{-17} moles/assay (100 μ L)となる。本研究の測定結果では、S1 タンパク質・ヌクレオカプシドタンパク質どちらの検出感度においても 10^{-17} moles/assay 以下であり、バイオセンサーとしてチオ NAD サイクリング ELISA が超高感度であることを示した。

第3章

不活性化 SARS-CoV-2 を用いたチオ NAD サイクリング ELISA 測定

3-1 序論

第2章の結果から、リコンビナントタンパクを用いたチオ NAD サイクリング ELISA では、S1 タンパク質において 10^{-19} moles/assay、ヌクレオカプシドタンパク質では 10^{-17} moles/assay 以上の検出感度で測定されたことから、超高感度検出が可能であることが示された。また実験結果から算出した変動係数(CV)から異なる実験者が測定した場合においても、同等の検出感度で測定可能であることがわかった。この結果はチオ NAD サイクリング ELISA 法が新型コロナウイルスの主要タンパク質において、超高感度かつ再現性をもつ検出法であることを示唆している。一般的な検出法において高感度・再現性は非常に重要な要素である。しかし、ウイルスの検出法として、用いることを想定すると、リコンビナントタンパク質の検出だけでなく、SARS-CoV-2 自体の検出も必要であると考え。従って本研究の測定対象である新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)を用いた検出も行うことにした。

しかし、新型コロナウイルスを活性がある状態や患者検体などを測定する場合、取り扱いも現状でも BSL (バイオセーフティーレベル)が 3 以上の施設が必要になる。そのため、施設が十分に揃っている研究機関または医療機関では難なく取り扱いができるが、そうではない臨床現場・研究機関で新型コロナウイルスの測定を行う場合は、新型コロナウイルスに対する BSL が下がるか、ウイルスの RNA を何らかの方法で破壊し、不活性化させることで測定する方法の 2 点が考えられる。これまでの感染人口数を考えると BSL3 以上の施設に限定されてしまうと施設が不足してしまう。従って、新型コロナウイルスを前処理として不活性化させ、測定を行う必要がある。この方法は、先行研究においてもその重要性が示唆されている[74-76]。

本研究では、第2章で作製したチオ NAD サイクリング ELISA の測定系を用いて、実際の新型コロナウイルスを UVB 照射によって不活性化した SARS-CoV-2 を抗原として測定を行い、本手法が不活性化ウイルスにおいても有効であるかどうか評価を行った。また、不活性化ウイルスに対する測定感度についても評価を行った。

3-2 材料と方法

(1)抗体

チオ NAD サイクリング ELISA はサンドイッチ ELISA 法と同様に 1 次抗体および 2 次抗体の 2 種類抗体を用いる。それぞれ抗原を捕捉する 1 次抗体と基質が標識された 2 次抗体として使用する。本研究では、S1 タンパク質及び、ヌクレオカプシドタンパク質の 2 種それぞれに対して特異的に反応する抗体を使用するため計 4 種類の抗体を使用した。

- ・ S1 タンパクに対する抗体

S1 タンパク質に対する抗体はどちらもハカレル社から提供された抗体を使用した (1 次抗体 : A1-1C7、2 次抗体 : A2-7G6)。

- ・ ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体

ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体は Meridian 社の抗体を使用した。(1 次抗体 : 9548、2 次抗体 : 9547)

(2)抗原

本研究で使用した抗原は大阪大学微生物病研究所から提供された SARS-CoV-2(JPN/TY/WK-521)を使用して測定を行った。このウイルスは提供場所で 2% FCS (ウシ胎児血清)を添加した DMEM を用いて VeroR6/TMPRSS2 (JCRB1819) 細胞で増殖させたものである。ウイルス力価は $5.25 \log_{10} \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ であり、RNA 量は $2.6 \times 10^7 \text{copies}/\mu\text{L}$ であった。

培養上清を UVB 照射 (GL15、東芝ライテック)により $51 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で 30 分間照射することで不活性化を行なった。

(3)チオ NAD サイクリング ELISA 法について

不活性化ウイルスを測定するため、第 2 章のチオ NAD サイクリング ELISA を用いて測定を行った。

1. 96 ウェルプレートに炭酸バッファで $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した 1 次抗体を 100

μL 添加し、室温 1 時間静置で反応させる。

2. 96 ウェルプレートに 0.05% Tween20 含有バッファーにより、3 回洗浄を行う。
3. 1 次抗体をコートしプレートに 1% BSA (牛血清アルブミン)/TBS バッファーを各ウェル 300 μL 添加し、ブロッキングを行う。室温 1 時間静置で反応させる。
4. 反応後、プレートを 0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
5. ブロッキングしたプレートに 0.1% BSA/TBS で希釈した不活性化ウイルス (2.6×10^7 copies/assay から 2.6×10^2 copies/assay まで 10 倍ずつ希釈) を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、室温で 1 時間振とうさせる。
6. 反応後、0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
7. 抗原まで反応をさせたプレートに 0.1% BSA および 0.02% Tween20 を TBS に含んだバッファーによって 100 ng/mL に調整し、各ウェルに 100 μL 添加し、室温で 1 時間振とうさせる。
8. 反応後、0.05% Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
9. 最適条件に調整したサイクリング試薬を各ウェルに 100 μL 添加する。
10. サイクリング試薬添加後、マイクロプレートリーダーで 37°C、60 分間、5 分おきに吸光度の測定を行う。このとき、吸光度は 405 nm で測定を行い、660 nm の吸光度によって正規化した。

(4)統計解析

本研究では 100 μL を 1 assay として定義し、実験で得られた測定結果は平均値 ±SD (標準偏差: standard deviation) で表記した。有意差は FreeJSTAT Version 22.0E を用いて決定し、 $p < 0.05$ で有意差があるとみなした。

検出限界 (LOD: limit of detection) は、サンプルの入っていないブランクの 3 倍 SD から推定した。定量限界 (LOQ: limit of quantification) はブランクの 10 倍 SD を用いて算出・推定した。変動係数 (CV) はアッセイ内再現性 (intra-assay CV) およびアッセイ間再現性 (inter-assay CV) をそれぞれ求めた。

3-3 結果

(1) S1 タンパク質検出抗体を用いた測定

本研究では第 2 章で使用した実験系を使用して UVB 照射によって不活性化したウイルスの測定を行った。まず、S1 タンパク質に対する抗体を用いて不活性

化ウイルスの測定を行った。この実験においても 3 人の異なる実験者によってそれぞれ実験を行い、データの取得を行った(図 3-1)。

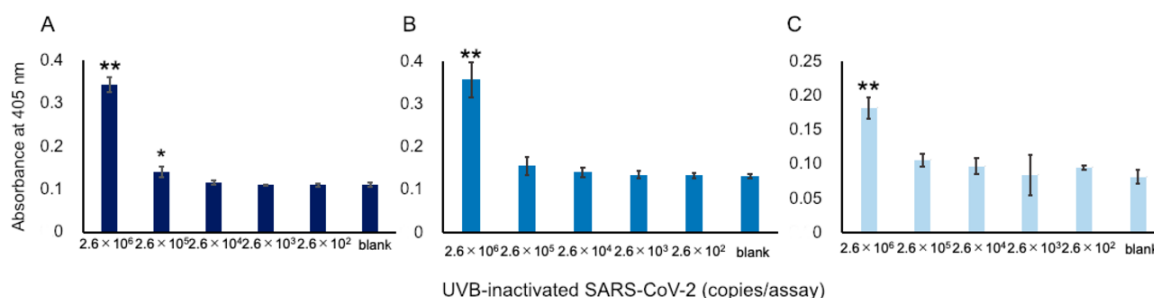


図 3-1：不活性化ウイルス(S1)測定

(Kyosei Y, Namba M, et al., *Microorganisms*. 2021 Oct 25;9(11):2214. doi: 10.3390/microorganisms9112214.)[69]より CC-BY4.0 に基づき転載

結果から、3 人の実験者全てにおいてブランクと比較し、 2.6×10^6 copies/assay で有意に高いシグナルを得ることができた。また、一人の実験者のみだが 2.6×10^5 copies/assay でも有意差があることが示唆された。3 人の実験者の結果は全て同等の検出感度であるため、再現性をもつ測定結果であることも示唆された。

(2)ヌクレオカプシドタンパク質検出抗体を用いた測定

次に S1 タンパク質抗体を使用した実験と同様にヌクレオカプシドタンパク質を捕捉する抗体を用いて不活性化ウイルスの測定を行った (図 3-2)。

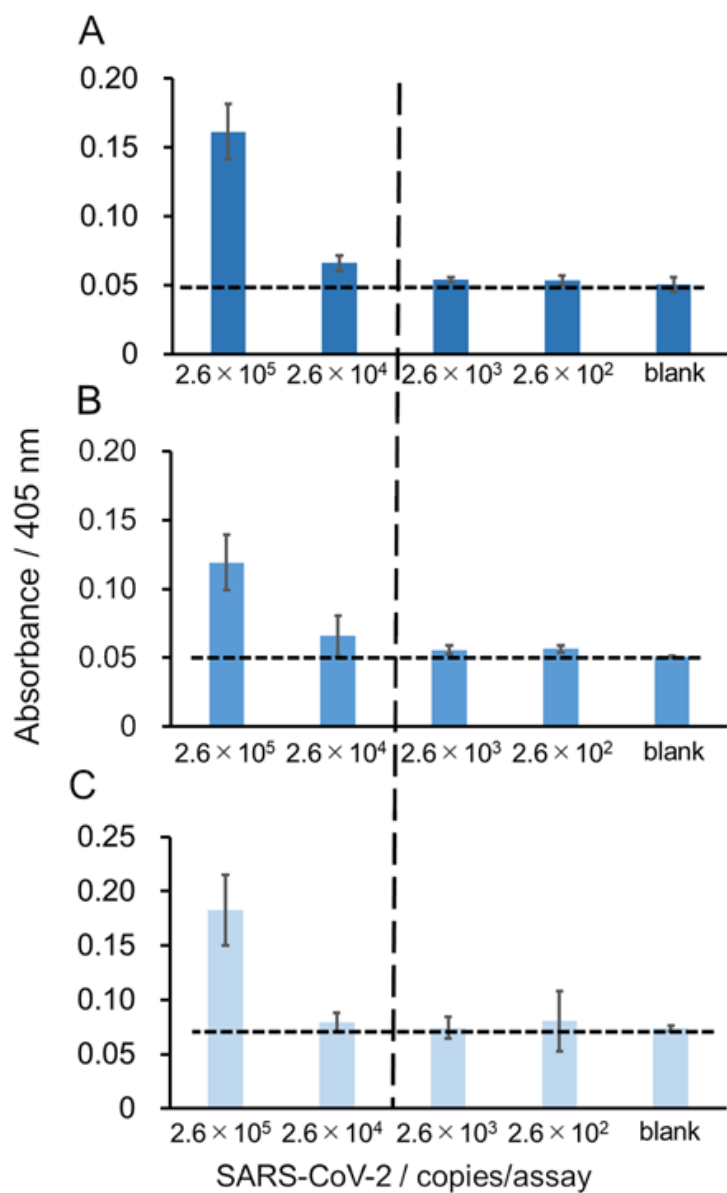


図 3-2 : 不活性化ウイルス(NP)測定

(Kyosei Y, Namba M, et al., Biol Pharm Bull. 2021 Sep 1;44(9):1332-1336. doi: 10.1248/bpb.b21-00387. Epub 2021 Jun 19.)[70]より引用

結果から、ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体では一貫して3人の実験者から同等の検出結果が得られ、検出限界としては 2.6×10^4 copies/assay 以上の濃度でブランクよりも有意に高いシグナルを得られた。

3-4 考察

本研究の結果から、第 2 章で確立した新型コロナウイルスに対するチオ NAD サイクリング ELISA 法を用いて、UVB 照射により不活性化した SARS-CoV-2 に対して S1 タンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質 2 種類のタンパク質を捕捉する抗体を使用した測定を行なった。この結果、それぞれ S1 タンパク質抗体を使用した場合は 2.6×10^6 copies/assay、ヌクレオカプシドタンパク質抗体では 2.6×10^4 copies/assay 以上の濃度で測定可能であるとわかった。

この結果を PCR 法および蛍光抗原検査法と比較した。Real-time PCR は新型コロナウイルスの陽性検査において主要な検査方法であり、高感度であることが知られている。その検出感度は数 copies/assay という感度である。本研究の結果はこの感度には届いていない。しかし、蛍光免疫測定法を用いた抗原検査では、 2.0×10^3 copies/ μ L という検出感度である[77]。本研究では検出感度としてヌクレオカプシドにおいて、約 10^4 copies/assay であるが、この測定はチオ NAD サイクリング ELISA の容量で算出しており、1 assay=100 μ L であるため、これを 1 μ L に変換すると、本研究結果は約 10^2 copies/ μ L となる。これを先ほどの先行研究と比較すると、本法は 10 倍以上感度が高く、蛍光抗原検査の検出感度を超過しており、抗原検査として非常に高感度な検出法であることがわかる。また、検査に使用することを想定した場合、新型コロナウイルス感染者内でのウイルス量を超える感度で測定することができれば検査法としても使用できると言える。先行研究では、新型コロナウイルスに感染した患者の体内から採取されたウイルス RNA 量は約 $10^6 \sim 10^7$ copies/mL 以上である[78]。本研究のヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体を用いたチオ NAD サイクリング ELISA ではウイルス量以上の検出感度を有しており、S1 タンパク質に対する抗体を使用した実験系においても近い感度であることがわかる。これらの結果からチオ NAD サイクリング ELISA は不活性化ウイルスに対しても高感度に測定できることがわかる。

本研究の結果から、チオ NAD サイクリング ELISA が高感度であることを蛍光測定と比較して証明したが、市販の抗原検査と比較しても同様の結果になるのだろうか。Atienzar らの論文では、市販の迅速抗原検査キット 19 個を比較して培養上清、乾燥綿棒、Amies 培地の 3 種類のサンプルの測定を行い、どれほどの検出感度であるか測定を行っている。それらのキットの中で WHO が検出感度として許容している 1.0×10^6 copies/mL を検出可能なキットは 14 キットだったとしている。したがって 5 キットは測定ができないことを示している[79]。 10^6 copies/mL

は assay に直すと、 10^5 copies/assay になる。本研究ではヌクレオカプシドタンパク質の検出において、 10^4 copies/assay まで測定できたため、チオ NAD サイクリング ELISA の検出限界は WHO の定める基準を満たした抗原検査法と比較しても、10 倍以上高いことを示している。この結果から、実際に市販でも購入可能な抗原検査キットや通常の抗原検査は抗原検査の中でも高感度な手法であることがわかった。

S1 タンパク質測定とヌクレオカプシドタンパク質測定の検出感度を比較すると 100 倍ほどヌクレオカプシドタンパク質抗体を用いた測定で高く、差があることがわかる。この差は SARS-CoV-2 の不活性化方法にあるのではないかと考えた。本研究で使用した不活性化 SARS-CoV-2 は UVB 照射を 30 分行うことで不活性化している。すなわち、外部から UVB をウイルス培養液に照射することになるが、この方法だと構造上ウイルスの外に存在するスパイクタンパク質はヌクレオカプシドタンパク質よりも UVB の影響を受けやすいと考えた。そこで大阪大学微生物病研究所から UVB 照射時間を変えた不活性化ウイルスを提供してもらい、UVB 照射時間によって測定感度に差が出るのか S1 タンパク質検出抗体を使用して実験を行った (図 3-3)。不活性化ウイルスを作製する際の UVB 照射時間を 10 分と 20 分、30 分の 3 種類用意し、それぞれに対してチオ NAD サイクリング ELISA によって吸光度に差があるのか測定を行い、比較した (図 3-3)。

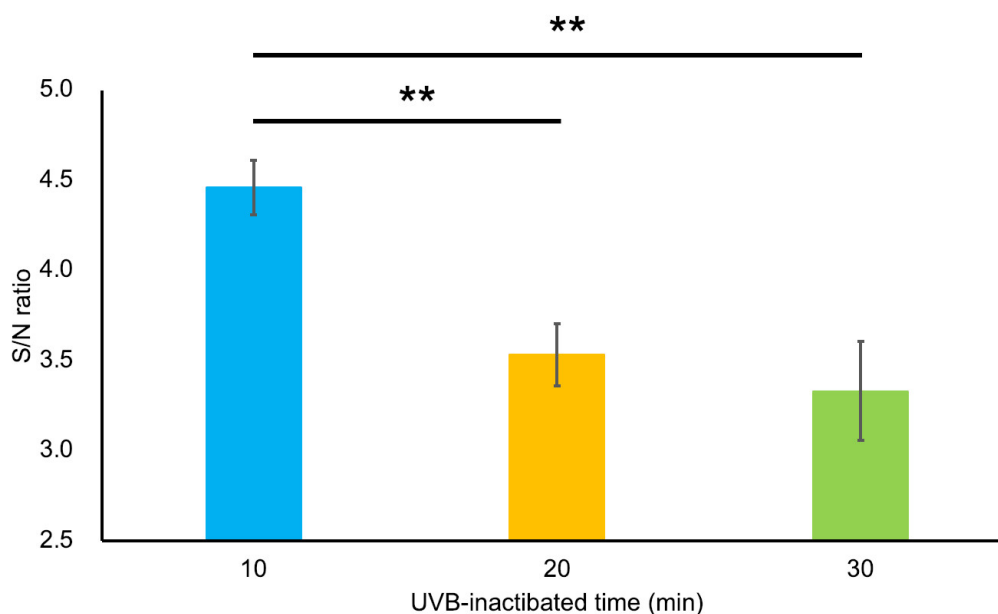


図 3-3 : S1 タンパク質検出抗体による UVB 照射時間の比較

UVB 照射時間 10 分、20 分、30 分の SARS-CoV-2 の測定結果を S/N 比によって比較したグラフ。各測定値を one-way ANOVA および post-hoc Holm test によって有意差を算出した。有意差は* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ とした。

この結果から UVB 照射時間を変更した場合では、UVB 照射時間が 10 分から 30 分において統計解析した場合、UVB 照射時間 10 分と比較して 20 分と 30 分の照射時間では有意に S/N 比が低く、UVB 照射時間によって検出感度が減少していく傾向があることがわかった。したがって、スパイクタンパク質の測定において、UVB 照射による不活性化の影響が少なからずあると考えることができる。本研究の結果により、各タンパク質の検出感度を比較した際に 100 倍の感度差がある理由も UVB であると結論づけることができる。少なくともスパイクタンパク質の測定を行う場合は他の不活性化方法を考える必要もあると考える。

SARS-CoV-2 を不活性化するため、UVB 照射を用いている。これはウイルスのもつ RNA・DNA の性質として、波長 260 nm 付近の波長を吸収するため、近い波長を持つ UVB 照射によって、RNA・DNA に損傷が生じる。この手法によってウイルスの持つ増殖能力が破壊され、死んでいくことになる。RNA の破壊によって、UVB 照射は不活性化を促しているが、本研究結果により、UVB 照射による不活性化はウイルスの持つ RNA を確実に不活性化することが可能である。加えて、この不活性化能力は非常に高い手法であるが、本研究のチオ NAD サイクリング ELISA 法による測定には適さない手法の可能性がある。実際に新型コロナウイルスに限らず、ウイルスタンパク質に対する不活性化は様々な手法が試されている。

Pattarson らの論文では様々な不活性化方法に対する SARS-CoV-2 の感染性をウイルス力価 (TCID₅₀ および PFU)によって評価している。この際の不活性化方法は熱、界面活性剤、UV 照射、Trizol・Trizol LS、エタノール、パラホルムアルデヒドを使用し、不活性化力価の検討を行っている。これらの方法は一定の濃度および温度において SARS-CoV-2 の不活性化を示している。しかし、抗原検査に適さない方法も存在する。例えば、熱による不活性化ではタンパク質を熱変性により不活性化を促しているが、これは抗原抗体反応を用いた ELISA 法や免疫クロマト法のようなタンパク質を測定する抗原検査では抗体の反応性が下がるため、デメリットでしかない。仮に測定できたとしても検出感度が著しく低下する可能性がある。加えて、筆者らの研究結果では 80°C以上で不活性化を示しており、考察でも抗原検査などのタンパク質測定には適していないとしていた。ここで、もっとも不活性化を効率的に行えた試薬が Trizol である。これは界面活性剤として RNA の抽出に用いられる試薬であり、エンベロープウイルスの脂質膜を

破壊することでRNAを抽出することができる。しかし、彼らの結果では Tween20 など他の界面活性剤を使用した手法では不活性化が弱く、Trizol による不活性化が最も適しているとしている。この方法は基本的にタンパク質に対しては影響がないとされているため、不活性化方法として効果的な選択肢の一つとなる[80]。本手法での抗原検出に対しても界面活性剤による不活性化方法は有効であり検出感度向上の可能性はある。

第4章

17β-エストラジオールによる新型コロナウイルス感染減少のメカニズム解明

4-1 序論

第2章および第3章の結果からチオ NAD サイクリング ELISA が新型コロナウイルスのリコンビナントタンパク質および不活性化ウイルスに対して非常に有効な検出法であることが検出感度・再現性から証明された。この結果によって、研究機関や臨床現場において様々な抗原検出に対して応用できることが示唆された。また、種類の異なるタンパク質を測定したとしても感度を落とすことなく測定できることが示唆された。

新型コロナウイルスは男女の感染度および重症度において、性差が存在することが以前から指摘されている。この原因としては食生活や生活習慣、喫煙の有無など様々な要因が指摘されている。その中で、要因の一つとして挙げられているのが性ホルモンではないかと言われている。新型コロナウイルスがヒトの細胞に感染する際、細胞膜の ACE2 にスパイクタンパク質が結合し、TMPRSS2 によって細胞内へと侵入を促す[62]。

先行研究では、女性ホルモンの1つであるエストラジオールを添加することで、新型コロナウイルスの細胞に対する感染を防御することができると思われる。しかし、この性ホルモンによる細胞への感染防御の作用機序はいまだに解明されておらず、どのようにして感染を防御しているのかわかっていない。

本研究では 17 β -エストラジオールが ACE2 に効果を及ぼし、可溶性 ACE2 を多く発現させることで、細胞へ感染する前に感染が減少すると仮定した。これを証明するため 17 β -エストラジオールの添加濃度を調整し、培養した VeroE6/TMPRSS2 細胞と SARS-CoV-2 を模した模擬ウイルスを用いて感染度に差が生じるか比較を行った。また、エストラジオール処理後の培養液を ELISA 測定し、sACE2 がどのように変化するか調べることにした。またここまで新型コロナウイルスの検出法として確立したチオ NAD サイクリング ELISA によって、これらの実験によって sACE2 とエストラジオールの関係性について考察した。

4-2 材料と方法

(1)細胞培養実験

本研究ではアフリカミドリザル腎臓細胞にヒト TMPRSS2 を発現させた VeroE6/TMPRSS2 細胞(細胞バンク：JCRB1819)を使用した。通常 VeroE6 細胞は新型コロナウイルスの増殖に使用されることが多い細胞であるが、本研究で用いたこの細胞は新型コロナウイルスの感染力が通常の 10 倍高いことがわかっており、ヒト TMPRSS2 が発現していることから、ヒトへの新型コロナウイルス感染経路の研究に使用できることが先行研究よりわかっている[81]。

細胞は 37°C、CO₂：5%の条件で培養した。また、培養液は DMEM(低グルコース)に G418(108321-42-2)を終濃度 1 mg/mL、10%FBS を加えたものを使用した。エストラジオールを添加した細胞では、終濃度が 0.1、1.0、10 μM になるように培養液に 17β-estradiol (14541-74)を加えた。ブランクの細胞では 0.5%EtOH を添加して培養した。

(2)模擬 SARS-CoV-2

本研究では VeroE6/TMPRSS2 細胞への感染度を判断するため、pseudo SARS-CoV-2 green reporter (#C1110G)を使用した。

(3)模擬ウイルスの感染実験

本研究では模擬ウイルスを以下の手順で細胞へ感染させ、感染後蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

1. 培養した VeroE6/TMPRSS2 細胞を全て 1.0×10^5 cells/mL に調整し、シャーレに移動させ、24 時間インキュベーターで静置する。
2. 24 時間後、シャーレを PBS で洗浄し、 1.0×10^4 vg/mL に調整した模擬ウイルスを各シャーレに添加する。添加後インキュベーターで 16 時間以上静置する。
3. 模擬ウイルス反応後、PBS で洗浄し、Hoechst 33258 を添加し、30 分反応させる。
4. 反応後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察・画像を取得する。
5. 取得した画像を ImageJ によって解析を行なった。

(4)sACE2 ELISA kit による測定

エストラジオール添加後に可溶性 ACE2 の発現量の変化を解析するため、サンドイッチ ELISA 法を用いてタンパク質量の測定を行った。

sACE2 の測定には市販の ELISA キット (Human soluble ACE2 ELISA kit, SK00707-01) を使用して測定を行った。

1. 固相抗体がコートされている 96 ウェルプレートにキット付属のサンプルバッファで希釈した sACE2 スタンダードサンプル (6400、3200、1600、800、400、200、0 pg/mL) および培養液を各ウェル 100 μ L ずつ添加し、室温で 2 時間反応させる。
2. 反応後、プレートを 0.05% Tween20 含有バッファで 3 回洗浄を行う。
3. キット付属の抗体希釈バッファで希釈したビオチン化検出抗体を各ウェルに 100 μ L ずつ添加し、室温で 1.5 時間振とうして反応させる。
4. 反応後、プレートを 0.05% Tween20 含有バッファで 9 回洗浄を行う。
5. HRP 標識ストレプトアビジンをバッファで希釈し各ウェルに 100 μ L 添加し、45 分間室温で振とうで反応させた。
6. 反応後、プレートを 0.05% Tween20 含有バッファで 9 回洗浄を行う。
7. TMB 基質溶液を各ウェルに 100 μ L 添加し、遮光して 20 分間室温で振とうで反応させた。
8. 反応後、各ウェルに停止薬を 100 μ L 添加した。
9. マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度をエンドポイントによって測定を行った。TMB によるシグナルを 450 nm で測定し、570 nm で正規化した。

(5)チオ NAD サイクリング ELISA 法による sACE2 添加模擬ウイルス測定

本研究ではスパイクタンパク質に対する抗体と模擬ウイルスを用いてチオ NAD サイクリング ELISA の実験系を設計し、模擬ウイルスと培養液中の sACE2 を反応させることで、sACE2 の効果を評価した。

1. 96 ウェルプレートに炭酸バッファで 1 μ g/mL に調整した 1 次抗体を 100 μ L 添加し、室温 1 時間静置で反応させる。
2. プレートを 0.05% Tween20 含有バッファで 3 回洗浄を行う。

3. 1次抗体をコートしプレートに1%BSA(牛血清アルブミン)/TBSバッファーを各ウェル 300 μ L 添加し、ブロッキングを行う。室温 1 時間静置で反応させる。
4. 反応後、プレートを 0.05%Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
5. ブロッキングしたプレートに 0.1%BSA/TBS で終濃度 10^6 vg/mL に調整した模擬ウイルスと細胞培養液を混合させた溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ添加し、室温で 1 時間振とうさせる。
6. 反応後、0.05%Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
7. 抗原まで反応をさせたプレートに 0.1%BSA+0.02%Tween を TBS に含んだバッファーによって 100 ng/mL に調整し、各ウェルに 100 μ L 添加し、室温で 1 時間振とうさせる。
8. 反応後、0.05%Tween20 含有バッファーで 9 回洗浄を行う。
9. 最適条件に調整したサイクリング試薬を各ウェルに 100 μ L 添加する。
10. サイクリング試薬添加後、マイクロプレートリーダーで 37°C60 分の間、5 分おきに吸光度の測定を行う。このとき、吸光度は 405 nm で測定を行い、660 nm の吸光度によって正規化した。

(6)統計解析

本研究の ELISA を用いた実験データは各測定データからシグナルの平均値からブランクの平均値を引くことで得られた。データは箱ひげ図によって示した。有意差は R (バージョン 4.2.1; <https://www.r-project.org/>)を用いて決定し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。検定には one-way ANOVA および post-hoc Holm test を用いて行った。

4-3 結果

(1)各エストラジオール濃度による VeroE6/TMPRSS2 細胞に対する蛍光強度の比較

模擬ウイルスを感染させた VeroE6/TMPRSS2 細胞を蛍光画像として取得し、ImageJ によって解析を行った。そして解析結果からエストラジオール濃度によって模擬ウイルスの感染量の違いを *in vitro* で評価した(図 4-1A)。また、エストラジオールによる蛍光強度変化を箱ひげ図として結果の比較を行った (図 4-1B)。

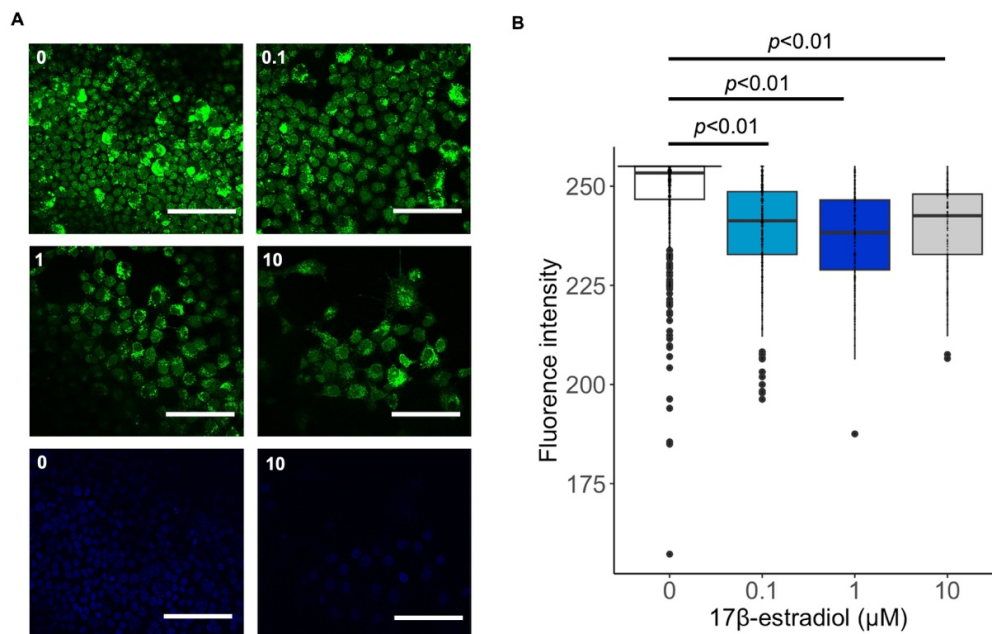


図 4-1：各濃度のエストラジオール添加 VeroE6/TMPRSS2 細胞に pseudo viruses 感染の蛍光解析結果。

(Kyosei Y, Yoshimura T, Ito E. Biol Pharm Bull. 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21.) [82]より CC-BY4.0 に基づき転載

A 蛍光顕微鏡による模擬ウイルス感染の観察結果。B ImageJ によって観察結果を箱ひげ図としてグラフ化した結果。

図 4-1B の結果は、画像解析によって、各 17β-エストラジオール濃度の蛍光強度を平均化し、細胞一つの蛍光強度を算出することで比較を行った。この結果から、細胞一つごとに対する蛍光強度が有意に減少していることが示唆された。まず、これらの結果によって、エストラジオールを添加した感染細胞と比較して添加していない感染細胞では有意に蛍光強度が高いことが示唆され、さらに、エストラジオール濃度 1 μM までは濃度上昇に比例して感染細胞の蛍光強度も減少することがわかった。

(2)細胞培養液中 sACE2 の測定

次に模擬ウイルスの感染減少の要因は ACE がエストラジオールによって sACE2 として細胞から解離することで起こっていると仮定した。この仮定を検討するため、模擬ウイルスを感染させる前の細胞培養液を採取し、各濃度のエス

トラジオールによって sACE2 がどの程度変化するのかサンドイッチ ELISA 法によって測定した (図 4-2)。

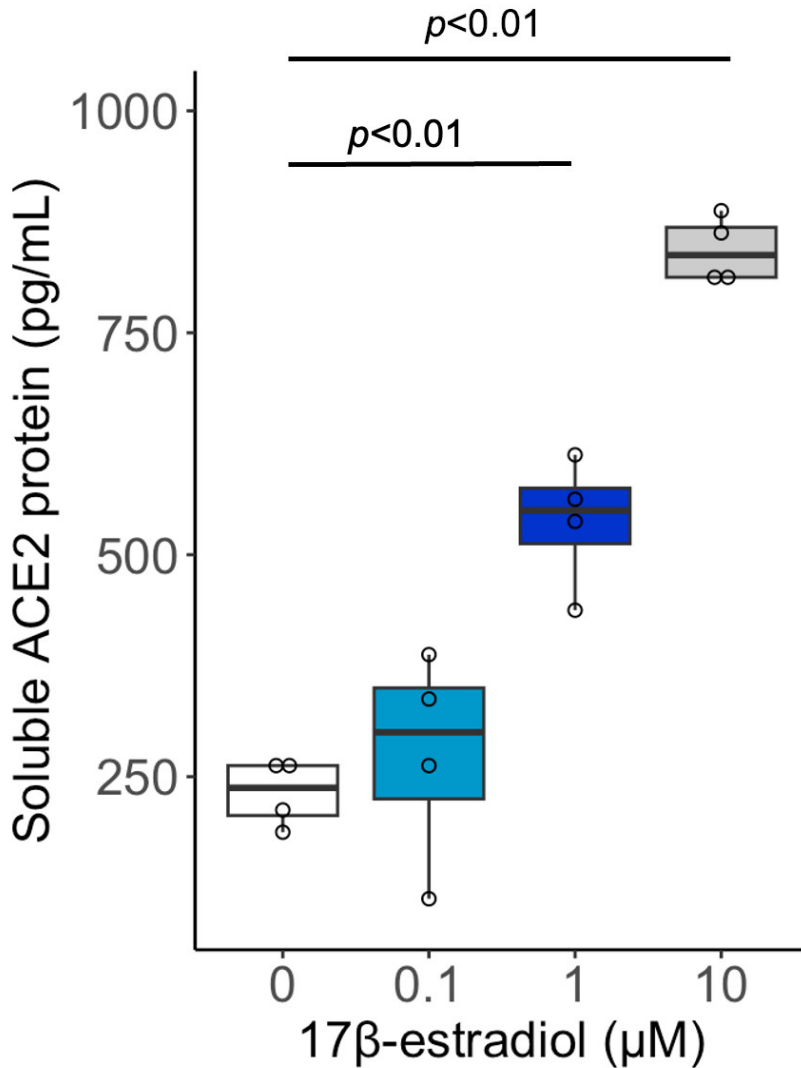


図 4-2 : 培養液に含まれる sACE2 量の測定結果。

(Kyosei Y, Yoshimura T, Ito E. Biol Pharm Bull. 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21.) [82]より CC-BY4.0 に基づき転載

この結果から培養液中に sACE2 の存在を確認することができた。特に 1.0、10 μM ではエストラジオールを添加していない培養液と比較して有意に増加していることがわかった。0.1 μM との統計解析ではエストラジオールを添加していない場合と比較して有意な差は見られなかったが、グラフから増加傾向があること

はわかる。従って、これらの結果からエストラジオールの添加量に比例して sACE2 量が増加していくことが示唆された。

(3)チオ NAD サイクリング ELISA による sACE2 添加模擬ウイルスの測定

これまでの結果からエストラジオールによって、感染前に sACE2 の発現量が増加し、SARS-CoV-2 の細胞への感染性が減少することがわかった。最後に sACE2 が事前に模擬ウイルスに結合し、細胞感染をブロックすることでウイルスの感染力自体を減少するのか、チオ NAD サイクリング ELISA によって sACE2 を含んだ培養液と模擬ウイルスを混合した混合溶液を作製し測定を行なった (図 4-3)。

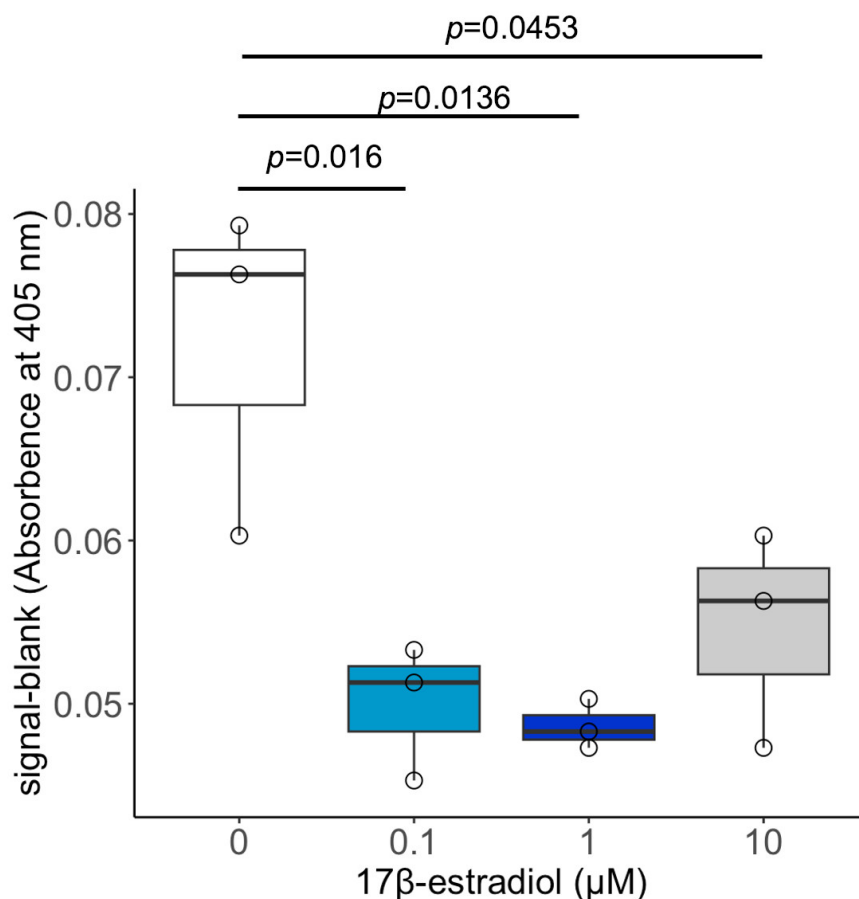


図 4-3 : チオ NAD サイクリング ELISA を用いた模擬ウイルスを使った測定

(Kyosei Y, Yoshimura T, Ito E. Biol Pharm Bull. 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21.) [82]より CC-BY4.0 に基づき転載

結果からエストラジオールを添加していない培養液と模擬ウイルスを組み合わせた結果と比較したとき、どのエストラジオール濃度においても吸光度が有意に低いことがわかった。これらの結果は sACE2 によって模擬ウイルスの結合を阻害していることを示している。

4-4 考察

第4章では女性の感染率・死亡率の低さを解明するため新型コロナウイルスと女性ホルモンであるエストラジオールの関係について注目した。また、エストラジオールと感染に重要な ACE2 との関係の解明を目的とした。

最初に VeroE6/TMPRSS2 細胞と緑色蛍光のレポーターを持つ模擬ウイルスを用いてエストラジオールの濃度変化による細胞への感染度の違いについて比較を行った。この結果、エストラジオールの濃度に比例して模擬ウイルスの蛍光強度が減少していることがわかった。さらに、エストラジオールによって模擬ウイルスの細胞への感染度も減少していることが示唆された。

次に模擬ウイルスの感染減少の原因は細胞から離れた可溶性 ACE2 (sACE2) であると仮定した。そこで模擬ウイルス感染前の細胞に使用した培養液を採取し、sACE2 の ELISA 測定を行った。測定結果から結果 (1)と同様にエストラジオールの濃度に比例して sACE2 のタンパク量も増加していることがわかった。この結果から新型コロナウイルスへの感染防御として事前に sACE2 を放出し感染量そのものを減少させていることがわかった。

最後にここまでの結果からエストラジオールによって感染を防ぐため、sACE2 を放出させ新型コロナウイルスの感染を事前に減少させていることが結果からわかった。加えて sACE2 が細胞から離れ、新型コロナウイルスに対して結合し感染力自体を減少させているのか確かめるため、チオ NAD サイクリング ELISA を用いて細胞感染前の模擬ウイルスに対する sACE2 の効果を測定した。結果からエストラジオールによって放出された sACE2 は模擬ウイルスのスパイクタンパク質に結合し、抗体への結合を有意にブロックしたことがわかった。これは sACE2 が細胞から解離され、細胞の ACE2 量が減少することで感染量を減少させているだけでなく、感染前のウイルスに結合し、感染自体もブロックしている可能性を示唆している。

これらの結果はエストラジオールがウイルスの感染を防御する機構を働かせていることを示唆しており、男女における新型コロナウイルスの感染度差の要因の一つであることを示唆している (図 4-4)。

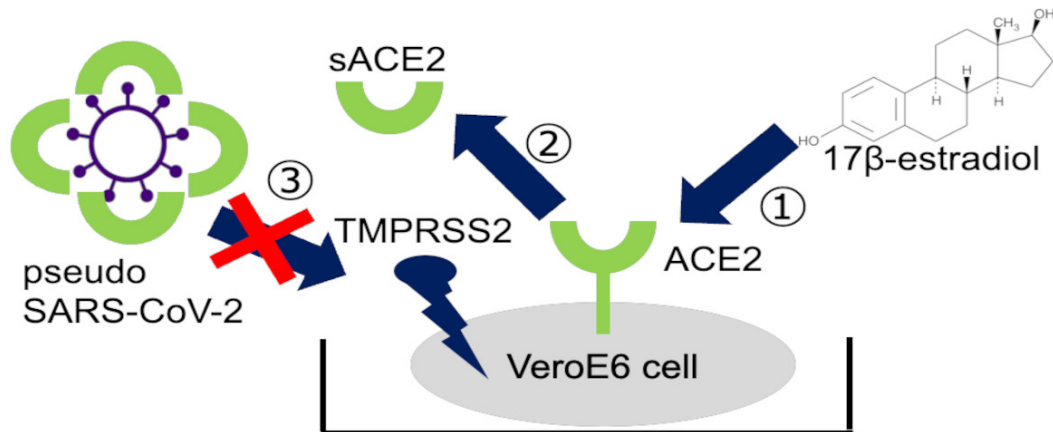


図 4-4：本研究によって解明されたメカニズム概要図。

(Kyosei Y, Yoshimura T, Ito E. Biol Pharm Bull. 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21.) [82]より CC-BY4.0 に基づき転載

加えて本研究ではタンパク質によって結果を得られたことも重要な点である。本研究のように細胞を用いた感染経路の解明では PCR 法を用いた mRNA の発現量による研究が非常に多く、タンパク量による研究結果は少ない。タンパク質は生体内で最後に発現するものであるため、タンパク質を使用した結果は生体内の機構を直接紐解く大事な要素である。なぜなら mRNA の発現量とタンパク質の発現量は一般的に相関しないと言われている。これはタンパク質への翻訳効率や mRNA の安定性、タンパク質の分解速度などが挙げられる。これらのことから mRNA の発現量だけではなく、タンパク質の発現量を比較することが重要であると言える。本研究ではタンパク質を用いて定量的にエストラジオールの新型コロナウイルス細胞感染メカニズムの解明を行うことに成功した。

また、本研究ではエストラジオールと ACE2 の関係性に着目して研究を行った。しかし、性ホルモンと新型コロナウイルスの関係性は女性ホルモンだけではなく、男性ホルモンも関係していると言われている。したがって、男性における新型コロナウイルス感染の作用機序を解明するためには男性ホルモンであるアンドロゲンを使用した実験の必要な可能性がある。ただ、主要な男性ホルモンであるアンドロゲンはエストラジオールと異なり、ACE2 ではなく TMPRSS2 に関与していると言われている。先行研究で、TMPRSS2/ETS family 融合遺伝子は前

立腺がん患者の 30~70%で確認されており、TMPRSS2 遺伝子はアンドロゲン応答性遺伝子でもある[83-86]。別の先行研究では、実際にアンドロゲンを添加した細胞では添加後、TMPRSS2 の mRNA 発現量が増加したことがわかっており、TMPRSS2 発現量の増加から SARS-CoV-2 の感染量増加も認められた[87]。この研究結果から男性ホルモンであるアンドロゲンと TMPRSS2 との関係は非常に深いことがわかり、TMPRSS2 は新型コロナウイルスとも関係していることから、男性ホルモンであるアンドロゲンと新型コロナウイルスも関係性は深いことがわかる。このホルモンによる反対の反応が性差による感染度の違いにつながるのではないかと考えられるが、アンドロゲン添加による反応は検討の必要がある。

ACE2 は新型コロナウイルス感染の結合箇所として注目されている細胞膜のタンパク質であるが、この ACE2 はほぼ全ての細胞に普遍的に存在している。しかし、各組織によって発現割合が異なっている。新型コロナウイルス感染時に肺炎や咳などの症状が起こることから、肺胞や呼吸器系の細胞などに多く存在している、また心臓や腎臓などの臓器系や生殖系、血管系の細胞などでも非常に多く発現しているとされている[88]。これだけ多くの細胞に発現していることから急速に全身へ感染していき、低確率ではあるが、免疫反応の暴走によりサイトカインストームを引き起こす。したがって、新型コロナウイルスの感染は感染自体よりも感染後のサイトカインストームやそれによって引き起こされる多臓器不全などの 2 次災害が非常に大きい。このことから新型コロナウイルスを感染させない防御機構の解明は非常に重要な要素になることがわかる。

第 1 章でも記載した通り、ACE2 はレニン-アンジオテンシン系のアンジオテンシン変換酵素の一つとして用いられる。したがって ACE2 の存在はヒトの内部環境の恒常性に深く関わっている。本研究の結果から、エストラジオールによって sACE2 量が増加していることがわかったが、これは細胞上の ACE2 量が相対的に減少していることを意味する。この結果は、逆に ACE2 が細胞から減少することによって、デメリットがある可能性があるがこれは考えられない。なぜなら ACE2 の可溶化は日常的に発現しているためである。このため、コロナウイルスへの感染関係なく、血液中に数%存在していることがわかっている。本研究の結果から、女性では男性と比較すると、エストラジオールにより、sACE2 量が多いと考えられるため、ACE2 が減少することでのデメリットは存在していないもしくは非常に少ないと考えられる。反対にこの感染減少機構が起きない場合、新型コロナウイルスの感染により、ACE2 のレニン-アンジオテンシン系が働かなくなり、アンジオテンシンは持つ血管拡張や血圧減少などの作用がなくなってしまうため、体内環境の悪化につながり余計に悪化していくことになり、多臓

器不全などの大きな障害につながる。本研究の結果により、ACE2 が sACE2 と
して乖離されることでレニン-アンジオテンシン系の停止が怒らない可能性も示
唆された。したがって sACE2 の増加により他の機構が停止してしまうようなデ
メリットは存在せず、逆に新型コロナウイルス感染によって生じる問題が改善さ
れることによるメリットが非常に大きい。これが女性で重症化しないことにつ
ながる。

第 5 章

本研究の総括

COVID-19 は、2019 年 12 月に中国の武漢市で確認されてから数年が経過してなお、世界中で感染者を出している強力なウイルスである。その感染者数は 2021 年 10 月 31 日段階で 2.9 億人を超えており死者数も約 500 万人にまで及ぶ。このウイルスにおいて最も一般的な測定法は、高感度な測定法として知られる PCR 法である。非常に高感度な PCR 法は検査法として有用な方法ではあるが、検査難易度の問題や疑陽性のリスクなど問題点も少なくない。WHO も新型コロナウイルスの検査には PCR 法だけではなく、タンパク質の測定である抗原検査法も併用して検査することを推奨している。抗原検査法は安価で測定も容易な手法であるが、PCR 法と比べて検出感度が低いことが問題として挙げられる。本研究では新型コロナウイルスに対して高感度な抗原検査法を開発することを最初の目的とした。

さらに、新型コロナウイルスは男性と女性への感染度および重症度において、女性は有意に低いことが知られている。この要因として生活習慣や喫煙者の数、食生活など様々なことが挙げられる。その中の一つとして性ホルモンによる感染防御の可能性が指摘されている。特に女性ホルモンであるエストラジオールは高濃度で自然免疫の働きを促すことが知られており、疾患への免疫防御に大きな影響を与えている。先行研究ではエストラジオールによって新型コロナウイルスの細胞感染を抑制することもわかっており、ACE2 の mRNA 発現量を下げることがわかっている。しかし、その防御メカニズムについてわかっていることは少ない。そこで次に、細胞培養実験および開発した新型コロナウイルスに対する測定法を用いてエストラジオールによる新型コロナウイルスの感染抑制のメカニズムの解明を次の目的とした。これら 2 つの軸を元に研究を行った。

最初の目的を達成するため、第 2 章ではまず、新型コロナウイルスのタンパク質のうち、特に S1 タンパク質と、ヌクレオカプシドタンパク質という 2 種類のタンパク質に着目し、これらのリコンビナントタンパク質を用いてチオ NAD サイクリング ELISA 法の実験系の開発を行った。それぞれのタンパク質に対する市販の抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を作り酵素サイクリング法と組み合わせることで高感度な抗原検査法の開発を行った。結果として、S1 タンパク質では約 10^{-19} moles/assay、ヌクレオカプシドタンパク質では約 10^{-17} moles/assay という超高感度な検出感度で測定することができた。この検出感度は従来のタンパク質測定法の 100 倍以上高いことがわかっており、タンパク質濃度に換算しても約 10 pg/mL~200 fg/mL という微量なタンパク質の測定に成功している手法であることがわかる。

第 2 章の結果から、リコンビナントタンパク質を用いた実験でチオ NAD サイクリング ELISA は S1 タンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質に対して

超高感度に検出可能であり、通常のサンドイッチ ELISA と比較しても有効な検出法であることを示した。しかし、実際に新規測定法として確立するためには新型コロナウイルス自体を測定する必要がある。第 3 章では、第 2 章で開発したチオ NAD サイクリング ELISA を用いて、UVB 照射によって不活性化をおこなった SARS-CoV-2 を抗原として用いることで、実際の新型コロナウイルスを測定する際にどれほどの検出感度を算出することができるのか、測定を行った。測定対象として不活性化ウイルスを使用した理由は新型コロナウイルスの測定には BSL3 以上の施設が必要であり、この施設使用をしない測定を想定したためである。結果から、S1 タンパク質検出抗体を使用した実験系では約 10^6 copies/assay、ヌクレオカプシドタンパク質検出抗体を使用した実験系では約 10^4 copies/assay で検出可能であることが示された。この検出感度は蛍光抗原検査法の 10 倍以上高い感度を有しており、新型コロナウイルス感染者体内のウイルス量よりも低い感度で測定できたことになる。したがってチオ NAD サイクリング ELISA 法は検査法としても使用可能な検出法であることが証明された。

第 4 章では新型コロナウイルスの性差による感染度の違いを解明するため、女性ホルモンであるエストラジオールと sACE2 に着目した。可溶性 ACE2 と言われる sACE2 はウイルスの感染防御に関わると言われているが、どのようにして発現しているのかわからないタンパク質であり、本研究ではエストラジオールと sACE2 の関係性に注目することにした。ここでは細胞培養実験を行い、細胞にエストラジオールを添加し、SARS-CoV-2 を模した模擬ウイルスを感染させることでエストラジオールによる感染減少の評価を行った。実際に蛍光顕微鏡によって観察した画像を ImageJ によって解析し、細胞 1 つごとの蛍光強度を平均化することによって比較したところ、エストラジオールの添加量に比例して模擬ウイルスの細胞に対する感染量が減少していることがわかった。これはエストラジオールによって模擬ウイルスの感染量が減少していることを示している。次に、エストラジオールによって模擬ウイルスの細胞感染が減少した理由として ACE2 が sACE2 として細胞液中に放出されていることで細胞への感染が減少したのではないかと考えた。そこで、細胞培養後の細胞培養液中 sACE2 量を ELISA kit によって測定した。細胞培養液中の sACE2 量はエストラジオール濃度が高くなるほど増えていき、1.0 および $10 \mu\text{M}$ では有意に多いことがわかった。しかし、 $0.1 \mu\text{M}$ でも $0 \mu\text{M}$ と比較すると統計的な有意差はなかったが、増加傾向があるため、sACE2 はエストラジオール濃度に比例して細胞から ACE2 が解離し、放出されていることが示された。この結果によってエストラジオールは ACE2 に作用していることが示された。ここまでの結果から解離した sACE2 は感染前のウイルスに結合し、細胞感染自体をブロックしている可能性がある。この仮定を

検討するため、最後に sACE2 が含まれる細胞培養液と模擬ウイルスの混合液を作製し、チオ NAD サイクリング ELISA によってこの混合液の測定を行い、吸光度による比較を行った。その結果、エストラジオール添加を行なった細胞培養液を混合した模擬ウイルスでは有意に吸光度が減少し、抗体への結合をブロックしていることがわかった。これにより、sACE2 は新型コロナウイルスのスパイクタンパク質に結合し、事前に細胞への感染を防御する役割も担っていることが示された。

エストラジオールを使った全ての研究結果から女性ホルモンであるエストラジオールは新型コロナウイルスが細胞へ感染する際の結合場所として知られる ACE2 に対して作用し、sACE2 として細胞から放出し、ACE2 の量を減少させ、細胞感染を減少させるとともに sACE2 が新型コロナウイルスのスパイクタンパク質に結合し、細胞感染を防御していることが示された。このメカニズムはいまだに解明されておらず、女性の新型コロナウイルス感染が男性と比較して少ないことの証明になったと言える。

付章

本研究の要であるチオ NAD サイクリング ELISA は様々な測定対象に応用が可能な検出法である。例として、同じ新型コロナウイルスを対象とした場合でも異なる環境を想定した測定を行うこともできる。先行研究で新型コロナウイルスは下水中や、汚水に多く存在していることがわかっており、そのウイルス量は約 10^5 copies/ μ L 程度含まれているという報告もある[89]。下水中の新型コロナウイルスを測定できれば、クラスター感染を引き起こしている地域をその場所ごとに特定することが可能となり、事前に感染の拡大を防ぐことができる。そこで応用研究の一環として、汚水の組成を模して作製した人工汚水を用いてリコンビナントタンパク質および不活性化ウイルスと混合させることで新型コロナウイルス含有の汚水とした。この、新型コロナウイルスが含まれた人工汚水をチオ NAD サイクリング ELISA によって測定を行なった (図 5-1 および図 5-2)。

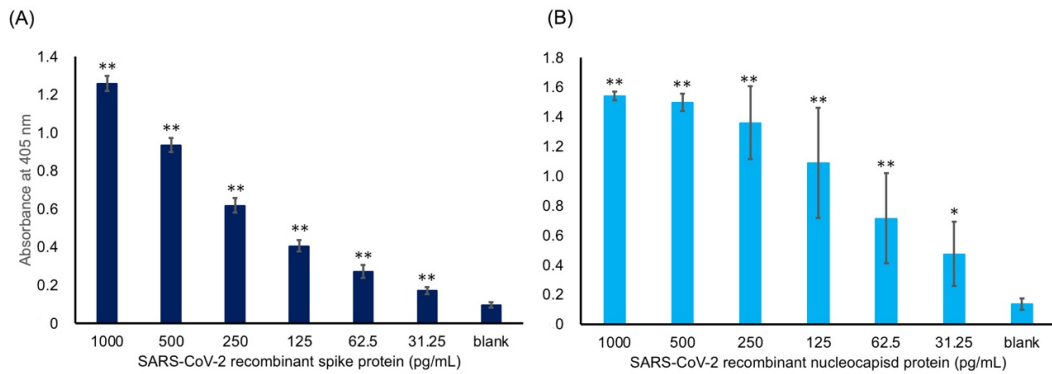


図 5-1：人工汚水に混合したリコンビナントタンパク質の測定

A：ヌクレオカプシドタンパク質の測定結果、B：S1 タンパク質の測定結果。3 人の実験者それぞれの結果をまとめ、合計同濃度 9 ウェルの測定結果の平均値および、標準偏差を使用してグラフ化した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ は、一元配置分散分析と Tukey test により、ブランクの値と比較した。

リコンビナントタンパク質を用いた測定結果は S1 タンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質どちらもブランクと比較して約 31 pg/mL まで有意にシグナルが高く、測定可能であることがわかった。この結果は溶液が人工汚水であっても、通常測定と同様に超高感度に測定可能であることが示唆された。

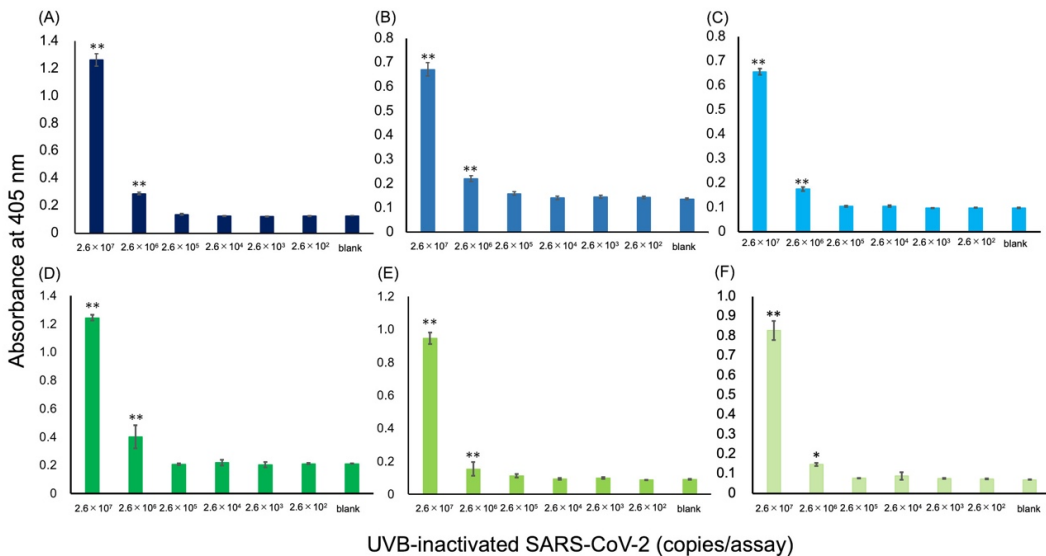


図 5-2：人工汚水と混合した不活性化ウイルスの測定

A～C：S1 タンパク質検出抗体を用いた汚水測定、D～E：ヌクレオカプシドタンパク質検出抗体を用いた測定。それぞれ 3 人の実験者によって測定を行った。 $*P$

<0.05, **P<0.01 は、一元配置分散分析と Tukey test により、ブランクの値と比較した。

不活性化ウイルスを用いた測定ではどちらの検出抗体を用いた場合でも約 10^6 copies/assay 以上の濃度で測定が可能であることがわかった。測定感度に関してはリコンビナントタンパク質の測定とは異なり、通常のパッファーを用いた測定と比較して 100 倍程度感度が落ちている結果になった。

リコンビナントタンパク質および不活性化ウイルスを用いた汚水中ウイルス測定は一定以上の感度が得られた。しかし、実際の検査に使用できるほどの感度を有しているとは言い難く、これからさらに改良の必要があることがわかった。まず、測定する際に、サンプルを遠心分離機によって、汚水中の夾雑物とウイルスに分離する作業を行なっている (図 5-3)。

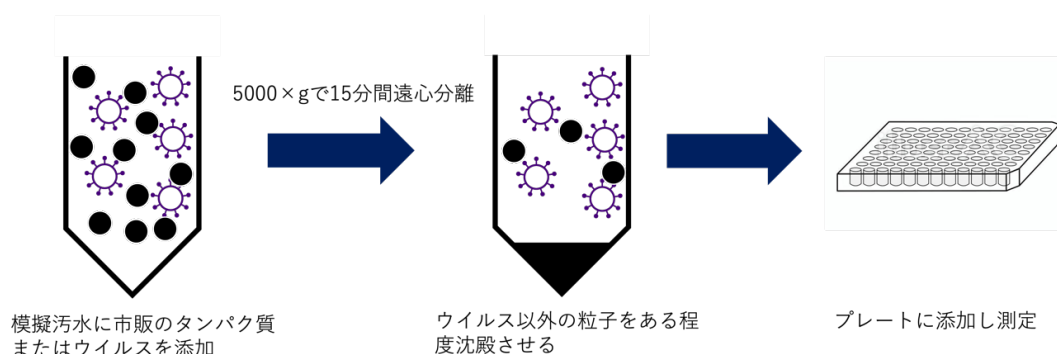


図 5-3：人工汚水を用いた新型コロナウイルス測定のサンプル処理の概要図

図 5-3 から 5000g を 15 分遠心することでウイルス以外の夾雑物の分離を行なった。分離できているのか目視の範囲で確認することが可能である。超遠心分離まで使用する必要はないため、測定機器に貴重なものは必要ないが、測定手順が増えてしまうことになる。したがってこの操作は測定感度を上げるためにも改善が必要であると考えている。

また、汚水中に存在する夾雑物も問題点としてあげられる。夾雑物には様々なタンパク質と物質が存在する。特に炭素分子が問題になると考えている。タンパク質は炭素と結合するため、測定する際に抗体との反応性が低くなる可能性がある。加えて、炭素と結合することで遠心分離によって夾雑物と分離を行う際にウイルス量も減少する可能性もある。これらの理由もあり、今回の汚水中ウイルス測定では検出感度が悪化することになってしまった。しかし、チオ NAD サイクリング ELISA の応用的な研究として測定可能であることを示唆することができたと考えている。

本研究により、新型コロナウイルスに対する新規抗原測定法としてチオ NAD サイクリング ELISA 法を確立することに成功し、S1 タンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質のリコンビナントタンパク質および UVB 照射した不活性化ウイルスを定量的かつ超高感度に測定できることが明らかになった。また、本手法の応用として、エストラジオールと ACE2 が可溶性して細胞から放出され、sACE2 として新型コロナウイルスの細胞感染に対する防御機構として働くメカニズムを明らかにした。エストラジオールと新型コロナウイルスの感染減少については以前から研究がなされていたが、ACE2 との関係性をタンパク質測定によって証明したのは本研究が初めてである。また、エストラジオールによって感染が減少する機構を解明したのも本研究が初である。これはチオ NAD サイクリング ELISA 法という超高感度かつ定量的に測定可能な手法を開発できたことが大きいと考える。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導とご教示を賜りました早稲田大学教育・総合科学学術院 伊藤悦朗教授に、深く感謝し心より御礼申し上げます。研究活動に限らず、様々な面において、熱心かつ温かなご指導を賜りましたこと、重ねて御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: *Nature*. 2020 Dec;588(7836):E6. PMID: 32015507; PMCID: PMC7095418.
- [2] Gupta P, Goyal K, Kanta P, Ghosh A, Singh MP. Novel 2019-coronavirus on new year's Eve. *Indian J Med Microbiol*. 2019 Oct-Dec;37(4):459-477. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_20_54. PMID: 32436867; PMCID: PMC7836853
- [3] Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, Meng J, Zhu Z, Zhang Z, Wang J, Sheng J, Quan L, Xia Z, Tan W, Cheng G, Jiang T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020 Mar 11;27(3):325-328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32035028; PMCID: PMC7154514.
- [4] Kyosei Y, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S, Ito E. Antigen tests for COVID-19. *Biophys Physicobiol*. 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004. PMID: 33954080; PMCID: PMC8049777.
- [5] Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Mar 31;117(13):7001-7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32165541; PMCID: PMC7132130.
- [6] Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, van Buskirk C, Grossman BJ, Joyner M, Henderson JP, Pekosz A, Lau B, Wesolowski A, Katz L, Shan H, Auwaerter PG, Thomas D, Sullivan DJ, Paneth N, Gehrie E, Spitalnik S, Hod EA, Pollack L, Nicholson WT, Pirofski LA, Bailey JA, Tobian AA. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest*. 2020 Jun 1;130(6):2757-2765. doi: 10.1172/JCI138745. PMID: 32254064; PMCID: PMC7259988.
- [7] Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, Lamers MM,

Sikkema RS, de Bruin E, Chandler FD, Yazdanpanah Y, Le Hingrat Q, Descamps D, Houhou-Fidouh N, Reusken CBEM, Bosch BJ, Drosten C, Koopmans MPG, Haagmans BL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1478-1488. doi: 10.3201/eid2607.200841. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32267220; PMCID: PMC7323511.

- [8] Dhamad AE, Abdal Rhida MA. COVID-19: molecular and serological detection methods. *PeerJ.* 2020 Oct 7;8:e10180. doi: 10.7717/peerj.10180. PMID: 33083156; PMCID: PMC7547594.
- [9] Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H, Beeman M, Mahmood T, Nze U, Gale BK. SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem.* 2021 Jan;413(1):49-71. doi: 10.1007/s00216-020-02958-1. Epub 2020 Oct 18. PMID: 33073312; PMCID: PMC7568947.
- [10] Prabhakar PK, Lakhanpal J. Recent advances in the nucleic acid-based diagnostic tool for coronavirus. *Mol Biol Rep.* 2020 Nov;47(11):9033-9041. doi: 10.1007/s11033-020-05889-3. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33025503; PMCID: PMC7538041.
- [11] Bordi L, Sberna G, Lalle E, Piselli P, Colavita F, Nicastrì E, Antinori A, Boumìs E, Petrosillo N, Marchioni L, Minnucci G, D'Agostini E, Castilletti C, Locatelli F, Zumla A, Ippolito G, Capobianchi MR, On Behalf Of Inmi ReCOVeRI Study Group. Frequency and Duration of SARS-CoV-2 Shedding in Oral Fluid Samples Assessed by a Modified Commercial Rapid Molecular Assay. *Viruses.* 2020 Oct 20;12(10):1184. doi: 10.3390/v12101184. PMID: 33092065; PMCID: PMC7589602.
- [12] Goudouris ES. Laboratory diagnosis of COVID-19. *J Pediatr (Rio J).* 2021 Jan-Feb;97(1):7-12. doi: 10.1016/j.jpeds.2020.08.001. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32882235; PMCID: PMC7456621.
- [13] Österdahl MF, Lee KA, Lochlainn MN, Wilson S, Douthwaite S, Horsfall R, Sheedy A, Goldenberg SD, Stanley CJ, Spector TD, Steves CJ. Detecting SARS-CoV-2 at point of care: preliminary data comparing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to polymerase chain reaction (PCR). *BMC Infect Dis.* 2020 Oct 20;20(1):783. doi: 10.1186/s12879-020-05484-8. PMID: 33081710; PMCID: PMC7574392.
- [14] Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future.

Biotechniques. 2020 Oct;69(4):317-325. doi: 10.2144/btn-2020-0057. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32815744; PMCID: PMC7439763.

- [15] Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)*. 2021 May;27(2):682-687. doi: 10.1016/j.radi.2020.09.010. Epub 2020 Sep 21. PMID: 33008761; PMCID: PMC7505601.
- [16] Hossein H, Ali KM, Hosseini M, Sarveazad A, Safari S, Yousefifard M. Value of chest computed tomography scan in diagnosis of COVID-19; a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Imaging*. 2020;8(6):469-481. doi: 10.1007/s40336-020-00387-9. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33072656; PMCID: PMC7549426.
- [17] Kovács A, Palásti P, Veréb D, Bozsik B, Palkó A, Kincses ZT. The sensitivity and specificity of chest CT in the diagnosis of COVID-19. *Eur Radiol*. 2021 May;31(5):2819-2824. doi: 10.1007/s00330-020-07347-x. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33051732; PMCID: PMC7553375.
- [18] Ria F, Fu W, Chalian H, Abadi E, Segars PW, Fricks R, Khoshpouri P, Samei E. A comparison of COVID-19 and imaging radiation risk in clinical patient populations. *J Radiol Prot*. 2020 Nov 11;40(4):10.1088/1361-6498/abbf3b. doi: 10.1088/1361-6498/abbf3b. PMID: 33027775; PMCID: PMC9757494.
- [19] Xu M, Wang D, Wang H, Zhang X, Liang T, Dai J, Li M, Zhang J, Zhang K, Xu D, Yu X. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. *Clin Transl Med*. 2020 Aug;10(4):e158. doi: 10.1002/ctm2.158. PMID: 32898340; PMCID: PMC7443140.
- [20] Iha K, Inada M, Kawada N, Nakaishi K, Watabe S, Tan YH, Shen C, Ke LY, Yoshimura T, Ito E. Ultrasensitive ELISA Developed for Diagnosis. *Diagnostics (Basel)*. 2019 Jul 18;9(3):78. doi: 10.3390/diagnostics9030078. PMID: 31323782; PMCID: PMC6787603.
- [21] Ito E, Iha K, Yoshimura T, Nakaishi K, Watabe S. Early diagnosis with ultrasensitive ELISA. *Adv Clin Chem*. 2021;101:121-133. doi: 10.1016/bs.acc.2020.06.002. Epub 2020 Jul 7. PMID: 33706887.
- [22] Yamura S, Kawada N, Yamakado S, Kyosei Y, Watabe S, Yoshimura T, Murase Y, Mitarai S, Ito E. Non-amplification nucleic acid detection with thio-NAD cycling. *J Microbiol Methods*. 2023 Jan;204:106647. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106647. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36496031.

- [23] Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeflang MM, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Aug 26;8(8):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Mar 24;3:CD013705. PMID: 32845525; PMCID: PMC8078202.
- [24] Candel FJ, Barreiro P, San Román J, Abanades JC, Barba R, Barberán J, Bibiano C, Canora J, Cantón R, Calvo C, Carretero M, Cava F, Delgado R, García-Rodríguez J, González Del Castillo J, González de Villambrosia C, Hernández M, Losa JE, Martínez-Peromingo FJ, Molero JM, Muñoz P, Onecha E, Onoda M, Rodríguez J, Sánchez-Celaya M, Serra JA, Zapatero A. Recommendations for use of antigenic tests in the diagnosis of acute SARS-CoV-2 infection in the second pandemic wave: attitude in different clinical settings. *Rev Esp Quimioter.* 2020 Dec;33(6):466-484. doi: 10.37201/req/120.2020. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33070578; PMCID: PMC7712344.
- [25] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6. PMID: 3431465.
- [26] Wagatsuma A, Sadamoto H, Kitahashi T, Lukowiak K, Urano A, Ito E. Determination of the exact copy numbers of particular mRNAs in a single cell by quantitative real-time RT-PCR. *J Exp Biol.* 2005 Jun;208(Pt 12):2389-98. doi: 10.1242/jeb.01625. PMID: 15939778.
- [27] Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem.* 2020 Apr 1;66(4):549-555. doi: 10.1093/clinchem/hvaa029. PMID: 32031583; PMCID: PMC7108203.
- [28] D'Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 4;8:468. doi: 10.3389/fcell.2020.00468. PMID: 32582718; PMCID: PMC7287038.
- [29] World Health Organization, Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic

tests for COVID-19. Available online: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>.

- [30] Science, Coronavirus antigen tests: quick and cheap, but too often wrong? Available online: <https://www.sciencemag.org/news/2020/05/coronavirus-antigen-tests-quick-and-cheap-too-often-wrong>.
- [31] Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Müller M, Höfling K, Matz B, Drosten C, Eis-Hübinger AM. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*. 2009 Oct;15(10):1662-4. doi: 10.3201/eid1510.091186. PMID: 19861069; PMCID: PMC2866420.
- [32] Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol*. 1999 Oct;59(2):215-20. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199910)59:2<215::aid-jmv15>3.0.co;2-j. PMID: 10459159.
- [33] Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104455. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455. Epub 2020 May 21. PMID: 32485618; PMCID: PMC7240272.
- [34] Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, Chan RC, Tsang DN. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32585619; PMCID: PMC7278630.
- [35] Mertens P, De Vos N, Martiny D, Jassoy C, Mirazimi A, Cuypers L, Van den Wijngaert S, Monteil V, Melin P, Stoffels K, Yin N, Mileto D, Delaunoy S, Magein H, Lagrou K, Bouzet J, Serrano G, Wautier M, Leclipteux T, Van Ranst M, Vandenberg O; LHUB-ULB SARS-CoV-2 Working Diagnostic Group. Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Front Med (Lausanne)*. 2020 May 8;7:225. doi:

10.3389/fmed.2020.00225. PMID: 32574326; PMCID: PMC7227790.

- [36] Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef MW, Imöhl M, Kleines M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *J Virol Methods*. 2021 Feb;288:114024. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114024. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227341; PMCID: PMC7678421.
- [37] Gupta A, Khurana S, Das R, Srigyan D, Singh A, Mittal A, Singh P, Soneja M, Kumar A, Singh AK, Soni KD, Meena S, Aggarwal R, Sharad N, Aggarwal A, Kadnur H, George N, Singh K, Desai D, Trilangi P, Khan AR, Kiro VV, Naik S, Arunan B, Goel S, Patidar D, Lathwal A, Dar L, Trikha A, Pandey RM, Malhotra R, Guleria R, Mathur P, Wig N. Rapid chromatographic immunoassay-based evaluation of COVID-19: A cross-sectional, diagnostic test accuracy study & its implications for COVID-19 management in India. *Indian J Med Res*. 2021 Jan & Feb;153(1 & 2):126-131. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_3305_20. PMID: 33818469; PMCID: PMC8184078.
- [38] Cerutti F, Burdino E, Milia MG, Allice T, Gregori G, Bruzzone B, Ghisetti V. Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: Evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2. *J Clin Virol*. 2020 Nov;132:104654. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104654. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33053494; PMCID: PMC7522649.
- [39] Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, Martínez M, Poujois S, Forqué L, Valdivia A, Solano de la Asunción C, Ferrer J, Colomina J, Navarro D. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Mar;27(3):472.e7-472.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.004. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33189872; PMCID: PMC7662075.
- [40] Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, Romanyk J, Pérez-García F, Gómez-Herruz P, Arroyo T, Cuadros J. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol*. 2020 Dec;133:104659. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104659. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33160179; PMCID: PMC7561603.

- [41] Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, Angkasekwinai N, Sutthent R, Puangpunngam N, Tharmviboonsri T, Pongraweevan O, Chuthapisith S, Sirivatanauksorn Y, Kantakamalakul W, Horthongkham N. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virol J.* 2020 Nov 13;17(1):177. doi: 10.1186/s12985-020-01452-5. PMID: 33187528; PMCID: PMC7665091.
- [42] Young S, Taylor SN, Cammarata CL, Varnado KG, Roger-Dalbert C, Montano A, Griego-Fullbright C, Burgard C, Fernandez C, Eckert K, Andrews JC, Ren H, Allen J, Ackerman R, Cooper CK. Clinical Evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 Point-of-Care Test Performance Compared to PCR-Based Testing and versus the Sofia 2 SARS Antigen Point-of-Care Test. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1):e02338-20. doi: 10.1128/JCM.02338-20. PMID: 33023911; PMCID: PMC7771450.
- [43] Abbott, PANBIOTM COVID-19 Ag RAPID TEST DEVICE. Available online: <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/panbio-covid-19-ag-antigen-test.html>.
- [44] SD BIOSENSOR, STANDARD Q COVID-19 Ag, Available online: <http://sdbiosensor.com/xc/product/7672>.
- [45] Nicol T, Lefevre C, Serri O, Pivert A, Joubaud F, Dubée V, Kouatchet A, Ducancelle A, Lunel-Fabiani F, Le Guillou-Guillemette H. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol.* 2020 Aug;129:104511. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104511. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32593133; PMCID: PMC7295485.
- [46] Schildgen V, Demuth S, Lüsebrink J, Schildgen O. Limits and Opportunities of SARS-CoV-2 Antigen Rapid Tests: An Experienced-Based Perspective. *Pathogens.* 2021 Jan 5;10(1):38. doi: 10.3390/pathogens10010038. PMID: 33466537; PMCID: PMC7824818.
- [47] Khairat, S. M., Guindy, N. E. L., Motaleb, M. S. E. A. & Soliman, N. S.

Evaluation of two rapid antigen tests for detection of SARS-CoV-2 virus. *Int. J. Microbiol. Biotechnol.* 5, 131–134 (2020). DOI: 10.11648/j.ijmb.20200503.18

- [48] Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Approval of In Vitro Diagnostics for the novel coronavirus infection. Available online: <https://www.pmda.go.jp/files/000235116.pdf>.
- [49] Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, Sueki H, Hayakawa M, Mochizuki H, Tsutsui T, Kakizaki Y, Miyashita Y, Yagi S, Kojima S, Omata M. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis.* 2020 Oct;99:397-402. doi: 10.1016/j.ijid.2020.08.029. Epub 2020 Aug 12. PMID: 32800855; PMCID: PMC7422837.
- [50] Ogawa T, Fukumori T, Nishihara Y, Sekine T, Okuda N, Nishimura T, Fujikura H, Hirai N, Imakita N, Kasahara K. Another false-positive problem for a SARS-CoV-2 antigen test in Japan. *J Clin Virol.* 2020 Oct;131:104612. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104612. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32871543; PMCID: PMC7445490.
- [51] Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Clinical Management of Patients with COVID-19. Available online: <https://www.mhlw.go.jp/content/000646531.pdf>
- [52] Porte L, Legarraga P, Vollrath V, Aguilera X, Munita JM, Araos R, Pizarro G, Vial P, Iruretagoyena M, Dittrich S, Weitzel T. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis.* 2020 Oct;99:328-333. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.098. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32497809; PMCID: PMC7263236.
- [53] Diao B, Wen K, Zhang J, Chen J, Han C, Chen Y, Wang S, Deng G, Zhou H, Wu Y. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Feb;27(2):289.e1-289.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.057. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33031947; PMCID: PMC7534827.

- [54] Liu D, Ju C, Han C, Shi R, Chen X, Duan D, Yan J, Yan X. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen. *Biosens Bioelectron.* 2020 Nov 13;173:112817. doi: 10.1016/j.bios.2020.112817. Epub ahead of print. PMID: 33221508; PMCID: PMC7661926.
- [55] Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015 Oct;72:4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25908411.
- [56] LOWRY OH, PASSONNEAU JV, SCHULZ DW, ROCK MK. The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. *J Biol Chem.* 1961 Oct;236:2746-55. PMID: 14466981.
- [57] Kato T, Berger SJ, Carter JA, Lowry OH. An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. *Anal Biochem.* 1973 May;53(1):86-97. doi: 10.1016/0003-2697(73)90409-0. PMID: 4351123.
- [58] Iwai A, Yoshimura T, Wada K, Watabe S, Sakamoto Y, Ito E, Miura T. Spectrophotometric method for the assay of steroid 5 α -reductase activity of rat liver and prostate microsomes. *Anal Sci.* 2013;29(4):455-9. doi: 10.2116/analsci.29.455. PMID: 23574674.
- [59] Skålhegg BA. 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*: kinetic properties with NAD and its thionicotinamide analogue. *Eur J Biochem.* 1975 Jan 15;50(3):603-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb09901.x. PMID: 234846.
- [60] Watabe S, Kodama H, Kaneda M, Morikawa M, Nakaishi K, Yoshimura T, Iwai A, Miura T, Ito E. Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of proteins by combination with the thio-NAD cycling method. *Biophysics (Nagoya-shi).* 2014 Sep 5;10:49-54. doi: 10.2142/biophysics.10.49. PMID: 27493498; PMCID: PMC4629663.
- [61] Iha K, Kyosei Y, Namba M, Makioka D, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Ito E.

Zeptomole Detection of an Enzyme by a Simple Colorimetric Method. *Anal Sci.* 2021 Oct 10;37(10):1469-1472. doi: 10.2116/analsci.21N009. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33746140.

- [62] Zabiegala A, Kim Y, Chang KO. Roles of host proteases in the entry of SARS-CoV-2. *Anim Dis.* 2023;3(1):12. doi: 10.1186/s44149-023-00075-x. Epub 2023 Apr 25. PMID: 37128508; PMCID: PMC10125864.
- [63] Chappell MC. Renin-Angiotensin System and Sex Differences in COVID-19: A Critical Assessment. *Circ Res.* 2023 May 12;132(10):1320-1337. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321883. Epub 2023 May 11. PMID: 37167353; PMCID: PMC10171311.
- [64] Rushovich T, Boulicault M, Chen JT, Danielsen AC, Tarrant A, Richardson SS, Shattuck-Heidorn H. Sex Disparities in COVID-19 Mortality Vary Across US Racial Groups. *J Gen Intern Med.* 2021 Jun;36(6):1696-1701. doi: 10.1007/s11606-021-06699-4. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33818679; PMCID: PMC8020825.
- [65] Kartsonaki C, Baillie JK, Barrio NG, Baruch J, Beane A, Blumberg L, Bozza F, Broadley T, Burrell A, Carson G, Citarella BW, Dagens A, Dankwa EA, Donnelly CA, Dunning J, Elotmani L, Escher M, Farshait N, Goffard JC, Gonçalves BP, Hall M, Hashmi M, Sim Lim Heng B, Ho A, Jassat W, Pedrera Jiménez M, Laouenan C, Lissauer S, Martin-Loeches I, Mentré F, Merson L, Morton B, Munblit D, Nekliudov NA, Nichol AD, Singh Oinam BC, Ong D, Panda PK, Petrovic M, Pritchard MG, Ramakrishnan N, Ramos GV, Roger C, Sandulescu O, Semple MG, Sharma P, Sigfrid L, Somers EC, Streinu-Cercel A, Taccone F, Vecham PK, Kumar Tirupakuzhi Vijayaraghavan B, Wei J, Wils EJ, Ci Wong X, Horby P, Rojek A, Olliaro PL; ISARIC Clinical Characterisation Group. Characteristics and outcomes of an international cohort of 600 000 hospitalized patients with COVID-19. *Int J Epidemiol.* 2023 Apr 19;52(2):355-376. doi: 10.1093/ije/dyad012. PMID: 36850054; PMCID: PMC10114094.
- [66] Sauerwald N, Zhang Z, Ramos I, Nair VD, Soares-Schanoski A, Ge Y, Mao W, Alshammary H, Gonzalez-Reiche AS, van de Guchte A, Goforth CW, Lizewski RA, Lizewski SE, Amper MAS, Vasoya M, Seenarine N, Guevara K, Marjanovic N, Miller CM, Nudelman G, Schilling MA, Sealfon RSG, Termini MS, Vangeti S, Weir

DL, Zaslavsky E, Chikina M, Wu YN, Van Bakel H, Letizia AG, Sealfon SC, Troyanskaya OG. Pre-infection antiviral innate immunity contributes to sex differences in SARS-CoV-2 infection. *Cell Syst.* 2022 Nov 16;13(11):924-931.e4. doi: 10.1016/j.cels.2022.10.005. Epub 2022 Nov 1. PMID: 36323307; PMCID: PMC9623453.

[67] Rahimi G, Rahimi B, Panahi M, Abkhiz S, Saraygord-Afshari N, Milani M, Alizadeh E. An overview of Betacoronaviruses-associated severe respiratory syndromes, focusing on sex-type-specific immune responses. *Int Immunopharmacol.* 2021 Mar;92:107365. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107365. Epub 2021 Jan 10. PMID: 33440306; PMCID: PMC7797024.

[68] Zovi A, Ferrara F, Langella R, Cavallaro F, Vitiello A. Sex affects immune response capacity against COVID-19 infection. *Rev Med Virol.* 2023 Jul;33(4):e2450. doi: 10.1002/rmv.2450. Epub 2023 Apr 16. PMID: 37062916.

[69] Lemes RMR, Costa AJ, Bartolomeo CS, Bassani TB, Nishino MS, Pereira GJDS, Smaili SS, Maciel RMB, Braconi CT, da Cruz EF, Ramirez AL, Maricatto JT, Janini LMR, Prado CM, Stilhano RS, Ureshino RP. 17 β -estradiol reduces SARS-CoV-2 infection in vitro. *Physiol Rep.* 2021 Jan;9(2):e14707. doi: 10.14814/phy2.14707. PMID: 33463909; PMCID: PMC7814496.

[70] Kyosei Y, Namba M, Makioka D, Kokubun A, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Proteins Using the Thio-NAD Cycling Reaction: A Preliminary Study before Clinical Trials. *Microorganisms.* 2021 Oct 25;9(11):2214. doi: 10.3390/microorganisms9112214. PMID: 34835340; PMCID: PMC8619787.

[71] Kyosei Y, Namba M, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Improved Detection Sensitivity of an Antigen Test for SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins with Thio-NAD Cycling. *Biol Pharm Bull.* 2021 Sep 1;44(9):1332-1336. doi: 10.1248/bpb.b21-00387. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34148926.

[72] Kyosei Y, Namba M, Yamura S, Takeuchi R, Aoki N, Nakaishi K, Watabe S, Ito E. Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel).* 2020 Aug 14;10(8):594. doi:

10.3390/diagnostics10080594. PMID: 32823866; PMCID: PMC7459804.

- [73] J. Justin Gooding. What Does Ultrasensitive Really Mean? *ACS Sens.* 2019 Mar 22;4(3):528. doi: 10.1021/acssensors.9b00404. PMID: 30897907.
- [74] Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ. Analysis of Inactivation of SARS-CoV-2 by Specimen Transport Media, Nucleic Acid Extraction Reagents, Detergents, and Fixatives. *J Clin Microbiol.* 2020 Oct 21;58(11):e01713-20. doi: 10.1128/JCM.01713-20. PMID: 32839250; PMCID: PMC7587104.
- [75] Biasin M, Bianco A, Pareschi G, Cavalleri A, Cavatorta C, Fenizia C, Galli P, Lessio L, Lualdi M, Tombetti E, Ambrosi A, Redaelli EMA, Saulle I, Trabattoni D, Zanutta A, Clerici M. UV-C irradiation is highly effective in inactivating SARS-CoV-2 replication. *Sci Rep.* 2021 Mar 18;11(1):6260. doi: 10.1038/s41598-021-85425-w. PMID: 33737536; PMCID: PMC7973506.
- [76] Biasin M, Strizzi S, Bianco A, Macchi A, Utyro O, Pareschi G, Loffreda A, Cavalleri A, Lualdi M, Trabattoni D, Tacchetti C, Mazza D, Clerici M. UV and violet light can Neutralize SARS-CoV-2 Infectivity. *J Photochem Photobiol.* 2022 Jun;10:100107. doi: 10.1016/j.jpap.2021.100107. Epub 2022 Jan 8. PMID: 35036965; PMCID: PMC8741330.
- [77] Liotti FM, Menchinelli G, Lalle E, Palucci I, Marchetti S, Colavita F, La Sorda M, Sberna G, Bordi L, Sanguinetti M, Cattani P, Capobianchi MR, Posteraro B. Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Mar;27(3):487-488. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.030. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32979567; PMCID: PMC7510559.
- [78] Sender R, Bar-On YM, Gleizer S, Bernshtein B, Flamholz A, Phillips R, Milo R. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jun 22;118(25):e2024815118. doi: 10.1073/pnas.2024815118. PMID: 34083352; PMCID: PMC8237675.

- [79] Cubas-Atienzar AI, Kontogianni K, Edwards T, Wooding D, Buist K, Thompson CR, Williams CT, Patterson EI, Hughes GL, Baldwin L, Escadafal C, Sacks JA, Adams ER. Limit of detection in different matrices of 19 commercially available rapid antigen tests for the detection of SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2021 Sep 15;11(1):18313. doi: 10.1038/s41598-021-97489-9. PMID: 34526517; PMCID: PMC8443584.
- [80] Patterson EI, Prince T, Anderson ER, Casas-Sanchez A, Smith SL, Cansado-Utrilla C, Solomon T, Griffiths MJ, Acosta-Serrano Á, Turtle L, Hughes GL. Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. *J Infect Dis.* 2020 Oct 1;222(9):1462-1467. doi: 10.1093/infdis/jiaa507. PMID: 32798217; PMCID: PMC7529010.
- [81] Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, Nagata N, Sekizuka T, Katoh H, Kato F, Sakata M, Tahara M, Kutsuna S, Ohmagari N, Kuroda M, Suzuki T, Kageyama T, Takeda M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar 31;117(13):7001-7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32165541; PMCID: PMC7132130.
- [82] Kyosei Y, Yoshimura T, Ito E. Removal of Soluble ACE2 in VeroE6 Cells by 17 β -Estradiol Reduces SARS-CoV-2 Infectivity. *Biol Pharm Bull.* 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21. PMID: 37866890.
- [83] Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1686-92. PMID: 11245484.
- [84] Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4180-4. PMID: 10485450.
- [85] Lucas JM, True L, Hawley S, Matsumura M, Morrissey C, Vessella R, Nelson PS. The androgen-regulated type II serine protease TMPRSS2 is differentially expressed and mislocalized in prostate adenocarcinoma. *J Pathol.* 2008 Jun;215(2):118-25. doi:

10.1002/path.2330. PMID: 18338334.

- [86] Clinckemalie L, Spans L, Dubois V, Laurent M, Helsen C, Joniau S, Claessens F. Androgen regulation of the TMPRSS2 gene and the effect of a SNP in an androgen response element. *Mol Endocrinol.* 2013 Dec;27(12):2028-40. doi: 10.1210/me.2013-1098. Epub 2013 Oct 9. PMID: 24109594; PMCID: PMC5426606.
- [87] Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4180-4. PMID: 10485450.
- [88] Lukiw WJ, Pogue A, Hill JM. SARS-CoV-2 Infectivity and Neurological Targets in the Brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2022 Jan;42(1):217-224. doi: 10.1007/s10571-020-00947-7. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32840758; PMCID: PMC7445393.
- [89] Yaniv K, Shagan M, Lewis YE, Kramarsky-Winter E, Weil M, Indenbaum V, Elul M, Erster O, Brown AS, Mendelson E, Mannasse B, Shirazi R, Lakkakula S, Miron O, Rinott E, Baibich RG, Bigler I, Malul M, Rishti R, Brenner A, Friedler E, Gilboa Y, Sabach S, Alfiya Y, Cheruti U, Nadav Davidovich, Moran-Gilad J, Berchenko Y, Bar-Or I, Kushmaro A. City-level SARS-CoV-2 sewage surveillance. *Chemosphere.* 2021 Nov;283:131194. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131194. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34467943; PMCID: PMC8217074.

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：教誓 祐太

印

(2023年12月4日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ [1] <u>Kvosei Y.</u>, Yoshimura T, Ito E. Removal of Soluble ACE2 in VeroE6 Cells by 17β-Estradiol Reduces SARS-CoV-2 Infectivity. <i>Biol Pharm Bull.</i> 2023 Dec 1;46(12):1842-1845. doi: 10.1248/bpb.b23-00568. Epub 2023 Oct 21. PMID: 37866890.</p> <p>[2] Yamura S, Kawada N, Yamakado S, <u>Kvosei Y.</u>, Watabe S, Yoshimura T, Murase Y, Mitarai S, Ito E. Non-amplification nucleic acid detection with thio-NAD cycling. <i>J Microbiol Methods.</i> 2023 Jan;204:106647. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106647. Epub 2022 Dec 7. PMID: 36496031.</p> <p>○ [3] <u>Kvosei Y.</u>, Namba M, Makioka D, Kokubun A, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Proteins Using the Thio-NAD Cycling Reaction: A Preliminary Study before Clinical Trials. <i>Microorganisms.</i> 2021 Oct 25;9(11):2214. doi: 10.3390/microorganisms9112214. PMID: 34835340; PMCID: PMC8619787.</p> <p>○ [4] <u>Kvosei Y.</u>, Namba M, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E. Improved Detection Sensitivity of an Antigen Test for SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins with Thio-NAD Cycling. <i>Biol Pharm Bull.</i> 2021 Sep 1;44(9):1332-1336. doi: 10.1248/bpb.b21-00387. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34148926.</p> <p>[5] Iha K, <u>Kvosei Y.</u>, Namba M, Makioka D, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Zeptomole Detection of an Enzyme by a Simple Colorimetric Method. <i>Anal Sci.</i> 2021 Oct 10;37(10):1469-1472. doi:10.2116/analsci.21N009. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33746140.</p> <p>○ [6] <u>Kvosei Y.</u>, Namba M, Yamura S, Takeuchi R, Aoki N, Nakaishi K, Watabe S, Ito E. Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2. <i>Diagnostics (Basel).</i> 2020 Aug 14;10(8):594. doi: 10.3390/diagnostics10080594. PMID: 32823866; PMCID: PMC7459804.</p>
総説	<p>[1] Tsurusawa N, Chang J, Namba M, Makioka D, Yamura S, Iha K, <u>Kvosei Y.</u>, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. <i>J Clin Med.</i> 2021 Nov 7;10(21):5197. doi: 10.3390/jcm10215197. PMID: 34768717; PMCID: PMC8585087.</p> <p>[2] <u>Kvosei Y.</u>, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S, Ito E. Antigen tests for COVID-19. <i>Biophys Physicobiol.</i> 2021 Feb 10;18:28-39. doi: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004. PMID: 33954080; PMCID: PMC8049777.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 教誓 祐太

印

(2023年12月4日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表	<p>[1] 教誓祐太, 伊藤悦朗. アミロイドβ42と40検出のためのチオNADサイクリングELISA法の開発 第61回 日本生物物理学会 (2023年11月14日-16日)</p> <p>[2] 教誓祐太, 矢村蒼, 難波茉由里, 吉村昭毅, 伊藤悦朗. チオNADサイクリングELISA法による新型コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスA型の模擬汚水測定 第143年会日本薬学会 (2023年3月25日-28日)</p> <p>[3] 教誓祐太, 矢村蒼, 難波茉由里, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルス並びにインフルエンザウイルスA型を検出するチオNADサイクリングELISA法の開発 第60回日本生物物理学会 (2022年9月28日-30日)</p> <p>[4] 教誓祐太, 難波茉由里, 吉村昭毅, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルスのスパイク並びにヌクレオカプシドタンパク質における超高感度ELISA法の開発 第142回 日本薬学会オンライン大会 (2022年3月25日-28日)</p> <p>[5] Yuta kyosei, Naoki Kawada, Jyun-Hao Chang, Kanako Iha, Masatoshi Okamatsu, Yoshihiro Sakoda, Teruki Yoshimura, Rikiya Takeuchi, Toshiya Ohta, Kazunari Nakaishi, Satoshi Watabe, Etsuro Ito “Application of Ultrasensitive ELISA to Detection Nucleic Acids and Proteins:Avian Influenza Virus RNAand DENV NS1 Protein”ASM Microbe オンライン開催 (2020年6月17日-23日)</p>
日本語解説	<p>[1] 教誓祐太, 渡部聡, 伊藤悦朗. 超高感度抗原検査法の開発と応用 月刊ファームステージ 21巻5号 58-67ページ 2021年8月15日発行</p> <p>[2] 教誓祐太, 伊藤悦朗. 新型コロナウイルスの超高感度測定 生物物理 61巻2号 107-109ページ 2021年3月15日発行</p>
獲得研究費	<p>[1] 日本学術振興会 特別研究員(DC2) 2022年-2024年度</p> <p>[2] 早稲田大学 若手研究者育成・支援事業「アーリーバードプログラム」 2021年度</p> <p>[3] 早稲田オープン・イノベーション・エコシステム挑戦的研究プログラム(W-SPRING) 2021年-2022年度(途中辞退)</p>