

迅速性・高感度の両立に向けた多粒子格納型デジタルイムノアッセイ技術の開発

(産総研¹) ○福田 隆史¹・安浦 雅人¹・堀口 諭吉¹・芦葉 裕樹¹・陳 政霖¹
Development of multiparticle-concentrated digital immunoassay (MCDIA) for a virus detection technology baring both rapidity and high sensitivity (¹ *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*) ○Takashi Fukuda¹, Masato Yasuura¹, Yukichi Horiguchi¹, Hiroki Ashiba¹, Zheng Lin Tan¹

To exit from the COVID-19 pandemic without compromising social security, it is important to develop a reliable virus detection system with high sensitivity and fast detection time. While the PCR method has been established as the gold standard for virus detection, it takes more than 2 hours through nucleic acid extraction, reaction, and quantification, which is not enough as a rapid detection system. The case of rapid PCR detection devices, false negatives for samples of Ct > 30 has been reported¹⁾. Therefore, a development of rapid and highly sensitive virus detection system is attractive theme. Here, we report a novel, highly efficient, and sensitive virus detection method based on surface-modified magnetic particles: multiparticle-concentrated digital immunoassay (MCDIA). Influenza A virus (IAV) particles in a specimen were captured by a high concentration of antibody-modified magnetic particles. Magnetic particles with IAV were enclosed in a well array for digital detection based on the signal intensity from a fluorogenic substrate, 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) released by enzymatic hydrolysis by neuraminidase, an IAV surface protein. Our developed method is characterized by the volume of each well at sub-pL, thus a large number of magnetic particles could be trapped in each well. As a result, we have successfully achieved the limit of detection of 100 copies/mL of IAV within 20 minutes of a reaction time²⁾. Furthermore, we have improved the MCDIA protocol and succeeded in developing a sandwich assay that functions without virus-specific proteins-reacting fluorescent substrate. SARS-CoV-2 is trapped by antibody-modified magnetic particles and labeled with a β -galactosidase-labeled antibody, which releases resorufin, a fluorophore from resorufin β -D-galactopyranoside. We have achieved > 100 times higher sensitivity (100 TCID₅₀/mL) within a shorter reaction time (3 minutes) compared to existing antigen test kits.

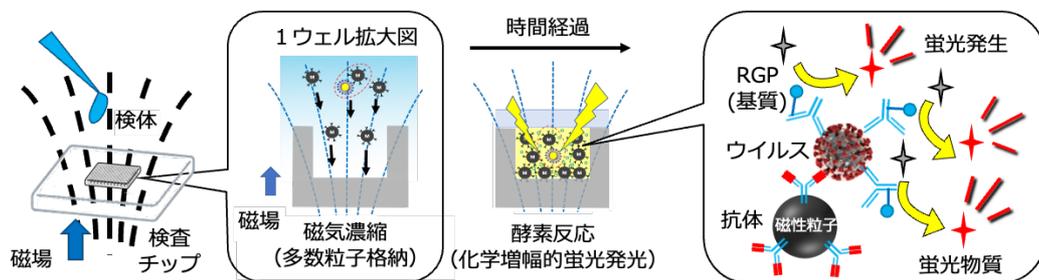
Our developed method could facilitate rapid detection with a low false negative rate, which could be an effective tool for on-site testing and help to control viral infection.

Keywords : new coronavirus (SARS-CoV-2); virus testing method; antibody modified magnetic particle; sub-pL well; multiparticle-concentrated digital immunoassay

コロナ禍からの脱却に向け、安心・安全を犠牲にすることなく活発な社会・経済活動の再始動を図るには、高感度・迅速性を兼ね備えた信頼性の高いウイルス検査法の普及が必須である。新型コロナウイルス検出に多く用いられた PCR 検査は、高感度で信頼性の高いウイルス検査法ではあるが核酸抽出～検出・定量に 2 時間程度と迅速性に欠ける。迅速化した PCR 検査装置も複数の医療機器メーカーから販売されているが、Ct > 30 の低濃度検体に対しては偽陰性による見落としが多くなる¹⁾との報告も

あり、高感度・迅速性の両立には至っていない。そこで、我々は、高性能抗体で表面修飾された磁性粒子を用いた独自の多粒子格納型デジタル免疫アッセイ (Multiparticle-concentrated digital immunoassay, MCDIA)を開発し、高感度と迅速性の両立を図った。検体中のインフルエンザ A ウイルス(IAV)を高濃度の抗体修飾磁性粒子により捕捉し、ノイラミニダーゼ (IAV の表面タンパク質) によって高効率に酵素分解される蛍光基質 MUNANA (2'-(4-Methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid)と共にウェルアレイに封じてデジタル検出を行うものであるが、(一般的なデジタル ELISA では数十 fL なことに比して) 我々の系では各ウェル体積がサブ pL オーダーであり、各ウェルに多数の磁性粒子を格納している(実質的な濃縮を施している)点の特徴である。これにより、IAV 100 copies/mL の最小検出感度を反応時間 20 分で達成することに成功している²⁾。さらに、MCDIA のプロトコル改良を進め、ウイルス固有のタンパク質に反応する蛍光基質が無くとも適用可能なサンドイッチアッセイタイプの検出系の開発にも成功した。抗体修飾磁性粒子と酵素(β -galactosidase, β -Gal)標識抗体で新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を挟み込み、 β -Gal で分解される蛍光基質 RGP (Resorufin β -D-Galactopyranoside)と共にウェルアレイに封入することで、既存の迅速検査キットよりも短い反応時間 (3 分) で 100 倍以上の高感度 (100 TCID₅₀/mL) の達成に成功した。

この方法によれば、見逃しのない迅速検査が可能となり、さまざまな施設に対するウイルスの持ち込みの防止など、その場検査の有効なツールとなるものと期待できる。



多粒子格納方式の採用により、実効的な濃縮が実現、**+** ウイルスを多数の標識が取り巻き、
マイクロウェルアレイ採用によるデジタル計測 (**高感度化**) **+** 多数の蛍光物質を産生 (**迅速化**)

提案する多粒子格納型デジタル免疫アッセイの特徴とその概念図

- 1) Comparison of Cepheid Xpert Xpress and Abbott ID Now to Roche cobas for the Rapid Detection of SARS-CoV-2. M. C. Smithgall, I. Scherberkova, S. Whittier, D. A. Green, *J. Clin. Virol.* **2020**, *128*, 104428.
- 2) Quick and ultra-sensitive digital assay of influenza virus using sub-picoliter microwells. H. Ashiba, M. Yasuura, T. Fukuda, K. Hatano, M. Fujimaki, *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1213*, 339926.

【謝辞】本研究の成果の一部は新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託業務(JPNP19005)、および、JSPS 科研費 JP21H01466, TIA 連携プログラム探索推進事業かけはしの支援によるものです。また、研究遂行にあたり、筑波大学 川口敦史 先生、東京大学 中木戸誠 先生には貴重なご指導とご協力を賜りました。ここに感謝申し上げます。