Millipore®
Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products

Application Note

ヒト血清および血漿中の SARS-CoV-2 抗原タンパク質に対する抗体検出のためのマルチプレックスアッセイ

Christine Kornmeier および Xiao Qiang

はじめに

SARS-CoV-2 コロナウイルスは、ヒトの COVID-19 の原因となる病原体です。2019 年 12 月に中国・武漢で初めて発見されて以来、この疾患は世界的なパンデミックとなっています。SARS-CoV-2 は、ヒトに感染する同定済みの 7 種類のコロナウイルスの 1 つであり、SARS-CoV および MERS-CoV とともに、重篤な疾患を引き起こすことがあります。その他のタイプのコロナウイルス (229E、NL63、OC43、HKU1) は、風邪に似た症状を示します。

複数のタンパク質が SARS-CoV-2 ウイルスを形成します。ウイルスの「コロナ (王冠様突起) 」を形成するスパイクタンパク質 (S) は、受容体結合ドメイン (RBD) を含むサブユニット 1 (S1) と、サブユニット 2 (S2) から構成されます。スパイクタンパク質 (S) は、膜糖タンパク質 (M) とエンベロープタンパク質 (E) の周りを取り囲んでおり、それらの内側にはヌクレオカプシドタンパク質 (N) に封入されたウイルス RNA があります (**図 1**) 。

SARS-CoV-2 ウイルス RBD タンパク質は、肺、心臓、動脈、腸、および腎臓などの複数の臓器の細胞にあるヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE-2) 受容体に結合します。結合すると、ウイルスは細胞内に侵入し、複製・放出という感染サイクルを繰り返します。

これらのウイルスタンパク質はそれぞれ、感染の際に生成される抗体の抗原となり得ます。早期に生成される抗体は、鼻腔および腸の粘膜組織で形成される免疫グロブリン A (IgA) 、および体液性免疫グロブリン M (IgM) です。その後、体液性免疫グロブリン G (IgG) が生成され、疾患に対する持続的な免疫が得られます。3 種類の免疫グロブリン全てが、血清および血漿サンプル中で測定可能です。

COVID-19 患者の血清／血漿サンプルの SARS-CoV-2 抗原に対する免疫グロブリン反応を測定することにより、SARS-CoV-2 ウイルスに曝され、ある程度の免疫応答を示す人を同定できます。COVID-19 の感染と回復過程における、このウイルスに対する免疫応答をさらに理解できる可能性があります。

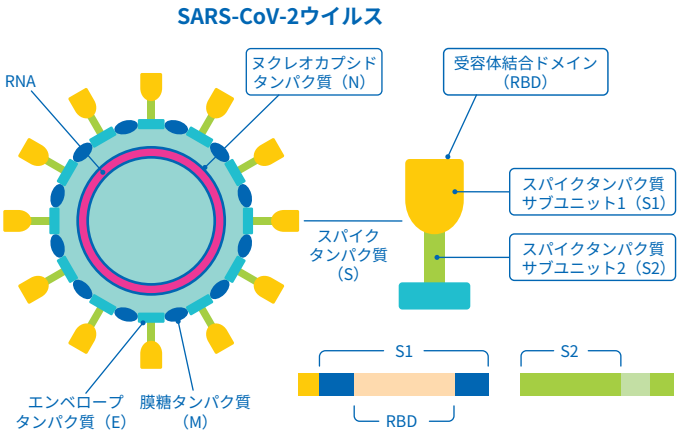

図 1　SARS-CoV-2 コロナウイルスの抗原タンパク質

マルチプレックスアッセイ

弊社は、診断目的ではなく、研究目的 (RUO) 用に、3 種類の MILLIPLEX® アッセイキットを開発しました。このキットは、ヒト血清／血漿サンプルで検証済みです。各キットで、SARS-CoV-2 抗原タンパク質アナライトである S1、S2、RBD、および N に対する IgG、IgA、または IgM 抗体を検出することができます (**表 1**) 。全てのアナライトを使用することも、その一部だけ選択して使用することもできます。各キットにはアッセイの実施に必要な全ての試薬と 96 ウェルプレートが同梱されています。

MILLIPLEX Assay Kits 96-well Plate Format	カタログ番号
SARS-CoV-2 Antigen Panel 1 IgM	**HC19SERM1-85K**
SARS-CoV-2 Antigen Panel 1 IgG	**HC19SERG1-85K**
SARS-CoV-2 Antigen Panel 1 IgA	**HC19SERA1-85K**
各パネルで入手可能なアナライト	
SARS-CoV-2 Spike Subunit 1 (S1)	
SARS-CoV-2 Spike Subunit 2 (S2)	
SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain (RBD)	
SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein (N)	

表 1　COVID-19 研究用 MILLIPLEX アッセイキット

使用は研究用途に限り、臨床または医療診断目的で使用することはできません。

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

MILLIPLEX アッセイキットは、Luminex® xMAP® 技術を使用しています。いずれの Luminex 機器システムでも中央蛍光強度（MFI）の結果を読み取ることができます（**図 2**）。この技術の中核となるのは Luminex MagPlex™ 磁性マイクロビーズです。それらのビーズは 2 種類の蛍光色素を異なる割合で段階的に染色されており、各ビーズ固有値（ビーズ番号）で識別されます。蛍光色素であるフィコエリスリン（PE）により、アッセイアナライトの検出シグナルが得られます。

図 2　Luminex 200 ™、FLEXMAP 3D ™、および MAGPIX® 機器

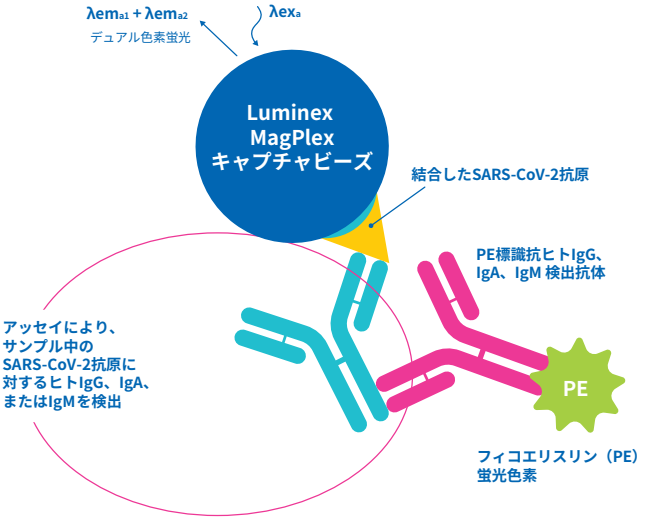

図 3　キットの MILLIPLEX アッセイ

3 種類の MILLIPLEX SARS-CoV-2 抗原パネルは、MagPlex ビーズの各ビーズに特異的に結合させた SARS-CoV-2 抗原を使用します（**図 3**）。これらのキャプチャビーズを、適切に希釈したヒト血清／血漿サンプルとともにインキュベートします。サンプルに含まれる、各抗原に対する抗体がビーズと結合します。次にサンプルを洗浄します。PE レポーターを標識した検出用抗ヒト免疫グロブリン抗体を加えてインキュベートし、図のようにサンドイッチを完成させます。過剰な検出抗体を除去し、サンプルの MFI を Luminex 機器で読み取ります。各パネルは、ヒト免疫グロブリン IgG、IgA、または IgM の検出に特異的です。これらのアッセイは定性的であり、定量用の標準タンパク質は含まれていません。実験上の MFI カットオフ値を決定するため、感染していないコントロールサンプルを用意することをお勧めします。

各キットには、アナライトビーズと組み合わせて使える、アッセイの性能を評価するためのコントロールビーズが同梱されています。3 つの免疫グロブリン結合ポジティブアッセイコントロールビーズ（IgG、IgA、または IgM）は、異なる量の免疫グロブリンと結合しており、アッセイの検出可能範囲をカバーするさまざまなレベルの相対 MFI 値を示します。ネガティブアッセイコントロールビーズ（免疫グロブリンが結合していないビーズ）も同梱されています（**図 4**）。

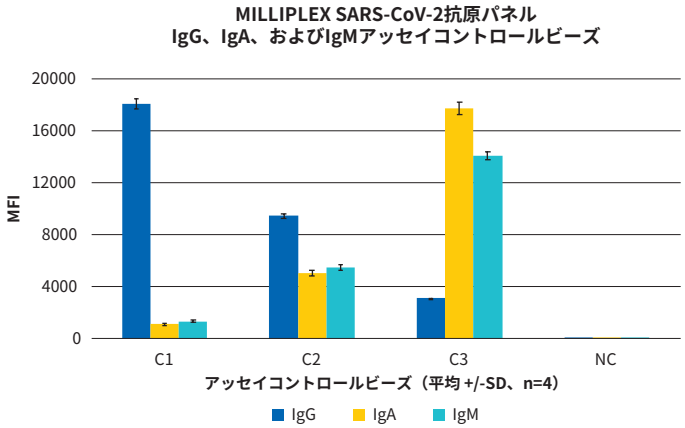

図 4　アッセイコントロールビーズの MFI。IgG ビーズの相対 MFI 値は高（C1）、中（C2）、低（C3）であり、IgA および IgM ビーズの 相対 MFI は低（C1）、中（C2）、高（C3）であることにご注意ください

SARS-CoV-2 サブユニット S1、S2、RBD、および N に対する市販または自家製の組換え IgG 抗体を、2020 年より前に採取したヒト血清／血漿サンプルに加え、MILLIPLEX SARS-CoV-2 抗原パネル 1 IgG のアッセイ性能を確認しました。SARS-CoV-2 サブユニットに対する IgA および IgM 抗体は市販で入手できなかったため、IgA および IgM パネルについては同様の検証は行っていません。

3 パネル全てで、アッセイ内（Intra-assay）精度は <15% CV でした。ここでは 1 つのアッセイ内の 8 つの結果の %CV の平均値から算出しました。3 パネル全てで、アッセイ間（Inter-assay）精度は <20% CV でした。ここでは 4 つの異なるアッセイの %CV の平均値から算出しました。

これらの MILLIPLEX キットは、ISO 9001:2015 適合施設で製造され、研究目的のみに使用でき、診断目的に使用することはできません。

材料と方法

サンプル

下記のとおり、患者サンプルを採取し、アッセイおよび解析しました[1]。サンプルは、SARS-CoV-2 感染に対する PCR で陽性または陰性であった以下の患者群から採取しました。

COVID-19 陽性人工呼吸器使用「Ventilated」(n=68)、COVID-19 陽性人工呼吸器不使用「Not Ventilated」(n=115)、および COVID-19 陰性「COVID −」(n=41)。

キットプロトコール

MILLIPLEX SARS-CoV-2 アッセイ キット (IgG、IgA、および IgM) のそれぞれのプロトコールに従い、全 4 種類のアナライト (S1、S2、RBD、および N) について、EDTA 血漿サンプルをデュプリケートでアッセイしました。3 種類のキットのプロトコールは、検出される免疫グロブリンおよびアッセイコントロール以外は、全て同一です。

キットの試薬を調製し、使用前に室温 (RT) に戻しました。サンプルを Assay Buffer で 1:100 に希釈しました*。96 ウェルプレートのウェルに 200 µL の Wash Buffer を加え粘着プレートシーラーでカバーし、RT で 10 分間振盪インキュベートし、プレートを傾けて溶液を廃棄しました (pre-wet)。全てのウェルに Assay Buffer 25 µL を加え、バックグラウンドウェルにはさらに Assay Buffer を 25 µL 追加しました。希釈したサンプルを、適切なサンプルウェルにそれぞれ 25 µL 加えました。超音波処理し (30 秒)、ボルテックスした (1 分) アナライトビーズとコントロールビーズ各 60 µL に Assay Buffer を加えて最終容量 3 mL とし、ボルテックスして、ビーズ混合液 25 µL を各ウェルに分注しました。プレートをシールし、ビーズが沈殿しないように常時振盪しながら、RT で 2 時間インキュベートしました。マグネットセパレータ (カタログ番号 40-285) で磁性ビーズを保持しながら、プレートを傾けて溶液を廃棄し、ウェルあたり 200 µL の Wash Buffer でプレートを 3 回洗浄しました。50 µL の PE 抗ヒト免疫グロブリン (使用キットによって IgG、IgA、または IgM) 検出抗体を各ウェルに加え、プレートをシールし、常時振盪しながら RT で 90 分間インキュベートしました。マグネットセパレータでウェルあたり 200 µL の Wash Buffer でプレートを 3 回洗浄しました。150 µL のシース液 (カタログ番号 40-50015) を各ウェルに加え、プレートをシールして RT で 5 分間振盪しました。最後に、プレートを Luminex 200 機器で読み取りました。

＊ 非常に抗体価が高いサンプルの場合、1:200 などの高希釈が必要な場合があります。

結果

アッセイ結果をグラフ (**図 5a**、**5b**、**5c**) で、各グループの各サンプルの個々の MFI 値、グループの平均値、+/- 標準偏差 (SD)、およびグループ間の有意性検定の p 値を示します。****p<0.0001、***p<0.001、**p<0.01、*p<0.05

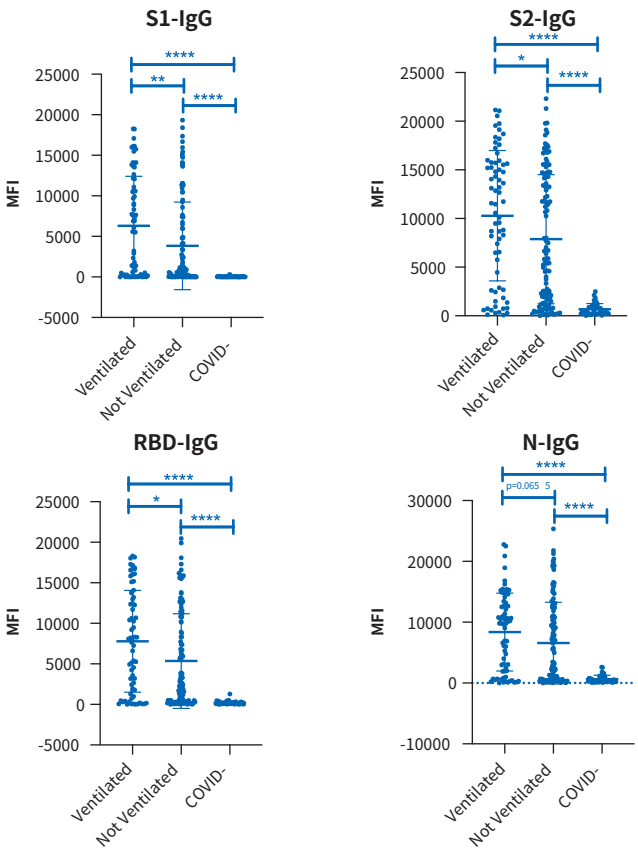

図 5a MILLIPLEX SARS-CoV-2 抗原パネル 1 IgG、4 プレックスアナライト (S1、S2、RBD、N) を用いて分析したヒト患者サンプルの結果

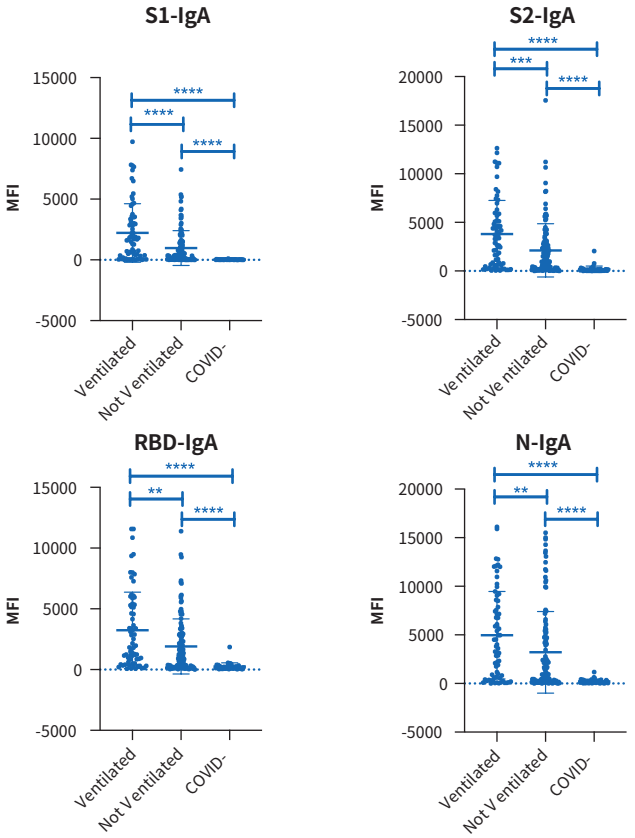

図 5b MILLIPLEX SARS-CoV-2 抗原パネル 1 IgA、4 プレックスアナライト (S1、S2、RBD、N) を用いて分析したヒト患者サンプルの結果

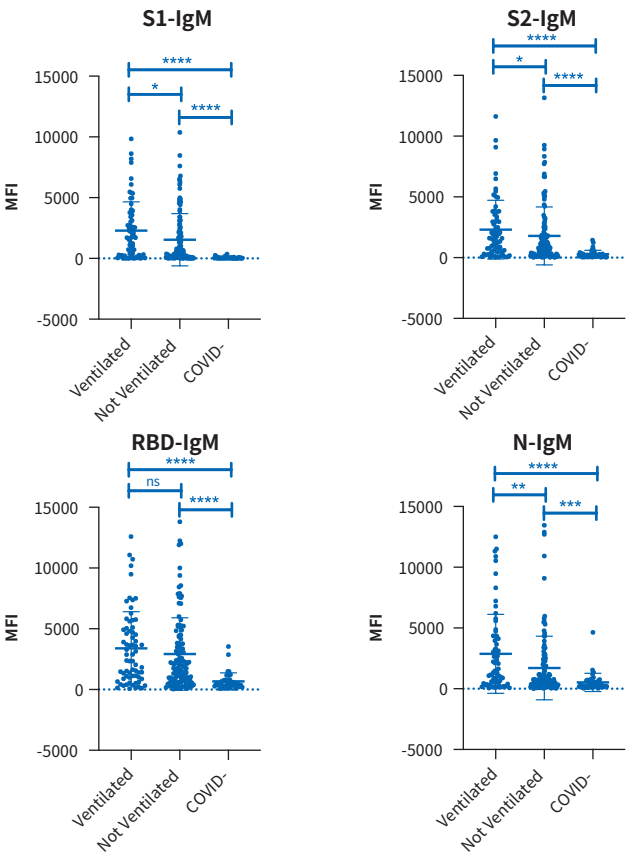

図 5c　MILLIPLEX SARS-CoV-2 抗原パネル 1 IgM、4 プレックスアナライト（S1、S2、RBD、N）を用いて分析したヒト患者サンプルの結果

考察

ヒト血清／血漿サンプル中の、SARS-CoV-2 タンパク質サブユニット S1、S2、RBD、および N に対する IgG、IgA、および IgM 抗体を検出できる、3 種類の新しい MILLIPLEX マルチプレックスキットを開発しました。

これらの RUO アッセイは、SARS-CoV-2 PCR 陽性患者および COVID-19 陰性コホートから採取したヒト血清／血漿サンプルを用いて検証済みです。これらのキットでの解析に必要な最低サンプル量は、96 ウェルフォーマットで各ウェルあたり 1:100 希釈で 25 µL です。アッセイにかかる時間はほぼ半日です。キャプチャビーズとサンプルのインキュベーションを 2 時間、検出抗体のインキュベーションを 90 分間行った後、Luminex 機器で読み取りを行います。

これらのキットはヒトの COVID-19 の研究用の製品です。IgG、IgA、および IgM の血液で試験を行うことは、SARS-CoV-2 に曝されたことのある人、およびある程度のレベルの免疫応答を示す人の同定に役立ちます。SARS-CoV-2 ウイルスの特定の抗原領域に対する各免疫グロブリンタイプの応答を調べることで、COVID-19 の感染と回復過程における、このウイルスに対する免疫応答をさらに理解できる可能性があります。

SARS-CoV-2 に対するワクチンが利用可能となったため、これらのキットにより、自然感染による免疫を有するのか、ワクチン接種による免疫を有するのかを検査できる可能性があります。ワクチン接種を受けた人は、スパイクタンパク質に対する力価はありますが、ヌクレオカプシドタンパク質に対する力価は持たないと考えられます。もちろん、ヌクレオカプシドタンパク質とスパイクタンパク質の両方に対応したワクチンが使用されるようになれば、これらの検査は適用されなくなります。

ご不明な点がありましたら、弊社テクニカルサービスにお問い合わせください。
テクニカルサービス　Tel：03-4531-1140
E-mail：jpts@merckgroup.com

関連したパネルについては下記 URL をご覧ください。
https://bit.ly/MILLIPLEX-COVID19

謝辞

We wish to thank our collaborators Mary K. Young, Michael D. Solga, Rebecca M. Carpenter, Jennifer M. Sasson, and William A. Petri Jr. of the University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, 22908, USA.

Reference

1. IgG Antibodies against SARS-CoV-2 Correlate with Days from Symptom Onset, Viral Load and IL-10, Mary K. Young, Christine Kornmeier, Rebecca M. Carpenter, Nick R. Natale, Jennifer M. Sasson, Michael D. Solga, Amy J. Mathers, Melinda D. Poulter, Xiao Qiang, William A. Petri Jr. https://doi.org/10.1101/2020.12.05.20244541 medRxiv.org preprint dated Dec. 7, 2020.

使用は研究用途に限り、臨床または医療診断目的で使用することはできません。

サイエンス系お役立ちメディア M-hub
かんたんカタログ検索 カタログファインダー
メルクライフサイエンス - メールニュース www.merckmillipore.com/wm
メルクライフサイエンス公式 SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2021年2月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.Original is Lit. No. MK_AN7451EN Ver. 1.0

メルク株式会社
ライフサイエンス リサーチ事業部
〒 153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F
製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio
E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140

RBM231-2102-PDF-H