

<発表資料>

2023 年1月 11 日 23001

## VHH 抗体を応用したウイルス研究 VHH 抗体と高輝度蛍光タンパク質を連結させることにより、 環境中の新型コロナウイルスを精細に可視化

花王株式会社(社長・長谷部佳宏)ハウスホールド研究所は、国立研究開発法人理化学研究所(理事長・五神真、以下理研)脳神経科学研究センター細胞機能探索技術研究チーム、学校法人北里研究所(理事長・小林弘祐、以下北里大学)が設置する北里大学大村智記念研究所、株式会社 Epsilon Molecular Engineering(社長・根本直人、以下、EME)と共同で、VHH 抗体に蛍光タンパク質を組み合わせた融合タンパク質を用い、繊維に付着した新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)を簡便に可視化できる可能性を見いだしました。この成果を応用することで、新型コロナをはじめとする環境中の危険なウイルスの存在場所の詳細がわかるようになるだけでなく、ウイルスを不活化・除去できる製品の開発に役立つことが期待できます。

この研究成果は、第 69 回日本ウイルス学会学術集会(2022 年 11 月 13 日・長崎県)にて発表しました。

### ■花王が関わってきた VHH 抗体関連研究

花王は長年、枯草菌による酵素などのタンパク質生産技術の研究・開発を行なっています。昨今はその技術をもとに、感染症対策に役立つタンパク質として VHH 抗体の研究を進めています。2020 年には、北里大学、EME との共同研究により新型コロナウイルスに対して感染抑制能(中和能)を有する VHH 抗体の取得に成功しました\*1。この VHH 抗体の新型コロナウイルス治療薬としての有用性検討を目的に、2021 年、北里大学、EME、慶應義塾大学医学部、生理学研究所と共同で、動物モデルにおいて VHH 抗体の経鼻投与により新型コロナウイルスの増殖を抑制することを報告しています\*2。VHH 抗体の治療薬としての可能性については、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の公募に採択され、枯草菌を用いた医薬品製造基盤構築をめざして北里大学、自然科学研究機構、EME、塩野義製薬株式会社の共同により検討が進められています\*3。

一方で花王は、VHH 抗体をウイルス研究のさまざまな用途に応用する検討も進めています。VHH 抗体に蛍光を発するタンパク質(蛍光タンパク質)を付けると、光る目印のついた VHH 抗体が作製できます。2022 年 4 月には、理研、東北大学の研究グループが創出したタマクラゲ由来の蛍光タンパク質 StayGold と、新型コロナ VHH 抗体を連結することで、感染細胞内で新型コロナウイルス粒子が成熟する経路を捉えることに成功しました\*4。さらに、理研、北里大学、EME との共同研究により、AzaleaB5、KikG など高輝度な蛍光タンパク質と連結した蛍光 VHH 抗体は、口腔内から採取した検体を用いた新型コロナウイルス感染の診断ツールとして利用できる可能性があることも確認しています(図1)\*5。

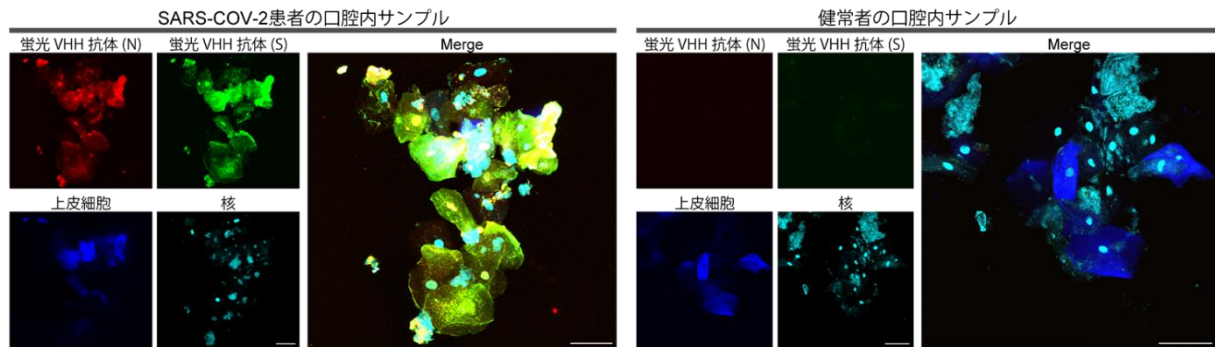


図 1 蛍光VHHを用いた新型コロナウイルス感染診断への応用

蛍光VHH抗体(N): 抗Nタンパク質VHH-AzaleaB5融合タンパク質  
 蛍光VHH抗体(S): 抗Sタンパク質VHH-KikG融合タンパク質  
 核はDAPI、上皮細胞は蛍光標識抗-汎サイトケラチン抗体を用いて染色

## ■環境中のウイルスの簡便な可視化技術開発の検討

新型コロナウイルスが引き起こした世界的パンデミックによって、生活者のウイルス感染症への意識が高まっています。新型コロナウイルスをはじめ、ウイルスの粒子は数十から数百 nm のサイズで目に見えないことから、生活者の身近な場所にある繊維や硬質表面上のウイルスの有無や存在状態を知ることは困難です。これらのウイルスを可視化する手段の一つとして電子顕微鏡が挙げられますが、操作が煩雑なこと、また観察できる条件には制限があります。

花王は、これまでに開発した新型コロナウイルスに結合する VHH 抗体と高輝度な蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質を用いて、感染後の新型コロナウイルスの動態や感染者の診断への応用を検討してきましたが、今回はさらに環境中におけるウイルスの簡便な可視化技術の検討を行ないました。

## ■繊維上のウイルス粒子を可視化

新型コロナウイルスをパラホルムアルデヒドで処理し感染能をなくした上で、ウイルス RNA を染色する SYTO82、S タンパク質に結合する KikG 融合 VHH 抗体を加えて染色ウイルス粒子を調製しました。作製したウイルス粒子をポリエステル布に滴下し、繊維にウイルスを付着させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、繊維上にウイルス由来の蛍光(SYTO82)と KikG 融合 VHH 抗体由来の蛍光が同じ位置に検出されました。この結果は、繊維に付着したウイルス粒子を KikG 融合 VHH 抗体由来の高輝度な蛍光で可視化できる可能性を示しています。さらにウイルスが付着した布を衣料用洗剤で洗たくしたところ、KikG-VHH 融合タンパク質由来の蛍光が繊維上から顕著に減少することも確認できました(図 2)。

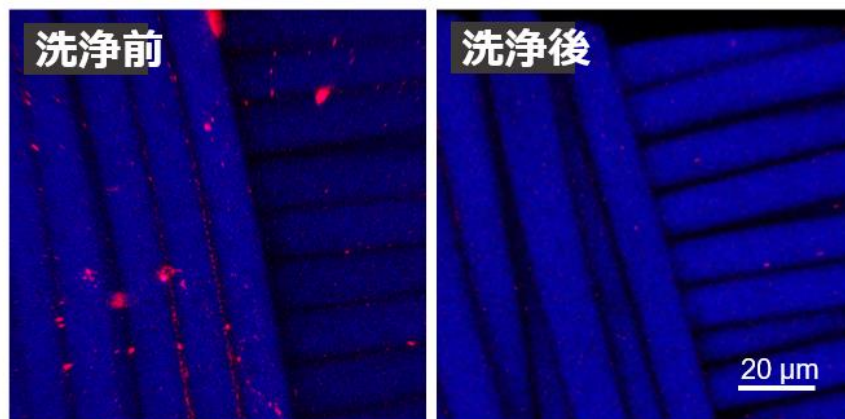


図 2 繊維上の新型コロナウイルス粒子の可視化と衣料用洗剤による洗浄

赤色の蛍光は新型コロナウイルスに結合した蛍光VHHのシグナル、青色はポリエステル繊維

今回の検討により、繊維上でもウイルスを可視化できる可能性が示されました。これまで電子顕微鏡などでしか確認できなかった環境中のウイルス粒子が、高輝度な蛍光タンパク質と分子サイズが小さく高い結合性能を備えた VHH 抗体による融合タンパク質によって、簡便に観察できる可能性があると考えます。

## ■今後の展開

ウイルスに特異的に強く結合する VHH 抗体の性質と、KikG 蛍光タンパク質の明るい蛍光により、繊維上でのウイルス分布を高精細に可視化することができました。また、ウイルスが付着した布から、洗たくによって VHH 融合タンパク質由来の蛍光が減少する様子も確認できました。この技術を応用することにより、たとえばノロウイルスのような環境中のさまざまなウイルスの存在状態をも簡便に観察できるようになる可能性が示されました。さらに、繊維上のウイルスが付着しやすい部位、また衣類以外の環境に付着したウイルスとその除去の状態を可視化することで、ウイルスを除去する技術開発に役立つことが期待できます。

花王は今後も、VHH 抗体を応用したウイルス制御技術、可視化技術の深化により、新型コロナをはじめ感染症の脅威から命を守り、安心して生活できる社会の実現をめざし、研究に取り組んでまいります。

\*1 2020 年 5 月 7 日 北里大学プレスリリース

[北里大学大村智記念研究所片山和彦教授らの研究グループが新型コロナウイルス\(SARS-CoV-2\)に対して感染抑制能\(中和能\)を有する VHH 抗体の取得に成功](#)

\*2 2021 年 11 月 16 日 花王ニュースリリース

[新型コロナウイルス感染症\(ハムスターモデル\)の治療に成功 VHH 抗体の経鼻投与法により臨床応用に大きく前進](#)

Nasal delivery of single-domain antibody improves symptoms of SARS-CoV-2 infection in an animal model. (*PLoS Pathog.* 2021;17:e1009542.) doi: 10.1371/journal.ppat.1009542.

\*3 2021 年 11 月 15 日 花王ニュースリリース

[北里大学・花王・自然科学研究機構・EME・塩野義製薬による「次世代治療薬を目指した VHH ナノ抗体薬に関する研究開発」委託研究開発契約を締結](#)

\*4 2022 年 4 月 26 日 [理化学研究所ニュースリリース](#)、

花王ニュースリリース

[色褪せない蛍光タンパク質－細胞微細構造やウイルスの定量的観察を可能にする技術－](#)

A highly photostable and bright green fluorescent protein. (*Nat Biotechnol.* 2022;40:1132-1142.) doi: 10.1038/s41587-022-01278-2.

\*5 [Antigen testing for COVID-19 using image-based assessment of oral specimens. \(\*MedRxiv\*\)](#)