

新型コロナウイルスの抗原・抗体検査法

山岡 悠太郎^{1,2}, 宮川 敬¹, 梁 明秀¹

1. 横浜市立大学 医学部 微生物学

2. 関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所

1. はじめに

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の感染拡大はとどまるところを知らず、2021年1月時点において、感染者数は全世界で9000万人以上、その内死者数は190万人を超え、本邦においても感染爆発の様相を呈している。新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の検査診断法には、それぞれ検出標的の異なる、遺伝子検査法、抗原検査法、抗体検査法の三つがある。SARS-CoV-2は、粒子の一番外側に「エンベロープ」という脂質からできた脂質二重膜を有し、膜タンパク質であるエンベロープ、メンブレン、スパイク(SP)等のタンパク質、そして粒子内部に存在するヌクレオカプシドタンパク質(NP)とゲノムRNAから構成される。遺伝子検査法および抗原検査法は、それぞれウイルスのゲノムRNAまたは抗原タンパク質を検出することで、検査時点の感染を判定するものであり、本邦においては確定診断可能な検査法として保険収載されている。抗体検査法は、血液中に産生される抗ウイルス抗体を検出するものであり、現在の感染または過去の感染既往の判定などに用いることができる。新型コロナウイルスの出現から約1年が経過した現在においても、COVID-19の検査法のゴールドスタンダードは依然RT-PCRを中心とした遺伝子検査法であるが、拡大の一途をたどる感染者数に対応するためには、その他の検査法の積極的な活用や併用が必須であると考えられる。本稿では、新型コロナウイルスに対する抗原・抗体検査法を概説するとともに、当研究室における研究開発の取り組みについても紹介する。

2. 抗原検査法

抗原検査法は、ウイルス抗原タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫学的手法により、検体中のウイルス抗原タンパク質を検出するものであり、ウイルス粒子構成タンパク質の中で最も量の多い、NPを認識する抗体が主に活用されている。抗原検査には、抗原定量検査と、抗原定性検査の二種類がある。抗原定量検査は、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を原理としており、抗体が固相化された磁性粒子でウイルス抗原を捕捉し、さらに酵素標識した抗体とで複合体を形成させ、洗浄後に発光試薬を添加し、発光量を測定することで検出する。洗浄工程がある為に感度・特異度共に優れており、測定時間は30分程度と短時間である。また、遺伝子検査法と比べて低コストであることに加え、定量測定が可能なのが特徴である。一方、検査には大型の機械が必要なため、診療所やベッドサイドでの検査には適しておらず、大病院や検査センター、検疫所等で運用されている。抗原定量検査の感度は、リアルタイムPCR法と比べるとやや劣るが、LAMP法等の簡便な遺伝子検査法と同等であるとされており¹⁾、遺伝子検査法とほぼ同様の扱いで用いることができる。検体には、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液、唾液を用いることができる。

抗原定性検査は、主にイムノクロマト法が原理として採用されており、着色粒子や酵素等で標識した抗体がウイルス抗原を捕捉し、ニトロセルロース膜上に固相化された抗体とで複合体を形成することで、メンブレン上にバンドが出現する。検査には大型の機械を必要とせず、簡便な操作で15~30分と非常に短時間で検出できる。また、遺伝子検査法と比べて、誰でも試験が可能であり、低コストに試験できることが特長である。一方で、現行品の抗原定性検査の感度は、ウイルス量が少ない検体での感度が低いため、無症状者のスクリーニング目的での使用は推奨されていない¹⁾。そのため、現時点では抗原定性検査の使用と結果の解釈には注意が必要である²⁾。抗原検査を使用する上でのフローを図1に示す。抗原検査は一般的に特異度が高いため、陽性の場合そのまま確定診断とすることができるが、陰性の場合には発症日や臨床経過を含めて追加の検査を行

う等の判断が求められている。検体には、鼻咽頭拭い液、鼻腔拭い液を用いることができるが、現在承認されている検査試薬では、いずれも唾液検体は適用範囲外である。また、鼻腔拭い液は医療従事者にとってリスクの少ない検体の採取法であるが、検体中のウイルス量は鼻咽頭と比べて少ないという報告もあり³⁾、本邦における性能比較試験も検体数が非常に限られた試験結果であるため、今後継続して検証する必要があると考えられる。また、これまでに複数社から抗原定性検査キットが承認申請されており、臨床試験データでは、いずれも既承認品と同等の性能を有しているとされるが、試験法や結果の表示法にはばらつきがあり、臨床試験データも非常に限られている。実際に、各社の検出感度には性能差があり、キットによってはウイルスの株間での検出感度に大きな差があることが報告されている⁴⁾。加えて、検体の粘度が高い場合や、小児例で、偽陽性を疑う症例があるとの調査報告が感染症学会からなされている⁵⁾。また、これまでに市販されている検査キットは、いずれも新型コロナウイルスだけでなく、SARS コロナウイルスにも反応する抗体が使用されている。当研究室では、抗原検査法への活用を目的として、新型コロナウイルスだけを特異的に検出可能なモノクローナル抗体の開発に成功した⁶⁾。そして、本抗体を用いて、海外製を含む現行品よりも精度の高い抗原検査キットの研究開発を進めている^{7,8)}。今後、さらに高感度化を進めることで、抗原定性検査キットについても、唾液検体への適用拡大や、下図のような検査フローにとらわれず、無症候者のスクリーニング目的での活用が可能になるように取り組んでいきたい。

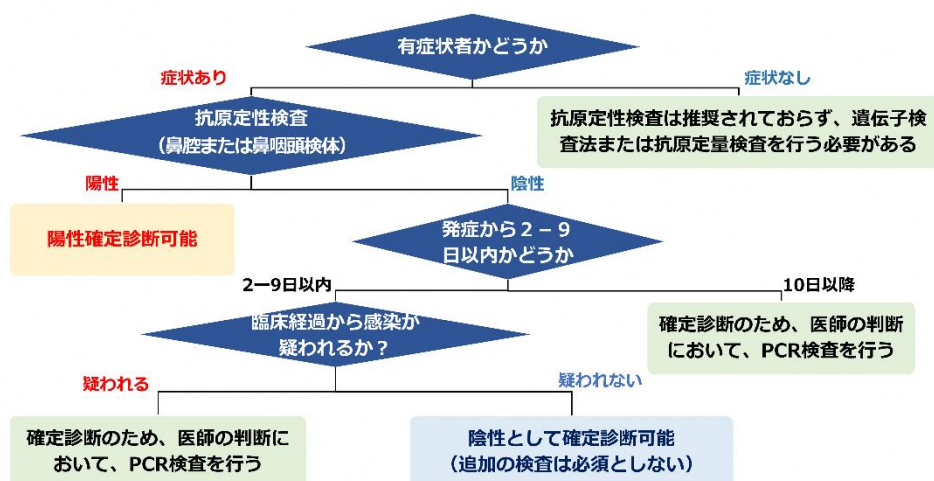


図 1. 抗原定性検査法の実施フロー(文献 1、2 を参考に筆者作図)

3. 抗体検査法

抗体検査法は、感染者の血液中に産生されるウイルスに対する免疫グロブリン(抗体)を検出するもので、1) ウイルス抗原に結合する抗体を測定する手法と、2) ウイルスの感染を阻止できる中和抗体を測定する手法の 2 種類に大別される。現在市販されている試薬の多くは、1) ウイルスに対する結合抗体 を測定するものであり、抗体を定量的に検出する CLEIA 法や ELISA 法と、定性的に検出するイムノクロマト法の試薬が市販されている。CLEIA 法や ELISA 法では、SARS-CoV-2 の SP または NP が固相化された担体を用いて、抗ウイルス抗体を捕捉し、さらに酵素標識された抗原または、各サブクラス(IgM、IgG 等)に対する二次抗体と反応させて、発光法または発色法により抗体を定量的に検出する。酵素標識された抗原を用いる抗原-抗原サンドイッチ法の場合には、IgG、IgM、IgA 等を含むすべての免疫グロブリンの検出が可能である。いずれの手法でも、専用の機械が必要であるが、多検体を処理する際のハイスループット性に優れている。一般的に、検体には、全血ではなく血清または血漿が用いられる。一方で、イムノクロマト法では、金コロイドなどの着色粒子等で標識した各サブクラスに対する抗体が、血液中の抗体を捕捉し、ニトロセルロース膜上に固相化されたウイルス抗原とで

複合体を形成することで、メンブレン上にバンドとして検出される。検査には機械を必要とせず、簡便な操作で約 15～30 分と短時間で検出できる。また、血清や血漿だけでなく、全血での測定が可能な試薬も多い。

これらの抗体検査法は、2020 年1月現在、本邦において体外診断薬として承認を受けた試薬は存在しておらず、用いるウイルス抗原の種類や原理によって、感度・特異度にはばらつきがある状況である⁹⁾。当教室では、新型コロナウイルスの出現直後から、血清学的診断法の研究を開始し、国内の臨床検体を用いて感度・特異度などの性能を実証した抗体検出試薬の開発に取り組んでいる^{10,11)}。SARS-CoV-2 に対する抗体は、発症後約10日前後から抗体価が上昇し始め、発症後2週間で降での感度は、約 100%に近い。一方で、発症から1週間以上経過している症例では、ウイルスそのものを検出する遺伝子検査法および抗原検査法の感度が徐々に低下することが知られており、そのような場合においては、抗体検査法が補助的な役割を果たすことができると考えられている¹²⁾。また、NP に対する抗体は SP に対する抗体と比べてより早期に産生されることから、感染早期の診断の目的には、NP を抗原とした抗体検査法が適していると考えられる¹³⁾。一方で、SP に対する抗体は、NP に対する抗体と比べて、長期的に抗体価が維持されやすい¹⁴⁾。加えて、各国で開発されているワクチンは SP を標的としているため、感染既往歴や疫学調査、ワクチン接種後の抗体価判定の目的には、SP を抗原とした抗体検査法の活用が望ましいと考えられる。

また、抗体検査には、上記の結合抗体の測定法だけでなく、ウイルスの感染を阻止できる中和抗体の機能を測定する中和抗体検査法、すなわち中和試験がある。中和試験は、感染防御免疫の獲得状況の把握には重要な意義を持つと考えられており、ワクチンの有効性評価などで多用される手法である。中和抗体の測定法としては、実際の生ウイルスを用いた試験法が標準的な手法として用いられている。本法は、VERO-E6-TMPRSS2 細胞などの感受性培養細胞に SARS-CoV-2 を感染させると細胞が死滅することを利用するものであり、段階希釈した血清の存在下で、SARS-CoV-2 を感染させて、約4～5日程度培養した後、感染後の生き残った細胞のウェルを数えることで感染の阻害率(中和抗体価)を算出する。本法は、実際のウイルスを用いることから、最も信頼度の高い手法であるものの、検査にはバイオセーフティレベル3(BSL-3)設備が必要であり、試験に時間がかかること、そして、試験に熟練した検査技術が必要であることなどの問題がある。これらの問題を克服するため、遺伝子組換えレンチウイルスベクターや水疱性口内炎ウイルス等シュードウイルスを用いた中和試験が代替法として開発されている。これらの手法は、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質を表面に持ち、ウイルスゲノムにルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を搭載した遺伝子組み換えウイルスを用いて感染実験を行うものである。本法は、バイオセーフティレベル2(BSL-2)の設備で試験できるものの、遺伝子組み換えウイルスを用いるために、各施設で遺伝子組換え実験の申請を行う必要がある。また、結果が出るまでには、2～3日必要であるなどの問題点があるため迅速な判定には不向きである。当研究室では、最近、これらの問題点を克服した中和抗体検査法である hiVNT (HiBiT tagged Virus-like particle Neutralizing antibody Test)法を新たに開発した¹⁵⁾。この検査法は HiBiT と呼ばれる 11 アミノ酸のペプチドでタグ付加した、SARS-CoV-2 のSPを搭載したウイルス様粒子(hiVLP)と、ルシフェラーゼ酵素タンパク質断片である LgBiT を発現する培養細胞を用いるものである(図2)。

HiBiT は、ルシフェラーゼ酵素タンパク質

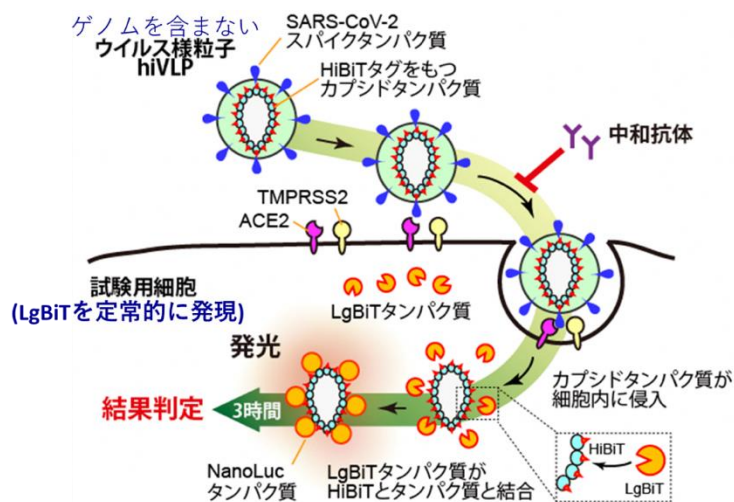


図 2. 当教室で開発した新規の中和抗体検査法：hiVNT 法(文献 15、Figure A より和訳して引用)

断片である LgBiT と結合すると、発光酵素を再構成する性質を有しており、hiVLP の細胞への侵入を発光量の測定により定量的に検出できる。血清の存在下で hiVLP を感染させると、中和抗体がある場合には、この発光酵素の形成が抑制されるために、発光シグナルが減衰される。本法を用いることで、hiVLP の添加から約3時間で、中和抗体を測定することができる。また、本法で用いる hiVLP は、ウイルスの殻だけからなり、ウイルス遺伝子を保有しないウイルス様粒子を用いるため、遺伝子組換え生物としての扱いが不要であるなどのメリットがある。ハイスループット性に優れるため、大規模な疫学的研究やワクチン接種後における中和抗体誘導の確認等、サロゲートのスクリーニング法として活用されることに期待したい。

4. 終わりに

新型コロナウイルスの発生から約1年を経過し、徐々にではあるが治療法だけでなく検査法についても、選択肢が増えてきた状況である。しかしながら、いずれも急ピッチで整備されたものであるため、各試薬間には性能差があるのが実情である。今後、他の臨床検査項目のように、標準品やパネル検体が確立され、性能評価や標準化が行われていくことに期待したい。また 2020 年末には、感染性の増加が示唆される変異株が各国で複数出現し、本国への流入が懸念されている。これらの変異株は、SP に対して、ウイルスの細胞への侵入能が向上する変異や、中和抗体の活性が低下する変異が認められている¹⁶⁾。また、抗原検査法の標的である NP に対しては、変異の頻度は比較的少ないものの、一部の領域に集中した変異が認められている。現在の抗原・抗体検査法が、これらの変異株や、今後出現する株に対応するかどうかについては、継続してモニタリングを続け、適宜アップデートを実施する必要があると考えられる。

5. 引用文献

1. 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 (第2版).
2. 厚生労働省. SARS-CoV-2 抗原検出用キットの活用に関するガイドライン.
<https://www.mhlw.go.jp/content/000630270.pdf>.
3. Callahan, C. et al. Nasal-Swab Testing Misses Patients with Low SARS-CoV-2 Viral Loads. medRxiv (2020) doi:10.1101/2020.06.12.20128736.
4. Yamayoshi, S. et al. Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19. *Viruses* **12**, 1-8 (2020).
5. 日本感染症学会. COVID-19 簡易抗原定性検査の偽陽性に関するアンケート結果.
https://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_survey_201027.pdf.
6. Yamaoka, Y. et al. Highly Specific Monoclonal Antibodies Against SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen for Accurate Diagnosis of COVID-19. *SSRN Electron. J.* 3-9 (2020) doi:10.2139/ssrn.3721722.
7. キヤノンメディカルシステムズ株式会社. 新型コロナウイルス抗原定性検査キット「Rapiim SARS-CoV-2-N」の販売開始について. <https://jp.medical.canon/News/PressRelease/Detail/96019-834>.
8. 富士フイルム株式会社. 銀増幅イムノクロマト法※1を用いた「新型コロナウイルス抗原検査キット」製造販売承認を申請. <https://www.fujifilm.com/jp/ja/news/list/5826>.
9. 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症に関する検査について.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00132.html.
10. 関東化学株式会社. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に関する弊社取り組みについて. 2020 年 9 月 16 日 https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/news200309.pdf.
11. 東ソー株式会社. 新型コロナウイルス抗体検出試薬の販売開始.
<https://www.tosoh.co.jp/news/assets/newsrelease20201202.pdf>.
12. CDC. Antibody Testing Interim Guidelines. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>.
13. Kubo, S. et al. Development of an automated chemiluminescence assay system for quantitative measurement of multiple anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Front. Microbiol.* **11**, 3518 (2020).
14. Ripperger, T. J. et al. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity* **53**, 925-933.e4 (2020).
15. Miyakawa, K. et al. Rapid quantitative screening assay for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using HiBiT-tagged virus-like particles. *J. Mol. Cell Biol.* (2020) doi:10.1093/jmcb/mjaa047.
16. 国立感染症研究所. 感染性の増加が懸念されるSARS-CoV-2新規変異株について (第4報).
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/10090-covid19-30.html>.