

緊急連載 「新型コロナウイルスと分析化学」

国内での一日の新型コロナウイルス新規感染者数が1000人を超える中で、Go Toキャンペーン事業のGo To Travel, Go To Eatなど、ウィズコロナの生活を支援するキャンペーンが次々に開始され、新型コロナウイルスと共存する新しい生活様式への移行が進んでいます。本誌では、新型コロナウイルスについて、正しく理解するために最小限必要となる基礎的知識を広く会員に提供する必要があると考え、8号より緊急連載記事を企画しました。本連載は、新型コロナウイルスの感染拡大防止に関して、分析化学的視点に基づいて事態を正しく解釈できることを目指して企画するものであります。

この9号においては、感染者数の推定に必須な抗体検査法に関する記事です。抗体検査法の原理から現状について紹介しています。会員皆様の理解の一助としていただければ幸いです。

抗 SARS-CoV-2 抗体検査の現状

新井浩司

1 はじめに

2019年末に人への感染が確認され、世界的に猛威を奮っている新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)だが、2020年6月現在、日本では春頃と比べれば終息したとはまだまだ言えないものの、一応の落ち着きをみせつつある。パンデミックの第二波の発生が懸念され、まだまだ予断を許さない状況ではあるが、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)診断のためのPCR検査試薬や、研究目的の抗原及び抗体検出キットなどの開発により、SARS-CoV-2は様々な方向からの分析が可能となっており、COVID-19ワクチンや治療薬開発のための重要なツールとなっている。COVID-19は高齢者や既往歴のある方が重症化するリスクが高いと言われているが、一方で症状が軽い、あるいは自覚症状がほとんどない場合も多いとされ、日本における実際の感染者数はよくわかっていないため、今後、この新規感染症がどのように推移していくか、予測することを難しくしている。

そこで本稿では、SARS-CoV-2に対して感染歴があるか、言い換えればどれだけの人に免疫があるかを広く確認するための最も有効な手段である抗体検査について解説する。

2 抗原

SARS-CoV-2にはエンベロープにスパイクタンパク質、メンブレンタンパク質及びエンベロープタンパク質

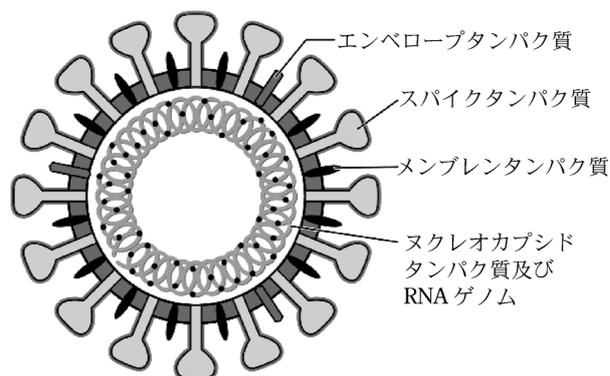


図1 コロナウイルス模式図

の3種類のタンパク質が、また一本鎖RNAを取り囲んでいるヌクレオカプシドタンパク質が存在している。現在、多くの抗体検査キットや検査試薬が発売されているが、SARS-CoV-2のどの抗原(エピトープ)を対象にして作られた製品であるかを理解していないと、目的とした結果が得られない恐れがある。ここでは、現在の抗SARS-CoV-2抗体検査において、主な抗原として使用されているコロナウイルスのスパイクタンパク質及びヌクレオカプシドタンパク質について簡単に紹介する(図1)。

2-1 スパイク(S)タンパク質¹⁾²⁾

Sタンパク質は150~200kDaからなる大きなタイプIの膜貫通型タンパク質で、21~35個のNグリコシル

化部位を含んでいる。S1とS2の二つのドメインに分かれ、S1ドメインがウイルス表面に発現しており、コロナウイルスに特徴的な突起部分を構成している。機能面からみると、Sタンパク質はコロナウイルスが細胞内に侵入するために必要な唯一のタンパク質であり、受容体への結合と膜融合を仲介する。コロナウイルスはその種類によって肺炎や腸内感染症など、様々な疾患を引き起こすが、その標的器官を決める主要要因としてSタンパク質が関与していると考えられている³⁾⁴⁾。SARS-CoV-2のSタンパク質はアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)に対して高い結合親和性を持っており、ACE2がSARS-CoV-2の受容体タンパク質であるとの報告がある⁵⁾。そのためSタンパク質の受容体結合ドメインに特異的に結合する抗体は中和抗体として働く可能性があり、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対する治療薬候補となることが期待されている。

2.2 ヌクレオカプシド(N)タンパク質²⁾⁶⁾

Nタンパク質は43~50kDaのタンパク質で、複数の機能を有しているが、主な機能はウイルスゲノムRNAと結合し、ヌクレオカプシドと呼ばれるリボ核酸とタンパク質の複合体を形成することである。Nタンパク質は感染の初期段階で主に発現するタンパク質の一つで、強い免疫原性を有しており、2002年11月に最初に発生した重症急性呼吸器症候群(SARS)の抗体検査において、抗Nタンパク質抗体に対して確立されたELISA法にて、SARSの可能性が高い患者で、感染後6~10日後で患者の68.4%、11~61日後で89.6%の陽性判定が得られたとの報告がある⁷⁾。この方法では、非SARSと考えられる血清試料を用いて抗体測定を実施したところ、弱陽性が1例だけで他はすべて陰性の結果が得られるという、非常に特異性の高い方法であった。これらのことからNタンパク質は効率的な診断ツールとして提案されている。

3 抗体検査を実施する意義

現在、日本国内においては体外診断薬用医薬品として承認を得た抗体検査キットや検査試薬等はないため、COVID-19の診断目的として抗体検査を実施することはできないが、疫学調査としての活用が期待されている。厚生労働省は2020年6月より、東京都(3区)、大阪府及び宮城県において無作為抽出により選ばれた一般住民を対象とした抗体検査を実施しており、その結果が随時厚生労働省のホームページに公表されている。

4 抗体検査の現状の問題点

抗体検査でまず注意しなければならないことは、陰性の判定が得られたとしてもSARS-CoV-2に感染していないわけではないということである。また、陽性で

あっても現時点での感染を意味するものでもなく正確な感染時期がわかるわけではない。SARS-CoV-2に対する特異抗体価の十分な上昇には、感染後、IgA抗体及びIgM抗体で6~10日間、IgG抗体で11日以上要するとの報告があり⁸⁾、COVID-19急性期患者の診断に適しているとは言えない。免疫グロブリンのサブタイプを確認することにより、感染状況を確認することができるが、SARS-CoV-2においてはIgMとIgG抗体が同時に産生するとの報告もあり、順次研究が取り進められている⁹⁾。また、現状多くのメーカーより抗体検査キットが販売されてきており、日々その数は増えている印象であるが、当然検査キット間の性能の差もあるため、どの抗体検査キットを使用してもすべての検体がすべて同じ結果が得られるとは限らないということも、問題点の一つとして念頭においておく必要がある。

5 検査キットの性能評価

検査キットで使用されている抗原の違い(Sタンパク質、Nタンパク質または混合抗原)や検出される抗体の種類の違い(各種イムノグロブリンに加え、IgG/IgMまたはIgA/IgG/IgMすべてを検出する等)など、現状多くの抗体検査キットが入手可能であり、キットの取扱説明書には各メーカーが測定したデータが記載されている場合がほとんどである。ただし、抗体検査に限ったことではないが、市販の検査キットを用いる場合、検査結果の信頼性を担保するためには記載されているデータを鵜呑みにするのではなく、実際に検査する施設側で性能評価試験を実施するべきである。検査キットの性能を評価する場合は、最低限、次の項目を確認することを推奨する；(1)キット付属のコントロール試薬(ポジティブコントロールやネガティブコントロール)の繰り返し測定による再現性、(2)非感染試料(ヒト血清等)の測定、(3)非感染試料へポジティブコントロールを添加しての測定、(4)感染試料の測定。感染試料(検査陽性検体)をキットの性能評価用に準備することは難しい場合もあると思うが、研究目的のCOVID-19患者検体であれば、海外から購入可能になりつつあり、抗体検査結果付きの試料もあるので、これらを利用するとよい。陽性検体が利用可能な場合は、「9. 検体の取扱い」の項でも述べているが、目的に応じて検体の室温保存や凍結融解の繰り返し、検査結果に影響を与えるか否かを確認しておくとなお望ましい。

6 陽性/偽陽性の判断

抗体検査キットの性能評価試験を実施して、再現性に問題はなく、陽性検体を測定してはっきりと陽性判定が得られていたとしても、難しいのが陽性/偽陽性の判断である。なぜなら、用いた非感染試料が確実に感染していない検体であるとはなかなか言えないからである。非

感染試料として用いたサンプルが陽性判定となった場合、考えられる原因としては、(1) 実際に感染していた場合、(2) 非特異的な反応が起きた場合、(3) 抗原に交差反応のある感染症や疾患であった場合、(4) 試料の汚染（コンタミネーション）などが考えられる。(3) に関しては、キットの取扱説明書に記載されている交差反応性の情報及び測定した試料がそれらの疾患に罹患していないことを確認することくらいしか現実的に対処方法はないと思われる。(4) はあらかじめ同一試料を複数本数小分けして、バックアップ試料として保存しておくことで検証は一応可能であるが、小分け前の試料が汚染されている場合も考えられ、実際に起きるとかなり頭を悩ませることになり検証に時間を要するため、実験操作におけるコンタミネーション防止技術を習得し、考えられる防止策を日々実践することで、汚染の可能性を極力減らすことが重要である。(3) 及び (4) が原因ではないと考えられる場合、可能性が高いのが (1) か (2) である。この二つのうちのどちらが正しいかを判断する方法としては、検証したい試料に抗原を添加してプレインキュベートする吸収試験がある。例えば抗 SARS-CoV-2 抗体の有無を判断するためには、リコンビナントの S1 タンパク質を添加してプレインキュベートすることで抗体が先に捕捉されるため、実際に感染していた試料であれば陰性判定に転じるか少なくとも測定値が低下する。反対に陽性判定のままであれば非特異的な反応による偽陽性の可能性が高くなる。陽性か偽陽性の判断には有用な方法ではあるが、リコンビナントタンパク質の新たな購入や予備実験等が必要となるため、時間とコストを要する問題点はある。

7 陰性/偽陰性の判断

上記とは反対に、実際は感染患者の検体であるにもかかわらず、陰性判定となる場合もある。原因としては、判定したい抗体がまだ産生されていない時期に採取された検体であった場合や、感染はしているが抗体がほとんど産生されていない（検出感度未満）場合、抗体は産生されているが使用したキットに用いられている抗原の種類は認識しない抗体であった場合などがある（例えば S タンパク質を検出するキットでは N タンパク質を認識する抗体は測定できない）。これらは採取時期の確認や使用されている抗原が異なるキットを併用することで、ある程度判断可能である。他には洗浄工程を含むサンドイッチ ELISA 法などでは起こりにくいとされているが、大過剰に抗体が産生されている場合に起きるフック効果についても、測定原理によっては考慮する必要がある。

8 抗抗体検査手法について

抗ウイルス抗体を測定する手法はいくつかあるが、こ

こでは主に用いられている ELISA 法について簡単に説明する。

8.1 ELISA 法原理

ELISA とは抗体を使用した免疫学的測定法の一つであり、Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay（酵素結合免疫吸着測定法）の略である。抗体は生体にとって特定の異物である抗原に特異的に結合をして、異物を生体内から除去する分子であるので、抗体が抗原に特異的に結合する抗原抗体反応の原理を用いて、分析対象物質を定量する方法が ELISA の原理である。

抗体の種類は大きく IgG, IgM, IgA, IgD 及び IgE 抗体の 5 種類に分類される。ELISA には IgG 抗体を主として使用する。IgG 抗体に検出酵素や標識体を結合させることにより、抗原免疫反応後に吸光度や化学発光量と既知濃度の標準物質から検量線を作成することにより、検体中の分析対象物質の定量を実施する。抗原に直接結合する一次抗体に標識を行う場合や一次抗体を検出する二次抗体を標識する場合がある。代表的な酵素標識としては西洋ワサビペルオキシダーゼ（HorseRadish Peroxidase）及びアルカリホスファターゼ（Alkaline Phosphatase）が利用されている。検出感度により使用する基質については検討が必要である。測定機器の一例としては、マイクロプレートリーダーという機器を用いる。マイクロプレート（96 ウェルプレート）に添加した多数の検体を同時に測定することが可能で、吸光度、化学発光量及び蛍光を測定することが可能である（図 2）。

分析対象物質（抗原）を測定する ELISA には直接法、間接法、サンドイッチ法及び競合法などの測定法がある。

直接法（図 3）においては目的とする分析対象物質（抗原）を含む溶液を直接ポリスチレンプレートやチューブに添加し、固相表面に非特異的に吸着させる。実際には抗原の持つ電荷や疎水性相互作用で、物理化学的に吸着し、固相化が行われる。次に、後から添加する抗体が直接固相に吸着しないように、固相表面に Bovine Se-



図 2 マイクロプレートリーダー

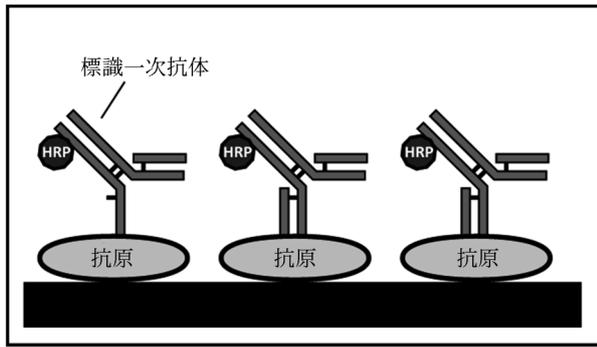


図3 直接法 (Direct ELISA)

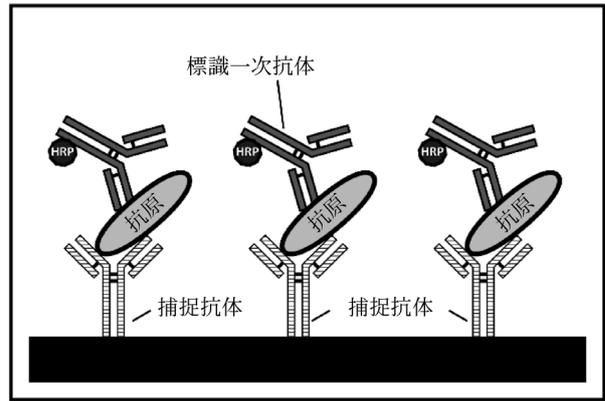


図5 直接サンドイッチ法 (Direct sandwich ELISA)

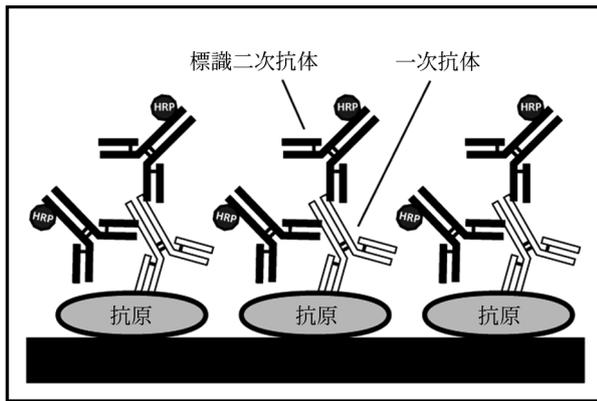


図4 間接法 (Indirect ELISA)

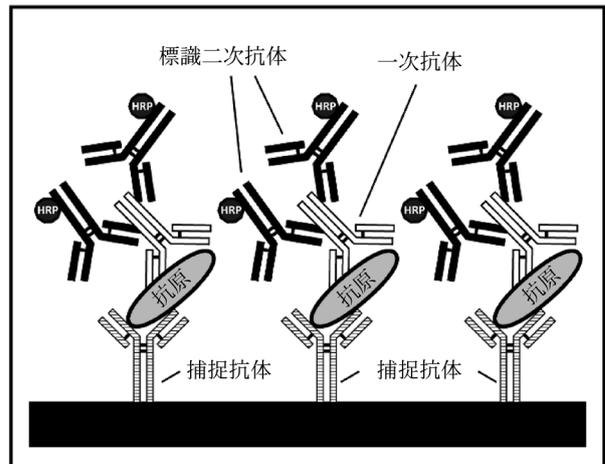


図6 間接サンドイッチ法 (Indirect sandwich ELISA)

rum Albumin (BSA), カゼインやスキムミルクを溶解した溶液 (ブロッキング液) を添加し、ブロッキングを行う。ここで目的の抗原に特異的な標識一次抗体を添加し、抗原に結合しなかった標識一次抗体を洗浄後に、抗原に吸着した標識一次抗体が酵素反応することにより吸光度等のシグナルを検出することにより抗原を定量する。一次抗体への標識は抗原抗体反応に影響を及ぼす可能性があり、シグナルの増幅が低レベルとなる可能性がある。

間接法 (図4) においては未標識の一次抗体を認識する標識二次抗体で抗原の定量を実施する。直接法に比べて測定の工程は増えるが、様々なメーカーから標識二次抗体を市販品で購入することができ、一次抗体の標識が不要となる。また標識二次抗体にポリクローナル抗体を用いると一つの一次抗体に複数の二次抗体が結合することにより、シグナルが増幅され感度が高くなる。

サンドイッチ法では、先に目的の抗原に特異的な抗体 (捕捉抗体) を固相化する。固相表面をブロッキングした後、目的の分析対象物質 (抗原) を含む溶液を添加し、溶液中の抗原が「抗原抗体反応」により固相に結合する。結合しなかった非特異的な抗原を洗浄し、標識抗体を添加し、抗原に結合しなかった抗体を洗浄後に、抗原に吸着した標識一次抗体が酵素反応することにより定量する (図5)。間接法と同じく標識二次抗体で検出す

る場合もある (図6)。サンドイッチ法では捕捉抗体と一次抗体が抗原の異なる部位に結合しなければならないが、2種類の抗体を用いることにより特異性は直接法より向上する。測定系の構築には抗体の反応液中濃度や反応時間、温度等の最適化が重要であり、工夫が必要となる。

8・2 ELISA を用いた抗体の測定

上記 ELISA の測定原理からウイルスや細菌の一部を抗原として、固相化することにより、ウイルスや細菌の各種抗原を認識する抗体を検出することが可能となる。即ち固相にウイルスや細菌の特定のタンパク質を抗原として使用することにより、生体内で産生される特定の抗原を認識する抗体の測定が可能となる。SARS-CoV-2 においてはウイルスのエンベロープを構成するスパイク (S) タンパクやヌクレオカプシドタンパク (N) を固相化抗原とすることによって、検体 (ヒト血清や血漿) 中に抗原特異的抗体を発現しているかを抗原抗体反応により検出する抗体測定キットが販売されている。また、抗原に結合した生体内の抗原特異抗体を標識二次抗体 (標識抗ヒト IgG 抗体や標識抗ヒト IgM 抗体) で反応

させ、酵素反応を用いた自動分析機器による抗体検査にも応用可能である。

弊社臨床検査事業部門ではヌクレオカプシドタンパク (N) を抗原とした Roche 社の Elecsys Anti-SARS-CoV-2 及びアボット社の ARCHITECT-SARS-CoV-2 IgG にて定性測定を実施しており、スパイク (S) タンパク及びヌクレオカプシドタンパク (N) を抗原とした MBL 社の iFlash-SARS-CoV-2 IgG assay 及び iFlash-SARS-CoV-2 IgM assay には半定量的に抗体価の測定を実施しているため、これらについて簡単に紹介する。

8・2・1 Elecsys Anti-SARS-CoV-2

電気化学発光免疫測定法 (ECLIA 法) を測定原理として測定する。第一反応としてビオチン化 SARS-CoV-2 特異抗原と Ru (bpy) 3 標識 SARS-CoV-2 特異抗原と検体を混合し、サンドイッチ複合体を形成させる。二次反応としてストレプトアビジンコーティング磁性マイクロパーティクルとサンドイッチ複合体を反応させる。マイクロパーティクルに結合している Ru (bpy) 3 標識 SARS-CoV-2 特異抗原の Ru (bpy) 3 は、電極への荷電による酸化と、トリプロピルアミンでの還元反応により励起発光を繰り返すので、所定時間での発光強度を光電子増倍管で測定する。測定値に Cut off Index (COI:1.0) を設定し、測定値が COI より小さい場合は陰性と判定し、COI 以上の場合は陽性判定として報告を実施している。IgM と IgG 抗体を区別せず測定する系であり、IgM と IgG 抗体の産生量の総和の結果としての報告となる。

8・2・2 ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG

化学発光免疫測定法 (CLIA 法) を測定原理として測定する。第一反応として SARS-CoV-2 リコンビナント抗原固相化磁性粒子と検体を混合し、複合体を形成させる。二次反応として複合体とアクリジニウム標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を反応させ、基質添加後に化学発光量を測定する。測定値にカットオフ値 {Index (S/C):1.4} を設定し、測定値が Index (S/C) より小さい場合は陰性と判定し、Index (S/C) 以上の場合は陽性判定として報告を実施している。本測定は IgG を測定する系であり、IgG 抗体の結果としての報告となる。

8・2・3 iFlash-SARS-CoV-2 IgG/IgM

化学発光免疫測定法 (CLIA 法) を測定原理として測定する。第一反応として SARS-CoV-2 がコーティングされた抗原結合磁性粒子と検体を混合し、複合体を形成させる。二次反応として複合体とアクリジニウム標識抗ヒト IgG 抗体又は IgM 抗体と反応させ、基質添加後に化学発光量を測定する。測定値に CUT-OFF (10 AU/mL) を設定し、測定値が CUT-OFF より小さい場合は陰性と判定し、CUT-OFF 以上の場合は陽性判

定として報告を実施している。また同時に Calibrator を測定することにより、本測定法においては定性判定以外に半定量的に抗体価を測定することにより、抗体量に関する情報を得ることができる。

また iFlash-SARS-CoV-2 IgG 又は IgM assay については東京大学先端科学技術研究センターの児玉龍彦先生 (東京大学名誉教授) が東京大学先端科学技術研究センター がん・代謝プロジェクトリーダー (兼) 新型コロナウイルス抗体測定協議会アドバイザーを務める「新型コロナウイルスへの血清 IgM, IgG 抗体の定量的かつ大量測定プロジェクト」に使用されている測定キットであり、抗体の半定量的測定の科学的検討を目指す目的で使用されている。

9 検体の取扱いについて

抗体検査には通常血清試料が用いられるため、その取扱いについても述べておく。PCR 検査に用いられる鼻咽腔ぬぐい液と比べると、血清試料から SARS-CoV-2 に二次感染する危険性は低いと報告されているが、他の臨床検査検体同様に取り扱いには十分注意する必要がある。一般的に採取後の血清中の抗体は比較的安定であり、2 週間程度であれば冷蔵 (4℃) 保管でも検査結果に影響はないことが多い。それ以上保管する場合は凍結 (-20℃以下、できれば-70℃以下) 保存するべきだが、その場合は凍結融解を繰り返さないように注意する。理想を言えば、凍結融解が検査結果に影響を及ぼさないことをあらかじめ確認することが望ましいが、難しければ少量で必要なだけ小分け保存しておくなどの対応も必要に応じて実施しておくことよい。感染が疑われる患者検体の輸送に関しては、原則、基本三重梱包を行い、公用車・社用車等の自動車又は、カテゴリ B に分類される臨床検体等の取扱い可能な輸送業者を利用することになっている。詳しくは国立感染症研究所が輸送マニュアルを開示しているため参照して頂きたい。

10 最後に

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) の感染メカニズムに関しては様々な研究が実施されているが、感染しても無症状や軽症の患者も多く、実際の国内の感染状況が把握されていない。他方で東京では 6 月末現在、感染が確認された新規の患者数が毎日 50 名前後を推移しているが、感染経路不明者も多く、パンデミックの第二波に注意しながら経済活動を再開している状況である。

その中で感染者数を推計するために抗体検査が有効な手段として用いられている。抗体を有することは感染歴があることを意味し、その有無は血液を採取すれば評価できる。厚生労働省が 3 都府県において無作為に抽出した抗体検査の結果が 6 月 16 日に発表された (東京都

1971名、大阪府2970名、宮城県3009名、計7950名)。各都府県の抗体保有率は東京都0.10%、大阪府0.17%、宮城県0.03%と陽性率(抗体保有率)が低い結果であった。この結果から日本での感染対策が効果を得た証拠となる反面、抗体を保有していない人がまだ多くいることから、今後のパンデミックの第二波が発生する可能性を示唆する結果となっている。

現在国内においてはSARS-CoV-2の感染を抑えている状況ではあるが、パンデミックの第二波を抑えるためにも、感染状況を把握し、適切な感染予防の施策を実行する上では、性能が認められた抗体検査キットによる検査体制の拡充により、更なる疫学的調査を引き続き実施することが必要である。

最後に、抗体測定キット(試薬)には様々の抗原に対して様々な抗体の種類を検出するものがあり、これから多くの研究を通じて目的に合わせた測定法が確立されることを期待する。

文 献

- 1) S. Belouzard, J. K. Millet, B. N. Licitra, G. R. Whittaker: *Viruses*, **4**, 1011 (2012).
- 2) P. S. Masters: *Adv. Virus Res.*, **66**, 193 (2006).
- 3) C. M. Sánchez, A. Izeta, J. M. Sánchez-Morgado, S.

Alonso, I. Sola, M. Balasch, J. Plana-Durán, L. Enjuanes: *J. Virol.*, **73**, 7607 (1999).

- 4) L. Kuo, G.-J. Godeke, M. J. B. Raamsman, P. S. Masters, P. J. M. Rottier: *J. Virol.*, **74**, 1393 (2000).
- 5) H. Zhang, J. M. Penninger, Y. Li, N. Zhong, A. S. Slutsky: *Intensive Care Med.*, **46**, 586 (2020).
- 6) M. Surjit, S. K. Lal: *Infect. Genet. Evol.*, **8**, 397 (2008).
- 7) Y. Shi, Y. Yi, P. Li, T. Kuang, L. Li, M. Dong, Q. Ma, C. Cao: *J. Clin. Microbiol. Dec.*, **41**, 5781 (2003).
- 8) M. Traugott, S. W. Aberle, J. H. Aberle, H. Griebler, M. Karolyi, E. Pawelka, E. Puchhammer-Stöckl, A. Zoufaly, L. Weseslindtner: *J. Infect. Dis.*, **222**, 362 (2020).
- 9) A. Grifoni, D. Weiskopf, S. I. Ramirez, J. Mateus, J. M. Dan, C. R. Moderbacher, S. A. Rawlings, A. Sutherland, L. Premkumar, R. S. Jadi, D. Marrama, A. M. de Silva, A. Frazier, A. F. Carlin, J. A. Greenbaum, B. Peters, F. Krammer, D. M. Smith, S. Crotty, A. Sette: *Cell*, **181**, 1489 (2020).



新井浩司 (Koji ARAI)
株式会社 LSI メディエンス (〒174-8555
東京都板橋区志村三丁目30-1)。

会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !!

本会では、個人(正会員:会費年額9,000円+入会金1,000円、学生会員:年額4,500円)及び団体会員(維持会員:年額1口79,800円、特別会員:年額30,000円、公益会員:年額28,800円)の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきましては、本会ホームページ (<http://www.jsac.jp>) の入会案内をご覧ください。下記会員係までお問い合わせください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ304号 (公社)日本分析化学会会員係
〔電話:03-3490-3351, FAX:03-3490-3572, E-mail:memb@jsac.or.jp〕