

新型コロナウイルス抗体検出試薬の開発

小	崎	慎	矢 ^{*1}
江	川		叶 ^{*2}
大	竹	則	久 ^{*3}
河	合	信	之 ^{*2}
北	岡	憲	二 ^{*1}
新	谷	晃	司 ^{*4}

Development of the four type tests detecting Anti-SARS-CoV-2 antibodies

Shinya KOZAKI
Kanae EGAWA
Norihisa OHTAKE
Nobuyuki KAWAI
Kenji KITAOKA
Koji SHINTANI

We have developed four high-throughput serological tests available of simultaneously detecting total immunoglobulins and immunoglobulin G against nucleocapsid protein (NP) and spike protein (SP) and report its performance in detecting Anti-SARS-CoV-2 antibodies in clinical samples. The sensitivity of the assay increased proportionally to the elapsed time from symptoms onset, and all of the four tests achieved 100% sensitivity after 13 days from symptoms onset. Most COVID-19 survivors had sustained neutralizing antibodies approximately 6 months after infection. Furthermore, SP-IgG titers were found to have positive correlation with NT50 titer by analysis for samples from Japanese healthcare workers who had completed two doses of the BNT162b2 vaccine.

1. 序論

2019年12月に中国武漢市で最初の報告があった新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症（COVID-19）は世界的パンデミックをきたした。COVID-19の検査法としては、SARS-CoV-2のゲノムRNAを検出する遺伝子検査法や抗原蛋白質を標的とした抗原検査法が知られており、検査時点の感染を直接的に判定する方法として保険収載されている。一方、抗体検査

法については血液中の抗SARS-CoV-2抗体を検出するものであり、感染既往など過去の感染を間接的に知ることができるかとされているものの、本邦では体外診断用医薬品として承認を得たキットはなく（2021年10月時点）、WHOは診断を目的として単独で用いることは推奨せず、疫学調査等で活用できる可能性を示唆している¹⁾。

このうち、抗体検査に使用する抗SARS-CoV-2抗体検出試薬については、免疫グロブリンのクラス（IgG、IgM、IgAなど）に加え、試薬により用いられる抗原が異なっている。具体的には、ヌクレオカプシド蛋白質（NP）あるいはスパイク蛋白質（SP）のいずれかが使用されており、SARS-CoV-2のNPもし

*1 バイオサイエンス事業部 第一開発部 試薬グループ
*2 バイオサイエンス事業部 第一開発部 探索グループ
*3 バイオサイエンス事業部 第一開発部 技術グループ
*4 バイオサイエンス事業部 第一開発部

くは SP どちらかの抗原に対する免疫グロブリンを検出できるよう設計されている。

これまでにイムノクロマト法や酵素免疫測定法 (ELISA 法)、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) などといった様々な測定原理に基づくキットが研究用試薬として上市されているが、性能はキット間でばらつきが認められており、疫学調査やワクチン有効性評価に有用なキットの開発が望まれていた。

今回、我々は全自動化学発光酵素免疫測定装置 (AIA®-CL2400 又はそれと同等の性能を有する専用機器) を用いて、簡便かつ迅速に NP と SP に対する免疫グロブリン G (IgG) と総免疫グロブリン (Total-Ig) を検出できる 4 種類の抗 SARS-CoV-2 抗体検出試薬の開発を行った。基本性能および COVID-19 回復者やワクチン接種者に対する研究結果について報告する。

2. 測定原理と材料

開発した 4 種類の抗 SARS-CoV-2 抗体検出試薬は抗原抗体反応を利用し血清又は血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体を検出する試薬であり、反応に必要な物質は凍結乾燥し、試薬カップ内に密封されている。

反応試薬の試薬カップには 2 つのセル (セル (1)、セル (2)) がある。セル (1) には磁性微粒子に固定化された SARS-CoV-2 抗原を含む凍結乾燥体が、セル (2) には酵素としてアルカリ性ホスファターゼが標識された抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体もしくは同酵素で標識された SARS-CoV-2 抗原の凍結乾燥体が封入されている。この試薬カップのセル (1) に分注水と検体を、セル (2) には分注水を加え、それぞれ凍結乾燥試薬を溶解する。検体が注入されたセ

ル (1) においては凍結乾燥試薬が溶解すると同時に第一反応が開始する。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の検体成分を除去する (B/F 分離)。B/F 分離後、セル (2) の内容物を一定量、セル (1) に移すことにより第二反応が開始される。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の酵素標識抗体・抗原を除去する。その後、磁性微粒子に結合した酵素活性を測定するために化学発光基質として 3-(5-tert-ブチル-4,4-ジメチル-2,6,7-トリオキサビシクロ [3.2.0] ヘプト-1-イル) フェニルリン酸エステルジナトリウム塩 (DIFURAT®) を添加し、酵素による分解で得られる発光強度を測定することにより、検体中の抗 SARS-CoV-2 抗体の陽性又は陰性を判定する。

測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での抗原抗体反応、B/F 分離、基質分注、発光強度の測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置により自動で行われ、各試薬ともに測定開始から約 15 分後に結果が得られる。(試薬の主な仕様および本報文中の略称を表 1、測定原理を図 1 に示す。)

3. 試薬の開発

抗 SARS-CoV-2 抗体試薬は、SARS-CoV-2 の疫学調査やワクチン有効性評価に用いるために感度や特異性が高く、短時間で抗体を検出できる性能が求められる。抗体検出試薬における感度や特異性は、使用する抗原の特性に左右されることから、抗原の選定に重点を置いて測定系の構築を行った。

NP は、他のヒトコロナウイルスと抗原性の類似性を有しており、完全長のタンパク質として血清検査に

表 1 抗体試薬の主な仕様

試薬名称	AIA®-CL 用 SARS-CoV-2-NP-IgG 抗体試薬	AIA®-CL 用 SARS-CoV-2-NP-Total 抗体試薬	AIA®-CL 用 SARS-CoV-2-SP-IgG 抗体試薬	AIA®-CL 用 SARS-CoV-2-SP-Total 抗体試薬
本報文中の略称	NP-IgG	NP-Total	SP-IgG	SP-Total
検出対象	IgG 型抗 SARS-CoV-2-NP 抗体	抗 SARS-CoV-2-NP 抗体 (IgG を含む総免疫グロブリン)	IgG 型抗 SARS-CoV-2-SP 抗体	抗 SARS-CoV-2-SP 抗体 (IgG を含む総免疫グロブリン)
固相抗原	SARS-CoV-2-NP	SARS-CoV-2-NP	SARS-CoV-2-SP	SARS-CoV-2-SP
標識抗原 / 標識抗体	抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体	SARS-CoV-2-NP	抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体	SARS-CoV-2-SP
対象検体種	血清 EDTA 血漿	血清 EDTA 血漿	血清 EDTA 血漿 ヘパリン血漿	血清 EDTA 血漿
検体量	10 μ L (10 倍希釈)	20 μ L	10 μ L (10 倍希釈)	20 μ L

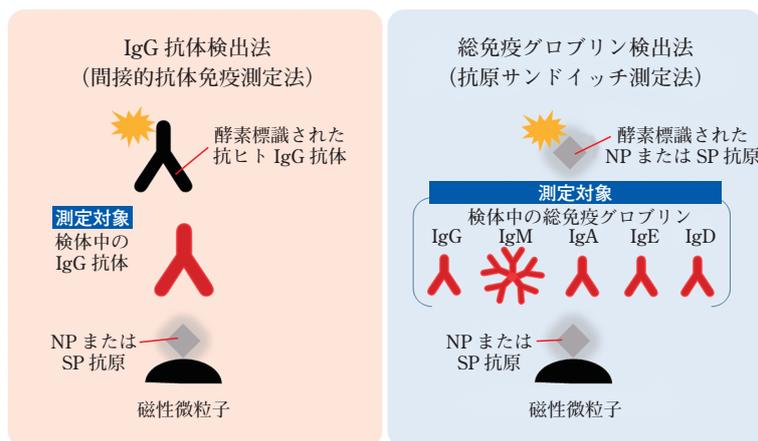


図1 抗体試薬の測定原理

用いた場合には交差反応性を示す可能性があるが、N末端のアミノ酸残基がない場合にはSARS-CoV-2に高い特異性を示すことが報告されている²⁾。従って、NP-IgGおよびNP-Total抗体試薬にはN末端を切断したNPを選定した³⁾。

SPは、抗体受容体結合ドメイン(RBD)を介してウイルスの宿主細胞への侵入を仲介しており、RBDに対する抗体はSARS-CoV-2感染に対する防御免疫を表すと予測されている⁴⁾。疫学的観点から、SP-IgGおよびSP-Total抗体試薬にはRBD蛋白質を選定した³⁾。

さらに、十分な感度が得られるように磁性微粒子への抗原固定化方法や標識抗原への酵素標識方法の最適化を行った。反応液組成については、検体中に含まれる可能性のある異好性抗体(Heterophilic Antibodies、Human Anti-Goat Antibodies等)との非特異的反応を抑えるためにブロッキング剤を添加するとともに、安定性を向上すべく各種蛋白質および糖質濃度の最適化を行った。また、IgG検出試薬については検出目的以外の抗体による非特異反応を抑制するために、検体を10倍希釈して測定する仕様とした。

その結果、抗体価の強弱や経時的変化を評価することができる4種類の抗SARS-CoV-2抗体検出試薬を開発することができたので、評価結果を以下に報告する。

4. カットオフ値の設定³⁾

カットオフ値の設定には、COVID-19感染拡大前に採取した海外の健常人検体600例(購入検体)と、Abbott社のArchitect SARS-CoV-2 IgGで陽性を示した抗SARS-CoV-2抗体陽性検体17例(購入検体、カットオフ値近辺を含む)を用いた。開発した4種の

抗SARS-CoV-2抗体検出試薬で前述の検体を測定し、得られた発光強度を基にROC分析を行い、感度および特異度が100%となる発光強度をカットオフ値(1.0 Index)と設定した。

次に設定したカットオフ値の妥当性を確認するため、COVID-19感染拡大前に採取した国内の健常人検体1,000例(横浜市立大学先端医療センターバイオバンク部門より提供)と、COVID-19発症後13日経過した国内の患者検体154例を4種の抗SARS-CoV-2抗体検出試薬で測定して抗体価を比較した。得られた抗体価を基にROC分析を行った結果、4種類全ての抗体検出試薬で陰性と陽性を正確に識別し、感度と特異度はともに100%であった(図2)。

以上の結果より、設定したカットオフ値は妥当であることを確認した。

5. 基本性能評価

[1] 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を抗体価の異なる2種のプール血清およびプール血漿を用いて行った。使用した2種(Low、High)は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。5重同時測定による測定内再現性試験の結果、各試料の測定値の変動係数(coefficient of variation; CV)はNP-IgG:1.0~1.9%、NP-Total:1.4~2.7%、SP-IgG:2.4~3.6%、SP-Total:2.8~4.2%であった。各試料を1日1回測定し、試薬、装置を変えずに20回繰り返して行った測定間再現性試験の結果(検量線作成後90日間に渡って20回測定)、各試料の測定値のCVはNP-IgG:2.3~2.8%、NP-Total:3.0~3.9%、SP-IgG:4.2~5.0%、SP-Total:3.5~4.9%であった(表2)。

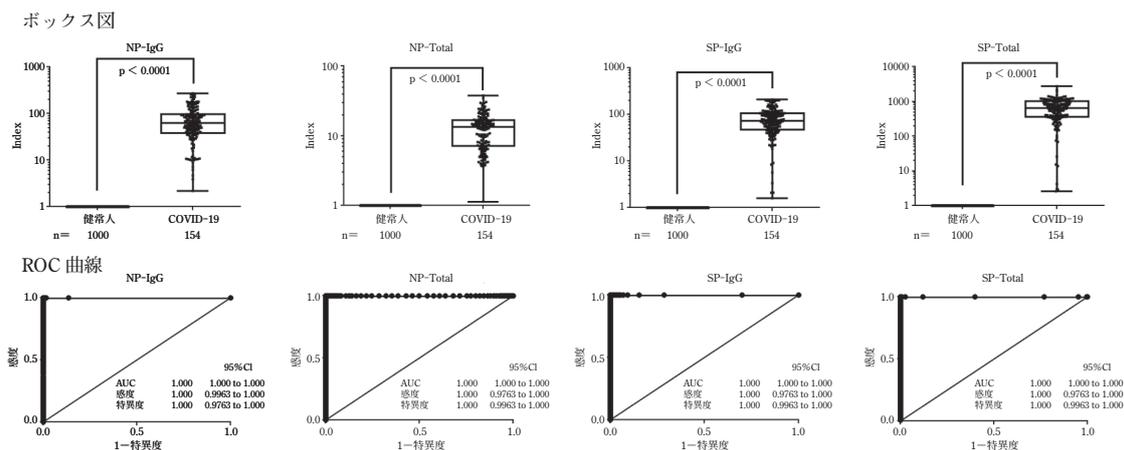


図2 感度と特異度

表2 測定内および測定間再現性

1) Pooled Serum		NP-IgG		NP-Total		SP-IgG		SP-Total	
		Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
測定内再現性 (n=5)									
Mean [Index]		1.4	4.2	1.9	4.5	2.4	5.4	1.4	3.9
SD		0.03	0.06	0.05	0.10	0.06	0.19	0.06	0.16
CV [%]		1.9	1.4	2.7	2.2	2.6	3.6	4.2	4.1
測定間再現性 (n=20)									
Mean [Index]		1.5	4.3	1.6	4.1	2.5	5.6	1.5	4.0
SD		0.04	0.12	0.06	0.14	0.13	0.28	0.06	0.14
CV [%]		2.8	2.7	3.9	3.5	5.0	5.0	4.2	3.5
2) Pooled Plasma									
		Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
測定内再現性 (n=5)									
Mean [Index]		1.4	4.4	1.3	3.7	2.5	5.6	1.7	3.8
SD		0.02	0.04	0.03	0.05	0.06	0.17	0.06	0.11
CV [%]		1.4	1.0	2.6	1.4	2.4	3.1	3.6	2.8
測定間再現性 (n=20)									
Mean [Index]		1.5	4.5	1.3	3.8	2.5	5.3	1.7	4.0
SD		0.04	0.10	0.05	0.11	0.10	0.25	0.08	0.16
CV [%]		2.6	2.3	3.9	3.0	4.2	4.7	4.9	4.2

[2] 共存物質および抗凝固剤の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質をプール血清又はプール血漿へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてはヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸、ビオチン (Total 抗体試薬のみ) を、抗凝固剤としてはEDTAおよびヘパリン (SP-IgGのみ) を各々表3に記載の濃度まで添加し測定した。その結果、未添加に対して抗体陰性検体は陰性判定 (1.0 Index 未満) を示し、抗体陽性検体 (1.0 Index 以上) の測定値はいずれも±10%以内であったため、これ

ら物質は表3に記載の濃度まで添加しても影響しないと判断した。

6. 臨床評価

[1] 急性期における抗体評価³⁾

COVID-19患者の急性期 (発症後3ヶ月以内) における抗体価並びに経時変化について検討を実施した。COVID-19と診断された44名の患者から、発症後7日以降に採取した検体202例について、発症後7～9日、10～12日、13～20日、21～30日、31日

表3 共存物質および抗凝固剤の影響

		NP-IgG	NP-Total	SP-IgG	SP-Total
ヘモグロビン	[mg/dL]	430	430	450	450
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	17	17	17	17
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	18	18	17	17
脂質	[mg/dL]	1,600	1,600	1,600	1,600
ヒト血清アルブミン	[mg/mL]	50	50	50	50
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20	20	20
EDTA	[mg/mL]	10	10	10	10
ヘパリン	[U/mL]	N.T.	N.T.	100	N.T.
ビオチン	[ng/mL]	N.T.	7,000	N.T.	7,000

※N.T.: Not tested

以降（最大96日まで）に区分した上で、4種類の抗SARS-CoV-2抗体検出試薬（NP-IgG、NP-Total、SP-IgG、SP-Total）で測定して抗体価の経時的推移を比較した。発症後7～9日での感度はNP-IgGで59.3%、NP-Totalで74.1%、SP-IgGで40.7%、SP-Totalで37.0%であり、COVID-19の初期段階では、NP-Totalが他の抗体よりも高い感度を示した。また、4種類の抗体価はいずれも経時的な上昇傾向が認められ、13日以降の感度は100%に達した（表4）。NP-IgGの抗体価は発症後30日以上経過した時点でわずかに低下したが、NP-Total、SP-IgG、SP-Totalの抗体価は発症後21～30日まで継続して上昇する傾向が見られた（図3）。

[2] 回復期における抗体評価⁵⁾

COVID-19患者の回復期（発症から6ヶ月以降）における抗体価並びに中和抗体価（NT50）について検討を実施した。検体は2020年2月4日から5月26日までの間にSARS-CoV-2感染検査結果が陽性となった国内の既往感染者376人について、陽性判定後6ヶ月が経過した時点で採取したものをを用いた。中和抗体価（NT50）はヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来のシュードウイルスを用いて以下の方法で測定した。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子をコードし、SARS-CoV-2スパイク蛋白質を有したシュードウイルスを調製し、希釈したCOVID-19患者血清を含む培地と混合して、感染感受性細胞であるVeroE6/TMPRSS2に接種した。接種後48時間後に基質を添加してルシフェラーゼ活性をGloMax Discover System (Promega)を用いて測定し、緩衝液等の非血清対照と比較してルシフェラーゼ活性が50%減少した血清の希釈係数を中和抗体価（NT50）とした（図4）。また、中和抗体価の判定基準は既報の研究結果^{6,7)}などから、NT50 > 50を中和抗体陽性とした。

前述の回復期における検体を4種の抗SARS-CoV-2抗体検出試薬で測定した結果、抗体陽性を示した検体はNP-IgG（314例、84%）、NP-Total（365例、97%）、SP-IgG（344例、91%）、SP-Total（369例、98%）であり、ほとんどの感染既往者が抗体を保持していることが示された（図5A）。また、中和抗体陽性を示した検体は367例（98%）であり、317例（85%）が中程度以上のNT50（ ≥ 201 ）を示した（図5B）。

NT50と4種の抗SARS-CoV-2抗体検出試薬での測定値との相関係数（スピアーマンの順位相関係数）は、NT50対SP-IgGで最も高く（ $r = 0.63$ ）、次いでSP-Total（ $r = 0.57$ ）であり、NP抗原に対する

表4 感度の経時的推移

	陽性率 (95%CI)	発症後日数 (血液サンプル数)		
		7-9 (27)	10-12 (22)	13- (153)
NP-IgG	59.3 (38.8-77.6)	69.6 (41.7-86.8)	100.0 (97.6-100.0)	
NP-Total	74.1 (53.7-88.9)	91.3 (72.0-98.9)	100.0 (97.6-100.0)	
SP-IgG	40.7 (22.4-61.2)	81.8 (59.7-94.8)	100.0 (97.7-100.0)	
SP-Total	37.0 (19.4-57.6)	90.9 (70.8-98.9)	100.0 (97.7-100.0)	

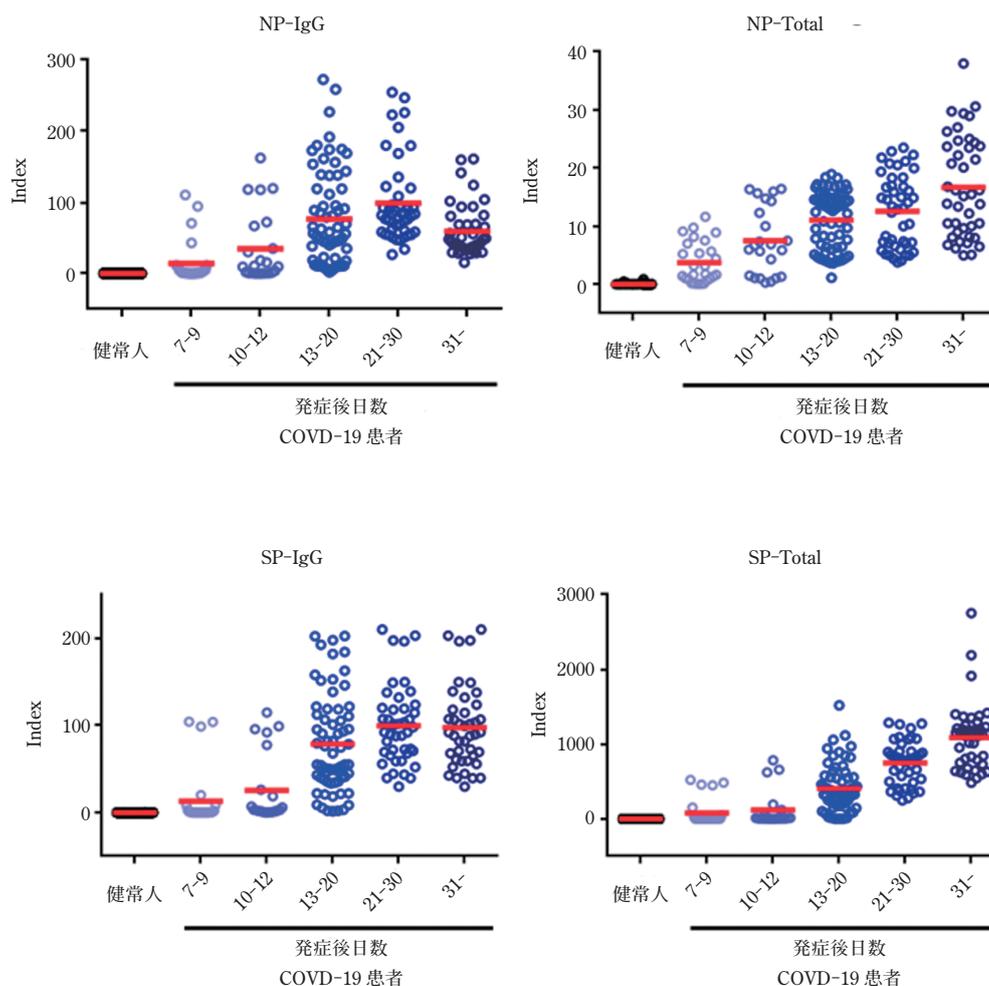


図3 抗体価の時系列分析

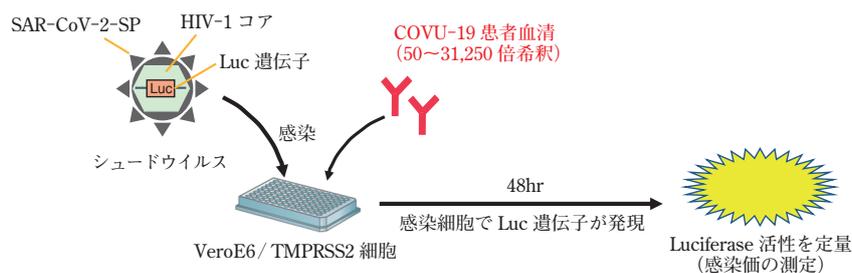


図4 中和抗体価 NT50 測定方法

抗体価 (NP-IgG および NP-Total) では低値を示した (図6)。

[3] ワクチン評価⁸⁾

武漢株の SARS-CoV-2 スパイク蛋白質 (SP) を主な標的として設計された mRNA ワクチンである「BNT162b2 ワクチン」の接種によって誘発された抗体について、中和抗体価との相関性が最も良好であっ

た SP-IgG で測定するとともに NT50 との比較を行った。

検体は BNT162b2 ワクチンを接種した横浜市立大学附属病院の日本人医療従事者 168 名から採取した。採取はワクチン接種前、1 回目の接種から 2、4、6 週間後 (2 回目の接種は 1 回目の接種から 3 週間後に実施) の 4 つの時点で実施した。被験者の年齢は 23 ~ 62 歳であり中央値は 43 歳であった。男性 42 名、女性 126

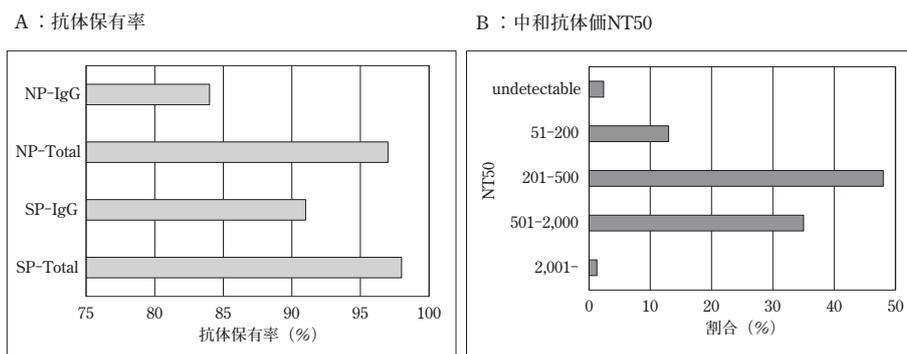


図5 回復期における抗体保有率と NT50 分布

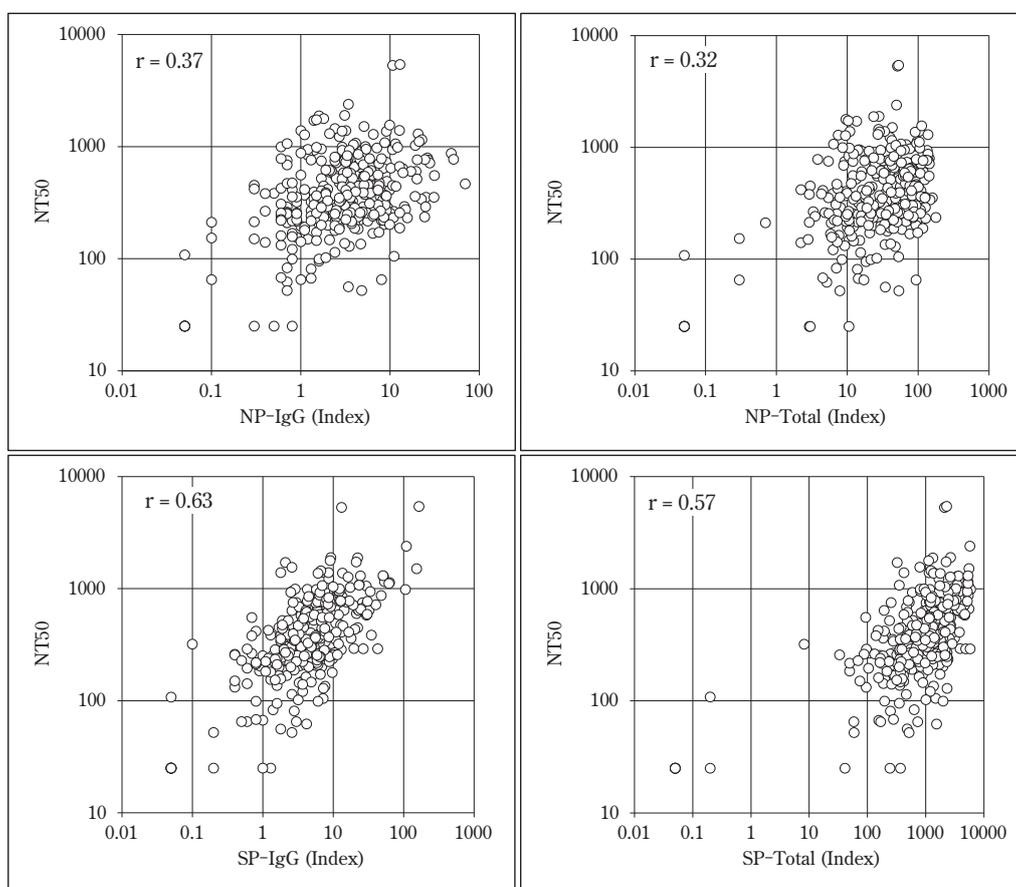


図6 NP または SP 抗原に対する抗体価と NT50 の相関

名で構成されており、併存疾患は、「なし」が146人、「気管支喘息」が16人、「糖尿病」が2人、「抗腫瘍化学療法または免疫抑制療法を受けている」が1人、「慢性肺疾患」が1人であった。また、NP-IgGは全て陰性であったことから既往者がいる可能性は低いと判断した。

SP-IgG および NT50 中和抗体価の経時的推移を表5および図7に示す。すべての被験者は、ワクチン接種前にSP-IgGがカットオフ値の1.0 Indexを下回っ

ていたが、特に接種4週間後（2回目の接種から1週間後）には急激に抗体価が上昇した。

初回接種から4週間後および6週間後のNT50とSP-IgGとの相関を図8に示す。BNT162b2ワクチンを2回接種した後のNT50は100以上に達することが報告されており^{9, 10}、本研究でも、初回投与後4週目では167名（99.4%）の被験者が、初回投与後6週目ではすべての被験者がこの閾値に達していた。

表5 ワクチン接種者 SP-IgG および NT50 の経時的推移

	SP-IgG (Index)				NT50	
	ワクチン 接種前	1 回目接種後の経過期間			1 回目接種後の経過期間	
		2 週間	4 週間	6 週間	4 週間	6 週間
中央値	0.1	1.4	60.8	97.4	783.6	629.8
25%tile	0.1	0.6	26.2	51.4	351.2	386.8
75%tile	0.1	3.3	102.8	167.4	1,389	1,148
下限-上限	0-0.4	0.1-45.1	0.2-449.6	3.8-927.6	69.6-10,073	162.6-8,933

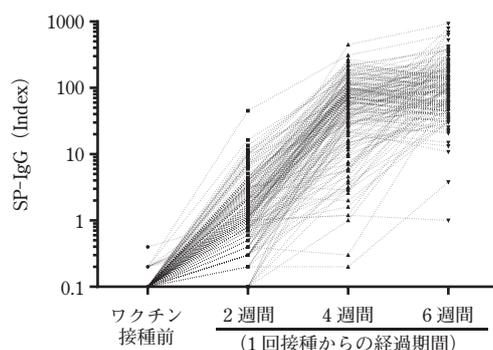


図7 ワクチン接種者 SP-IgG および NT50 の経時的推移

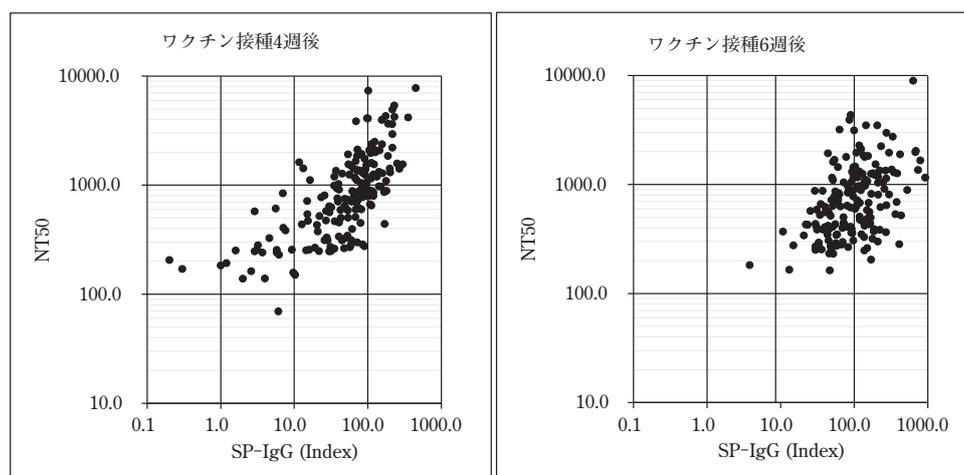


図8 BNT162b2 ワクチンを2回接種した被験者における SP-IgG と NT50 の相関性

7. 総括

今回、我々は AIA-CL システムをベースに新型コロナウイルスのヌクレオカプシド蛋白質 (NP) とスパイク蛋白質 (SP) に対する免疫グロブリン G と総免疫グロブリンを同時に検出し、抗体価の強弱や経時の変化を評価することができる試薬を開発した。これら 4 種類の抗 SARS-CoV-2 抗体検出試薬は測定機器として全自動化学発光酵素免疫測定装置 AIA-CL シリーズを用いて、迅速 (約 15 分) かつ多検体の測定が可能である。また、試薬の基本性能として、測定内、測

定間再現性は 5% 以内と良好であり、検体中の共存物質の影響を受けにくいことが確認された。

疫学的な観点から COVID-19 回復者から採取した臨床検体を用いて評価において、4 種類の抗 SARS-CoV-2 抗体検出試薬すべての抗体価は発症後 13 日目まで上昇傾向が認められ、13 日以降の感度は 100% に達した。また、感染後 6 カ月が経過した時点でも生存者の 98% が中和活性を有する抗体を保持していた。さらに SP 抗原に対する抗体が中和抗体価と高い相関性を有していることを確認した。これらの結果は、COVID-19 感染後の長期的な液性免疫反応に関する

知見を示すとともに、COVID-19 生存者のほとんどが中和活性を検出可能なレベルで維持しているという考えを支持するものであった。

一方、BNT162b2 ワクチン接種者に対する研究では、2 回目の接種から 1 週間後には急激な抗体価の上昇が確認されるとともに、ワクチンを 2 回接種することで SP-IgG は 10 Index 以上、NT50 は 100 以上を示すという結果が認められた。本研究から感染防御の閾値を設定することは困難であるが、COVID-19 の発症リスクを低下させるためには、一定以上の高い抗体価が必要であることを類推させるものといえる¹⁰⁾。さらに、本試薬で抗体価を定期的に確認することは感染防御の点から一定の意義があると考えられる。

以上より、今回開発した新型コロナウイルス抗体検出試薬は、感染既往者やワクチン接種者の液性免疫のモニタリングに有用であることが示された。特に現時点での新型コロナウイルスに対するワクチンは SP を主な標的としていることから、感染既往には NP 抗体試薬、ワクチン評価には SP 抗体試薬という使用方法が実用的であると考えられる。今後も新型コロナウイルスの基礎的、臨床的研究での活用を通じて研究現場や医療現場への貢献が期待される。

8. 謝辞

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 令和 2 年度ウイルス等感染症対策技術開発事業 (実証・改良研究支援) 「新型コロナウイルス抗体検出を目的としたハイスループットな全自動免疫測定方法の開発及び同測定方法の社会実装に向けた研究 (研究開発代表者: 梁明秀)」の支援を受けて行われました。臨床検体の収集や研究方針策定に多大なご協力をいただいた横浜市立大学 学術院医学群 微生物学 梁 明秀 主任教授、宮川 敬 准教授、同データサイエンス研究科 後藤 温 教授および山中竹春 先生 (元横浜市立大学 学術院医学群 臨床統計学 教授) に心より感謝を申し上げます。

9. 文献

- 1) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 診療の手引き (第 5.3 版)
- 2) Yamaoka, Y., et al., *Clin. Infect. Dis.* 23:c1aa637. doi: 10.1093/cid/c1aa637 (2020)
- 3) Kubo, S., et al., *Front Microbiol.* 11:628281 (2021)
- 4) Poh, C. M., et al., *Nat. Commun.* 11:2806.

doi:10.1038/s41467-020-16638-2 (2020)

- 5) Goto, A., et al., *Front Microbiol.* 12:661187 (2021)
- 6) Luchsinger, L. L., et al., *J. Clin. Microbiol.* 58:e02005-20 (2020)
- 7) Seow, J., et al., *Nat. Microbiol.* 5, 1598-1607 (2020)
- 8) Kato, H., et al., medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.23.21263927>
- 9) Wang Z., et al., *Nature.* 592, 616-22 (2021)
- 10) Gilbert PB., et al., medRxiv 2021.08.09.21261290.

