

新型コロナウイルス肺炎患者における抗体検査の検討

¹⁾ 埼玉県立循環器・呼吸器病センター呼吸器内科, ²⁾ 同 検査技術部

高久洋太郎¹⁾ 倉島 一喜¹⁾ 石黒 卓¹⁾ 鍵山 奈保¹⁾
 沼野 剛²⁾ 小池真由美²⁾ 横田 進²⁾ 高野 賢治¹⁾
 磯野 泰輔¹⁾ 西田 隆¹⁾ 河手絵理子¹⁾ 細田 千晶¹⁾
 小林 洋一¹⁾ 柳沢 勉¹⁾

(令和2年5月1日受付)

(令和2年5月26日受理)

Key words: COVID-19, rapid diagnosis, antibody, immunochromatography

要 旨

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の診断に、血液由来検体を用いた抗体検査法 (イムノクロマト法) の実用化が期待されている。今回我々は、PCR 検査で COVID-19 と確定診断された 52 症例を対象に、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体検査試薬キット (IgM 抗体検出キット, IgG 抗体検出キット) の陽性となる時期・割合を検討した。

最終的には、COVID-19 と確定診断された患者全例で抗体陽性が確認された。IgM 抗体が陽性化したのは、症状発現から平均 11.9 日 (最短 5 日, 中央値 11 日) であった。IgG 抗体が陽性化したのは、症状発現から平均 11.2 日 (最短 5 日, 中央値 11 日) であった。IgM キットと IgG キットを比較し、陽性化率・陽性化までの期間に有意差はなかったが、IgM が IgG に先行して陽性化する例はなく、IgM と IgG が同時陽性 45 例 (87%), IgG が IgM に先行して陽性 7 例 (13%) であった。SARS-CoV-2 PCR 検査陰性で、その後の経過より COVID-19 ではないと診断した急性期発熱・肺炎患者 35 例を対象とした検証では、6 例 (17.1%) で抗 IgG 抗体が陽性、1 例 (2.8%) で抗 IgM 抗体が陽性であった。

我々の検討結果は極めて限定的なものであり、この試薬の性能評価に帰結するものではない。イムノクロマト法による抗体検査試薬検査の今後が期待されるが、現時点ではあくまで PCR 検査に補完的な検査手法として慎重な対応が求められると考えられた。

[感染症誌 94: 495~499, 2020]

序 文

2019 年 12 月、中華人民共和国の湖北省・武漢市に端を発する新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、世界的に感染が拡大し¹⁾、我が国においても市中蔓延化の兆しが見られている²⁾。臨床の現場では、いかに早く正確に COVID-19 を診断するか、その手法の確立が急務となっている。

COVID-19 は、臨床的特徴に基づき感染が疑われる例に対し、喀痰・鼻咽頭ぬぐい液を用いた PCR 法による病原体の遺伝子検査を実施して陽性となった場合に確定診断される³⁾。しかし、この PCR 検査の実施には、検体から RNA を抽出して精製する煩雑な作業が

必要であり、専門的な設備・人員を要する。しかも、検査には時間を要するため、結果が判明するまで 1 日~数日を要するのが一般的である。設備・状況を問わず実施可能な、簡便かつ迅速性のある検査法が強く求められている。

こうした背景から、市中一般的な診療所でも検査可能な抗体検査法 (イムノクロマト法) の実用化に期待が寄せられている⁴⁾。同検査では、血液サンプルを用いて SARS-CoV-2 ウイルスに特異的な IgM 抗体・IgG 抗体を検出して感染の有無を判定できる。従前からウイルスや細菌感染の有無を判定するために使用されている手法と同一であり、所要わずか 15 分程度で結果が判明する。今回、我々は、PCR 検査により COVID-19 と確定診断された患者を対象に、抗体検査法 (イムノクロマト法) の有用性につき検討した。

別刷請求先: (〒360-0197) 埼玉県熊谷市板井 1696

埼玉県立循環器呼吸器病センター呼吸器内科
高久洋太郎

Table 1 Characteristics of the subjects

Subjects (n)	52
Male/Female (n)	36/16
Age (y)	63.6 ± 12.1
Interval from onset to admission (days)	6.8 ± 3.0
Comorbidity* (n, %)	24 (46)
WBC count (/μL)	6,003 ± 2,403
Lymphocyte count (/μL)	1,011 ± 434
Serum CRP (mg/mL)	7.1 ± 6.2
Serum d-Dimer (μg/mL)	2.1 ± 3.7

Mean (SD), *: diabetes, chronic obstructive pulmonary disease or hypertension

対象と方法

1. 試験デザイン

2020年2月7日から同年4月10日までに、SARS-CoV-2 PCR検査陽性で肺炎を合併し埼玉県立循環器・呼吸器病センターに入院した52例の血液サンプルを用いた。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体検査試薬キット (Kurabo, Ltd. Osaka, Japan)⁵⁾を用い、IgM抗体を検出するキット (IgMキット) とIgG抗体を検出するキット (IgGキット) が陽性となる時期 (診療録の症状発現日をDay1と設定) ・割合を検証した。さらに、急性期の発熱・肺炎患者35例の検体についても検討した。

2. サンプルテスト

適用したのは、全血・血漿・血清の3検体のいずれかとした。はじめに、それぞれの検体の約10μLをピペッターで試験ストリップの滴下ウェルに添加した。続いて、検体希釈液を試験ストリップの滴下ウェルに添加した。静置15分後に、コントロール (C) ラインが赤く描出された上で、IgMならびにIgGそれぞれの判定 (T) ラインが赤く描出されたことを視認できた場合に陽性とした。一方、判定 (T) ラインが未描出のものは陰性とした。

3. 倫理的側面

個人情報の管理について、患者名は匿名化され個人情報がかからないように配慮した。本研究は後方視的観察研究であり、院内倫理委員会の承認を得た (承認番号2019062)。各個人より研究発表に関しての同意を書面で得た。

4. 統計

臨床データは平均 (標準偏差) で表記した。統計にはJMP Ver.13 (SAS Institute Japan 株式会社, 東京都) を使用した。異なる群間の比較にはWilcoxon/Kruskal-Wallisの検定を使用し、カットオフ値の決定はROC曲線により求めた。相関関係の検定はSpearman Rank testを使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

成績

対象となったCOVID-19肺炎患者52例の患者背景をTable 1に示す。全例が鼻咽頭ぬぐい液を用いたSARS-CoV-2 PCR検査陽性で確定診断例であった。患者平均年齢は63.6 ± 12.1歳、男性が36例 (69%)、24例 (46%) が基礎疾患を有していた。入院時点で、症状発現から平均6.8日が経過していた。

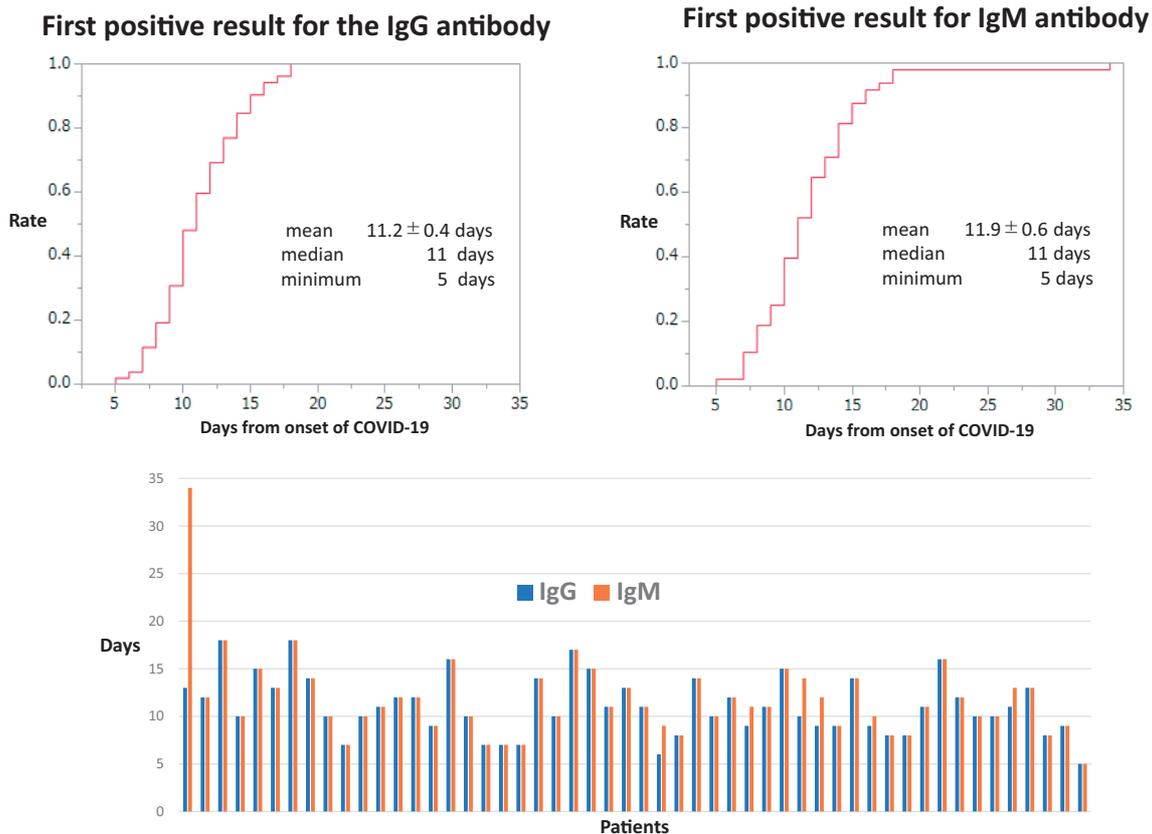
入院時より、IgMキットとIgGキットの双方が陽性化するまで検査を繰り返した。最終的には全例で陽性が確認された。IgM抗体が陽性化したのは、症状発現から平均11.9日 (最短5日, 中央値11日) であった。IgG抗体が陽性化したのは、症状発現から平均11.2日 (最短5日, 中央値11日) であった。IgMキットとIgGキットの陽性化時期に統計学的有意差はなかった。しかし、IgMキットに先んじてIgGキットが陽性化する傾向はみられ、7例 (13%) でIgGキットがIgMキットに先行して陽性、残り45例 (87%) はIgMキットとIgGキットが同時陽性であった。IgMキットがIgGキットに先行して陽性を示した症例はなかった (Fig. 1)。急性期発熱・肺炎で当センターを受診し、COVID-19以外の診断で治療し治癒に至り、治療前後で周囲にCOVID-19患者発生が確認されなかった患者35例にも本抗体検査を施行した。結果、IgGキットで6例 (17.1%)、IgMキットで1例 (2.8%) が陽性であった。

考察

中国で開発され、最近日本でも研究試薬として販売が開始された試薬：新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体検査試薬キット (Kurabo, Ltd. Osaka, Japan) を用い、PCR検査で確定診断された患者における陽性となる時期・割合について検討した。採血・検査を連日施行しておらず、抗体陽性化時期は、最後に陰性を確認した日から初めて陽性を確認した日の間の時期としてしか特定できていない。症状発現から初回陽性を示すまでに要した期間は、IgMキットは平均11.9日 (中央値11日)、IgGキットは平均11.2日 (中央値11日) であった。以上より、IgM抗体・IgG抗体とも概ね発症13日目までには抗体が陽性化すること、抗体陽性化時期に有意差はないがIgG抗体が先行する傾向にあること、検査したCOVID-19肺炎患者52例で偽陰性はないことが確認できた。

今日、COVID-19の確定診断に、PCR法による検査が行われている³⁾。しかし、この方法では結果が出るまでに時間を要する上、実施可能施設も限られる。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体検査試薬キットは、少量の血液由来検体 (血清・血漿・全血のいずれか) を用い、15分で新型コロナウイルス感染の有無を目視で判定できる⁵⁾。抗体検査には、感染初期に

Fig. 1 Interval from symptom onset to the first positive test result for antibody.



出現する IgM 抗体の検出を図る「IgM キット」と、感染進行期に出現する IgG 抗体の検出を図る「IgG キット」の 2 種がある。今回の我々の検討では、IgM キットと IgG キットの陽性化時期に有意差はみられず、いずれも陽性判定には発症後早くても 1 週間程度の時間を要していた。COVID-19 は、多くの症例において潜伏期が数日～2 週間程度と比較的長く、症状が出現してからさらに約 5～7 日程度経過した後から肺炎に至るなど、その病態の完成には比較的長い時間経過を示す特徴がある⁶⁾⁷⁾。潜伏期間を考えると感染から抗体産生には 2 週間程度を要することになる。中国での SARS-CoV-2 に対する IgM 抗体・IgG 抗体の定量的検討では、陽性化する中央値が IgM 抗体で発症から 12 日、IgG 抗体で 14 日と報告されており、陽性化時期としては当センターの結果とほぼ同様であった⁴⁾。

一般に、IgM 抗体はウイルス感染初期から出現し、IgG 抗体は発症後 1 週間以上経過後に上昇することから、我々の検討でも事前には IgM キットが早期から陽性化を示すことを想定していた。しかし、実際には IgM 抗体が IgG 抗体に先行して陽性化した症例はなく、統計学的有意差こそないが、IgM 抗体に先んじて IgG 抗体が陽性化するという通常の抗体出現パターンと真逆な傾向がみられた（一症例目だけ極端

に IgM 抗体陽性時期が遅かったのは、臨床都合による検査実施時期が影響している）。通常と異なる傾向がみられたことには様々な原因が考えられるが、その一つとして、本検討で用いた抗体キットが他の要因と交差反応を示している可能性が考えられる⁸⁾。今回の検討で使用した抗体キットは、SARS-CoV-2 を構成するヌクレオカプシドタンパク質（NP）を抗原として使用しているとされるが、その詳細は明らかにされていない上、交差反応を検証したデータも存在していない。そこで我々は、急性期発熱・肺炎で当センターを受診し、SARS-CoV-2 PCR 陰性で COVID-19 以外と診断されて治療し治癒に至った患者 35 例にも抗体検査を施行した。結果、IgG 抗体で 6 例（17.1%）、抗 IgM 抗体で 1 例（2.8%）の陽性が確認された。これら抗体陽性例では、治療前後でも症例周囲に COVID-19 発生は確認されなかった。抗 IgG 抗体陽性 6 例で multiplex PCR を行うと、2 例で季節性コロナウイルス（HKU 型、Cor43 型）が検出され、1 例で adenovirus が検出された。抗 IgG 抗体陽性例については、1 か月以上前の COVID-19 感染の既往を反映する可能性もあるが、当地域での SARS-CoV-2 蔓延状況を考えるとその可能性は極めて低い。臨床的には偽陽性と考えられた。抗 IgM 抗体が陽性であった 1 例も、COVID-

19以外の診断がなされた上にその後の臨床経過も矛盾なく、COVID-19確定例ではIgMキットが単独で陽性となる症例はなかったことなどから、こちらも偽陽性と考えられた。今回使用した抗体キットの製品カタログには、IgM抗体検出用キットの正診率95.72%、IgG抗体検出用キットの正診率94.24%との記載があり、いずれも500例以上を対象とした臨床試験（試験内容詳細記載なく不明）の結果とされている⁵⁾。しかし、我々の検討結果からは、両キットの正診率が90%以上という数値には、まだ慎重な姿勢で臨む必要がある。

急性疾患における抗体検査結果を判断する際に、COVID-19確定診断症例との抗体キットにおけるライン描出パターンの相違を知ることが役立つかもしれない。PCR検査でCOVID-19と確認された症例では、抗体キットに一旦薄いラインが確認されると、翌日以降には濃いラインとなって確認された。一方で、偽陽性と考えられた症例では、描出されるラインはごく薄く、翌日以降の再検査でもラインは薄いまだだった。再現性はみられるものの、結論を得るには不十分なデータであることから、今後も症例を大幅に増やしさらに詳細なる検討を進める予定である。

今回我々が検討した抗体検査試薬は、PCR検査にはない利点を有している。まず、専門的な設備・器具や人員を要せず、どこでも安価かつ迅速に検査判定できる。PCR検査がその実施に時間的・施設の制約がある中で、その意義は大きい。PCR検査は、採取サンプル中のウイルス量の影響を受けやすく、サンプル採取方法や採取部位によっては偽陰性を示す可能性がある。特にSARS-CoV-2感染は下気道から始まるとされることから⁹⁾、もっぱら上気道検体を用いるPCR検査には偽陰性のリスクがつきまとう。しかし、血液中の抗体を検出する抗体検査試薬では、こうした偽陰性の可能性は低いことが期待される。また、血液を使った判定は、検体採取時の医療従事者への二次感染リスクも軽減される。一方で、抗体試薬検査はPCR検査とは異なりウイルスの感染既往の有無を判定するのみであり、現在の体内におけるウイルスの存在については明らかにできない。抗体検査にはPCR検査を補完するものとしての役割、ハイリスク集団のスクリーニング、疫学調査などの役割が期待されている。

今回の我々の検討で得られた成績は、極めて限定的なものである上に症例数も少なく、この試薬の性能評価に帰結せしめられるものではない。しかし、偽陽性

の可能性が示唆されるなど、臨床応用には特段の慎重さが求められる内容となった。だが、抗体検査は、設備や人員を必要とせず安価かつ迅速に検査判定できる上、血液を使って判定できるなどそのメリットは決して小さくない。PCR検査に補完的な新型コロナウイルス検査の手法として、今後のさらなる検討と臨床応用が期待される。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) World Health Organization : Coronavirus disease(COVID-19)Pandemi [Internet]. [cited 2020 Apr. 19]; Available from : <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- 2) 厚生労働省 : 新型コロナウイルス感染症について [Internet]. [cited 2020 Apr. 19]; Available from : https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000164708_00001.html.
- 3) 厚生労働省新型コロナウイルス感染症対策推進本部 : 新型コロナウイルス感染症 COVID-19 診療の手引き第1版 [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr. 19]; Available from : <https://www.mhlw.go.jp/content/000609467.pdf>.
- 4) Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, *et al.* : Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020 ; ciaa344 doi : 10.1093/cid/ciaa344 [Epub ahead of print].
- 5) 倉敷紡績株式会社 (KURABO) : 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗体検査試薬キット (イムノクロマト法) [Internet]. [cited 2020 Apr. 19]; Available from : <https://www.kurabo.co.jp/bio/product/products.php?M=D&PID=232>.
- 6) Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, *et al.* : Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020 ; 382 (18) : 1708-20.
- 7) Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, *et al.* : The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019(COVID-19)From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med.* 2020 ; 172 (9) : 577-82.
- 8) Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, *et al.* : Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease(COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020 ; ciaa310 doi : 10.1093/cid/ciaa310 [Epub ahead of print].
- 9) Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, *et al.* : Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020 ; 395 (10223) : 497-506.

Antibody Response as Assessed by A Rapid Immunochromatographic Assay in Patients with COVID-19 Pneumonia Caused by the Novel Coronavirus, SARS-CoV-2

Yotaro TAKAKU¹⁾, Kazuyoshi KURASHIMA¹⁾, Takashi ISHIGURO¹⁾, Naho KAGIYAMA¹⁾,
Tsuyoshi NUMANO²⁾, Mayumi KOIKE²⁾, Susumu YOKOTA²⁾, Kenji TAKANO¹⁾, Taisuke ISONO¹⁾,
Takashi NISHIDA¹⁾, Eriko KAWATE¹⁾, Chiaki HOSODA¹⁾,
Yoichi KOBAYASHI¹⁾ & Tsutomu YANAGISAWA¹⁾

¹⁾Department of Respiratory Medicine, and ²⁾Department of inspection, Saitama Cardiovascular and Respiratory Center

An immunochromatographic assay that has been developed for the detection of antibodies in blood-derived specimens is raising expectations for the diagnosis of COVID-19, the disease caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. Herein, we studied the interval from symptom onset to the first positive results of the immunochromatographic assay for IgM and IgG antibodies in 52 patients with a definitive diagnosis of COVID-19 (disease confirmed by the PCR test). Furthermore, we also examined the test results in 35 patients with acute fever and pneumonia who were negative by the PCR test.

All patients with a definitive diagnosis of COVID-19 were confirmed to be antibody-positive. The mean time from symptom onset to the first positive result for IgM antibody was 11.9 days (minimum : 5, median : 11), and that to the first positive result for IgG antibody was 11.2 days (minimum : 5, median : 11). No significant difference was observed between the tests for IgM and IgG antibodies in terms of the percentage of positive patients or the interval from first onset to the first positive test result. There were no patients in whom the test for IgM became positive before the test for IgG. In 45 patients (87%), both IgM and IgG became positive at the same time, and in the remaining 7 patients (13%), the test for IgG became positive before that for IgM.

Of 35 patients with acute fever and pneumonia who tested negative by the PCR test for SARS-CoV-2, not COVID-19, 6 (17.1%) and 1 (2.8%) showed positive results for anti-IgG antibody and anti-IgM antibody, respectively.

Our study results were quite limited, and we do not intend to conduct a performance evaluation of the reagents contained in the detection kits. Assessment of antibody detection reagents for the immunochromatographic assay, which can be used as a complementary test to PCR, is expected in the future ; however, the findings should be reviewed carefully.