

新型コロナウイルス肺炎患者における抗体検査陽性化時期の検討

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⁾ 高柳 昇¹⁾ 柳沢 勉¹⁾

Key word: SARS-CoV2, COVID-19, イムノクロマト試薬

要 旨

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、ならびに全血・血漿・血清サンプルにおける反応性の違いについて検証した。

最終的に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 12.5 日（最短 7 日、中央値 12 日）であった。IgG 抗体が陽性化したのは、症状発現から平均 11.6 日（最短 7 日、中央値 12 日）であった。逆に、IgM 抗体の陰性が確認できた期間は、症状発現から平均 7.1 日（中央値 8 日）であった。IgG 抗体の陰性が確認できた期間は、症状発現から平均 7.0 日（中央値 8 日）であった。症状発現から 10 日以上を経過しても陰性を確認できた例はなかった。IgM キットおよび IgG キットにおいて、陽性化率・陽性化までの期間・陰性持続期間に有意差はなかった。血液由来検体のうち血漿サンプルが最もラインの描出が明瞭な傾向にあった。

我々の検討から、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、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

背 景

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）の世界的な感染拡大に伴い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て 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、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、市中で広く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新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）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）につき検討した。

方 法

【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 24 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、ならびに全血・血漿・血清サンプルにおける反応性の違いについて検討した。

【サンプルテスト】

適用したのは、採血で得られた血漿検体とした。はじめに、検体の約 10 μ L 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。

【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分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するの同意を書面で得た。

【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。

結 果

対象となった新型コロナウイルス肺炎患者 24 名の患者背景を 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 64.1 ± 12.7 歳、男性が 15 例 (63%)、9 例 (37%) が基礎疾患を有していた。入院時点で、症状発現から平均 6.3 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 12.5 日 (最短 7 日、中央値 12 日) であった。IgG 抗体が陽性化したのは、症状発現から平均 11.6 日 (最短 7 日、中央値 12 日) であった。逆に、IgM 抗体の陰性が確認できた期間は、症状発現から平均 7.1 日 (中央値 8 日) であった。IgG 抗体の陰性が確認できた期間は、症状発現から平均 7.0 日 (中央値 8 日) であった。症状発現から 10 日以上を経過しても陰性を確認できた例はなかった。IgM キットおよび IgG キットにおいて、陽性化率・陽性化までの期間・陰性持続期間に有意差はなかった (Fig.1)。

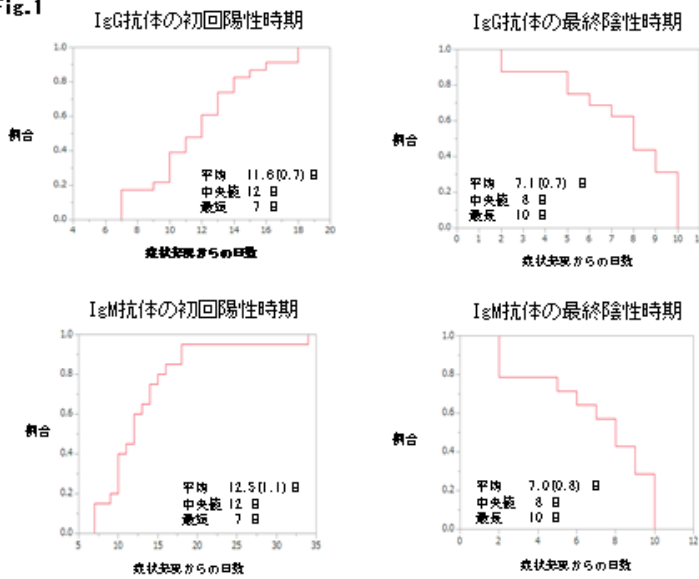
同一検体における全血・血漿・血清の違いによるラインの描出の違いについても、3 例の陽性検体を用いて検討した。全血・血漿・血清の全てで反応が確認できたが、ラインの描出は血漿で最も明瞭である傾向があり、以降、全血・血清の順であった (Fig.2)。

Table 1 Patient Characteristics

Total Number	M/F	Age	Admission from onset (days)	Comorbidity* (n, %)	WBC (μ L)	Lymphocyte (μ L)	CRP (mg/mL)	d-Dimer (μ g/mL)
24	15/9	64.1 (12.7)	6.3(2.7)	9, 37.5	6,179 (3,118)	983 (471)	6.4 (6.9)	1.3 (0.5)

mean \pm SD, *: diabetes, chronic obstructive pulmonary disease or hypertension

Fig.1

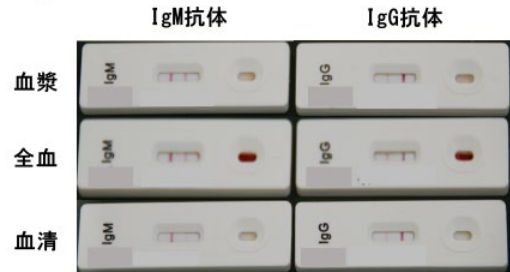


考 察

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 検査によって確定診断された患者における陽性となる時期・割合、ならびに全血・血漿・血清サンプルにおける反応性の違いについて検討した。採血は毎日ではなく週に 1～3 回であったため、抗体陽性化時期は、最後に陰性を確認した日から陽性を初めて確認した日の間の時期としてしか特定できていない。今回、少数例での検討ではあるが、症状発現から 10 日以上を経過しても陰性を確認できた例はなかった。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 12.5 日（中央値 12 日）、IgG キットは平均 11.6 日（中央値 12 日）であった。以上より、IgM 抗体・IgG 抗体とも抗体陽性化時期は 10 日から 12 日の間にいること、IgM 抗体・IgG 抗体の出現時期はほぼ同じこと、検査した 24 名で偽陰性はないことが確認できた。初回陽性確認時には、IgM 抗体のラインと比較し IgG 抗体のラインは明瞭であった。本キットでは、IgM 抗体の方が IgG 抗体よりも早期診断に役立つとは言えない点には注意が必要と思われたが、この点に留意すれば、抗体検査試薬キットは COVID-19 の確定診断に有用であると考えられた。

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

Fig.2



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。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、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。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 IgM でも 2 週間以上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、発症から抗体が陽性化するまでの時期の中央値が、IgM 抗体で 12 日、IgG 抗体で 14 日と報告されており、IgM 抗体が IgG 抗体に先行しているものの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⁾。かような結果には、COVID-19 の持つ臨床経過の特徴が反映されているのかもしれない。また、興味深いこと

に、中国での報告では発症から 2 週間以後の検体では抗体量が多いほど重症例が多かったとされている⁴⁾。判定ラインの濃さも臨床上の参考になるのかもしれない。発症 10 日以上を経過して抗体陰性が持続し、抗体が陽性化しない症例は皆無であった。抗体検査では血液中に抗体が存在すれば判定が可能のため、抗体検査では偽陰性が出にくいという特徴を示すものと考えられた。

現時点で擬陽性、偽陰性につき詳細に検討された報告はなく、当センターでも今後は症例を増やし検討していく予定である。あくまで参考データではあるが、当院で経験した既知のコロナウイルス（**Human Coronavirus : HCoV**）によるウイルス肺炎患者の検体では、IgG キットでごく薄いラインの発現が確認された。その他の気管支肺炎患者（起炎菌・ウイルス検索するも不明）2 症例や、脳梗塞で搬送されるも発熱症状を来していたため検査した 2 症例でも、SARS-CoV-2 PCR 検査陰性で IgM キット陰性にも関わらず IgG キットは陽性を示した。いずれも共通してラインの描出は薄かった。COVID-19 と確認された症例では、いったん薄いラインが確認されると翌日以降の検体ではさらに明瞭なラインが描出される。IgG キットのみが陽性かつ薄いラインが見られる場合には、PCR 検査で確認するとともに、翌日以降に再検査することも有用かもしれない。

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 法は、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⁸⁾。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が用いられる 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 検査と異なってウイルスの感染の有無を判定するのみであり、現在の体内への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。

我々の検討は、症例数が少なく、データも極めて限られたものであることから、この試薬の性能評価としては限定的なものである。さらに、イムノクロマト法による抗体検査試薬は、今回の我々の検討からは発症 1 週間以内の早期症例の診断には不向きである可能性が示唆されている。しかし、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、今後が期待される。

文 献

- 1) WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (accessed Apr 19, 2020)
- 2) 厚生労働省 新型コロナウイルス感染症について https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000164708_00001.html (accessed Apr 19, 2020)
- 3) 新型コロナウイルス感染症 COVID-19 診療の手引き <https://www.mhlw.go.jp/content/000609467.pdf> (accessed Apr 19, 2020)
- 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 Mar 28. pii: 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） <https://www.kurabo.co.jp/bio/product/products.php?M=D&PID=232> (accessed Apr 19, 2020)
- 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 Feb 28. doi: 10.1056/NEJMoa2002032. [Epub ahead of print]
- 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 Mar 10. doi: 10.7326/M20-0504. [Epub ahead of print]

8) Yang Y, Yang M, Shen CG, *et al.* Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. medRxiv 2020; published online Feb 17. DOI: 10.1101/2020.02.11.20021493

9) Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.