

抗 SARS-CoV-2 IgG および IgM 抗体を検出する定量性・再現性の高い新規測定試薬の開発

野田 健太^{*1}, 松田 幸樹^{*2}, 柳下 薫寛^{*3}, 前田 賢次^{*2}, 秋山 裕太郎^{*4}, 寺田 純子^{*5,6},
松下 弘道^{*7}, 岩田 敏^{*8}, 山下 和人^{*1}, 新 勇介^{*1}, 渡部 俊介^{*1}, 井出 信幸^{*9},
吉田 智一^{*1}, 大曲 貴夫^{*4}, 満屋 裕明^{*2,10,11}, 濱田 哲暢^{*3}

- *1 シスメックス株式会社 中央研究所：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒651-2271)
- *2 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 難治性ウイルス感染症研究部
- *3 国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 分子薬理研究分野
- *4 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 国際感染症センター
- *5 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 臨床研究センター
- *6 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター病院 呼吸器内科
- *7 国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 臨床検査科
- *8 国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 感染症部
- *9 シスメックス株式会社 バイオ診断薬センター
- *10 アメリカ国立衛生研究所 (NIH) アメリカ国立がん研究所 (NCI) HIV/AIDS 悪性腫瘍部門 レトロウイルス感染症研究部
- *11 熊本大学病院 総合臨床研究部

責任著者：前田 賢次, 吉田 智一, 濱田 哲暢

現在、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (以下、SARS-CoV-2) に対して使用されている血清学的検査は、定量性や再現性が不十分だと考えられている。そこで本研究では、高い定量性・再現性を有し、かつ血中干渉物質の影響を受けない SARS-CoV-2 に対する IgG および IgM 測定試薬を開発した。本測定試薬は化学発光酵素免疫測定法を原理とする全自動免疫測定装置 HISCL™ シリーズ (シスメックス株式会社) を用い、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質およびヌクレオカプシドタンパク質に特異的な IgG および IgM を標的としている。これらの定量性および再現性は SARS-CoV-2 感染者の検体を希釈したサンプルを用いて評価した。試薬性能は、SARS-CoV-2 感染者 60 名の血清検体と SARS-CoV-2 発生前に採取した SARS-CoV-2 陰性 500 名の血清検体を用いて評価した。開発した測定試薬は高い定量性 (定量範囲: 10^2) と再現性 (5%以内) を示し、SARS-CoV および MERS の S タンパク質に対する交差反応は認めなかった。臨床感度はスパイクタンパク質に対する IgG および IgM ではそれぞれ 98.3%, 93.3%, ヌクレオカプシドタンパク質に対する IgG および IgM ではそれぞれ 100%, 71.7%であった。患者群の平均抗体価は陰性検体群と比較して、入院時では 10 倍以上、回復期では 100 倍以上高かった。入院時の臨床的重症度と IgG および IgM の抗体価には関連がなかった。高い臨床性能と定量性・再現性を併せ持つ本測定試薬は、SARS-CoV-2 の感染やワクチンの有効性検証における血清学的・免疫学的時系列プロファイルに役立つと考えられる。

本稿は、Scientific Reports, Vol.11, 5198 (Published online March 4, 2021) を、クリエイティブ・コモンズ・ライセンス (表示 4.0 国際) のもと、翻訳・転載したものです。

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84387-3>

HISCL SARS-CoV-2 S-IgG 試薬は研究用です。

HISCL SARS-CoV-2 N-IgG 試薬, HISCL SARS-CoV-2 N-IgM 試薬, および HISCL SARS-CoV-2 S-IgM 試薬は非売品です。

はじめに

中国で発生した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（以下、SARS-CoV-2）は、急速に世界中へ広がっている。SARS-CoV-2は、一部の症例では死に至るCOVID-19と名付けられた重症急性コロナウイルス感染症を引き起こすため、世界的な公衆衛生上の脅威とみなされている^{1~4}。しかし現在、COVID-19に対する特異的な治療薬は存在しない。さらに、COVID-19回復者でも体内にSARS-CoV-2が残存している場合や、再感染する可能性があり、パンデミックが長期化する原因となっている。このような状況のなか、COVID-19に対する高性能かつ安価な診断ツールの開発が求められている。

現在、臨床現場では、SARS-CoV-2ゲノムを検出するポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR）検査が広く利用され、感染陽性/陰性を確認するゴールドスタンダードとして使用されている^{5,6}。最近では、PCR検査に比べ感度や精度がやや劣るものの、抗原検査も使用されている⁷。

SARS-CoV-2に対する免疫機能を評価する抗体検査は、患者の感染歴やウイルスの中和活性を反映すると考えられている⁸。血液を用いた診断用途の抗体検査では、主にIgGとIgMの抗体価を評価することが多い^{9~11}。一般的なウイルス感染症と同様に、COVID-19においても感染初期にIgMが上昇し、その後IgGが上昇することが報告されている¹²。一方で、SARS-CoV-2感染初期において、IgMよりもIgGが増加するとの報告もある^{13,14}。さらに、SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質や受容体タンパク質（スパイクタンパク質、S1ドメイン、受容体結合ドメイン）など、様々なSARS-CoV-2のタンパク質に対する抗体価を測定する方法が開発されている^{15~19}。SARS-CoV-2を構成する各タンパク質に対する抗体価と臨床症状の関係は、未だ明らかではないことから^{20~22}、より高い診断能を示す標的タンパク質を同定する必要がある。現在、いくつかのSARS-CoV-2に対する抗体検査キットが研究用として販売されているが、その試薬性能は低く、結果の信頼性や品質も低い^{17,23~25}。現在市販されているイムノクロマト法によるCOVID-19抗体検査は定性検査であり、臨床現場において偽陰性を示す

原因の一つとなっている。研究用として酵素免疫測定法（ELISA）による定量測定キットが存在するが、測定精度や測定範囲が不十分である。また、市販されている自動免疫測定装置を用いた測定試薬は、定性的な判定をするものに限られている^{26,27}。今後、定性的に陽性判定を行うだけでなく、ワクチン接種時の抗体価のモニタリングや閾値の設定などのために高精度の定量測定法が必要である。加えて、抗体価を経時的に観察するためには、定量的で測定範囲の広いモニタリングシステムが必要である。したがって、適切な標準物質を有し、妥当なコストで使用できる高品質な血清学的検査が求められている。

本研究では、化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）^{28,29}を原理とする全自動免疫測定装置HISCLTMシリーズ（シスメックス株式会社：以下、HISCL、シスメックス）を用いた、スパイク（S）タンパク質およびヌクレオカプシド（N）タンパク質の2種類のSARS-CoV-2抗原に対するIgGおよびIgM（N-IgG、S-IgG、N-IgM、S-IgM）を検出する新規定量測定試薬の試薬性能を報告する。HISCLは、標準的なELISAと比較して反応が迅速（17分）でダイナミックレンジが広く、かつ再現性も高いため、臨床分野で広く使用されている。本開発試薬の分析性能は、感度、特異度および再現性にて評価した。さらに、本開発試薬の臨床有用性としては、SARS-CoV-2感染者の入院時および回復期の抗体価（N-IgG、S-IgG、N-IgM、S-IgM）を評価した。

結果

分析性能

抗SARS-CoV-2抗体を検出する分析法の開発

検量線

化学発光強度と抗体価の相関性を評価するため、SARS-CoV-2陽性血漿の希釈試料における発光強度を抗体価に対してプロットし、検量線を作成した（図1）。

再現性

測定試薬の再現性は、2濃度のSARS-CoV-2試料を用いて評価した。測定内変動係数（以下、CV）

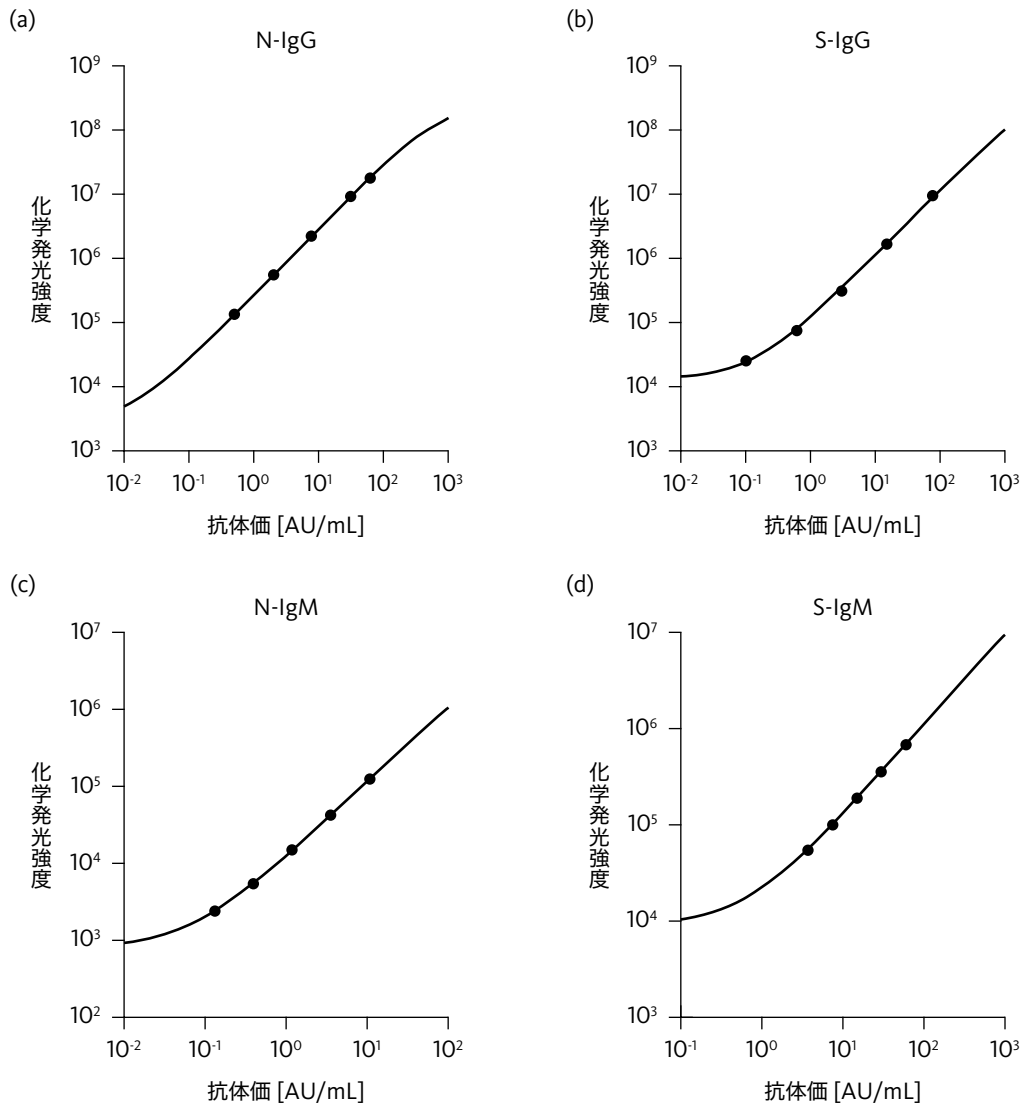


図1. 化学発光強度と各抗体価の関係
N-IgG (a), S-IgG (b), N-IgM (c), S-IgM (d) の検量線

は、各試料を10回反復測定して算出した。N-IgG, S-IgG, N-IgM, S-IgMの測定内CVはそれぞれ1.4%未満, 3.3%未満, 2.1%未満, 1.2%未満であった (Supplementary Table 1)。

干渉物質

一般的な血液成分による測定結果への干渉の有無を、血漿検体に干渉物質を添加することで評価した。いずれの物質でも、添加試料と非添加試料との差は15%未満であった。

交差反応性

ヌクレオカプシドタンパク質を用いた測定試薬では、SARS-CoV抗原の添加により、すべてのSARS-CoV-2抗体陽性検体においてSARS-CoV-2抗原を添加したときと同程度の阻害がみられた。NL63抗原および229E抗原の阻害率は検体によって異なるものの、SARS-CoV-2抗原の阻害率の40~70%となった。一方、Sタンパク質を用いた測定試薬では、いずれの検体においても交差反応性はほとんど認められなかった (Supplementary Figure 1)。なお、SARS-CoV-2抗体陰性検体に抗原を添加した際の定量値はいずれも0.5 AU/mL未満であった。

臨床性能

感度, 特異度および AUC の評価

陽性・陰性の予測に対する N-IgG, S-IgG, N-IgM, S-IgM の ROC 曲線を図 2 に示す。N-IgG, S-IgG, N-IgM, S-IgM の AUC はそれぞれ 0.9998, 0.9984, 0.8391, 0.9671 であった。N-IgG と S-IgG の感度および特異度は 98% 以上であった。N-IgM の感度および特異度はそれぞれ 71.7%, 83.4%, S-IgM の感度および特異度はそれぞれ 93.3%, 93.6% であった (Supplementary Table 1)。

入院時および回復期における抗 SARS-CoV-2 抗体価 (IgG および IgM) をすべての患者検体で評価した。また、陰性対照群として、非感染者 500 名の血液検体中の IgG および IgM の抗体価についても評価した。図 3 に示すように、患者検体における回復期の血清抗体価は、すべての抗体種 (N-IgG, S-IgG, N-IgM, S-IgM) において入院時よりも高値であった。入院時の N-IgM および S-IgM は総じて N-IgG および S-IgG よりも高値であり (表 1), これは、ウイルス感染患者では抗原曝露後に IgM が IgG よりも早期に増加するという一般的な感染症の挙動と一致していた。ただし、COVID-19 患者では N-IgM および S-IgM が非感染者よりも高値であるものの、非感染者において高い偽陽性率を示すため、

COVID-19 の診断に IgM を使用するのとは実用的ではない。

Supplementary Figure 2 に、本開発試薬と研究用に販売されている SARS-CoV-2 IgG ELISA キット (Euroimmun) の比較を示す。計 19 名の患者の入院時と回復期における抗体価を両手法で評価した結果、どちらの手法においても入院時と回復期において有意な差を示した (Supplementary Figure 2)。ただし、HISCL を用いた本開発試薬の方がこの差異をより精度良く検出できる可能性が示唆された。

続いて、すべての患者の臨床情報を入手し解析した (表 2)。まず、すべての患者を観察中の症状および治療法に基づいて 3 群 (中等症, 重症, 重篤) に分類した (定義については表 2 の脚注を参照)。次に、患者の重症度が抗体価に影響し得るかどうかを検討した。入院時の抗体価は、4 種類の抗体とも重篤患者群が 3 群中で最も高値であったが、有意差を示したのは S-IgM のみであった ($P < 0.05$) (表 1)。また、回復期では、重症および重篤患者群が中等症患者群よりも高い抗体価を示した。この結果から、SARS-CoV-2 に対する強力な免疫を獲得するためには、(重症や重篤患者において) 多量のウイルスに曝露された期間が重要な因子であることが示唆された。

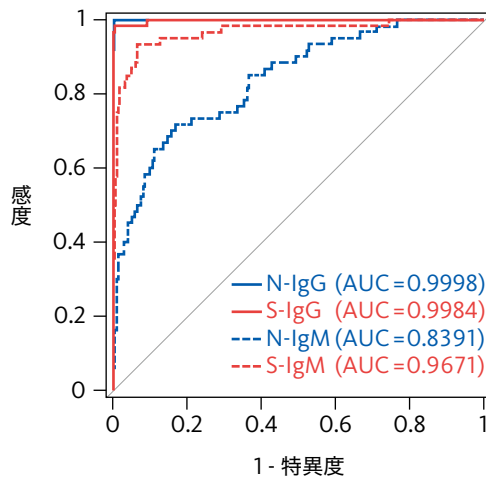


図 2. SARS-CoV-2 抗体の臨床性能

回復期の患者検体と陰性検体の予測に対する各試薬の ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線。青線: N-IgG, 赤線: S-IgG, 青点線: N-IgM, 赤点線: S-IgM, ロジスティック回帰モデルで推定。灰色の線はランダム分類を示す。

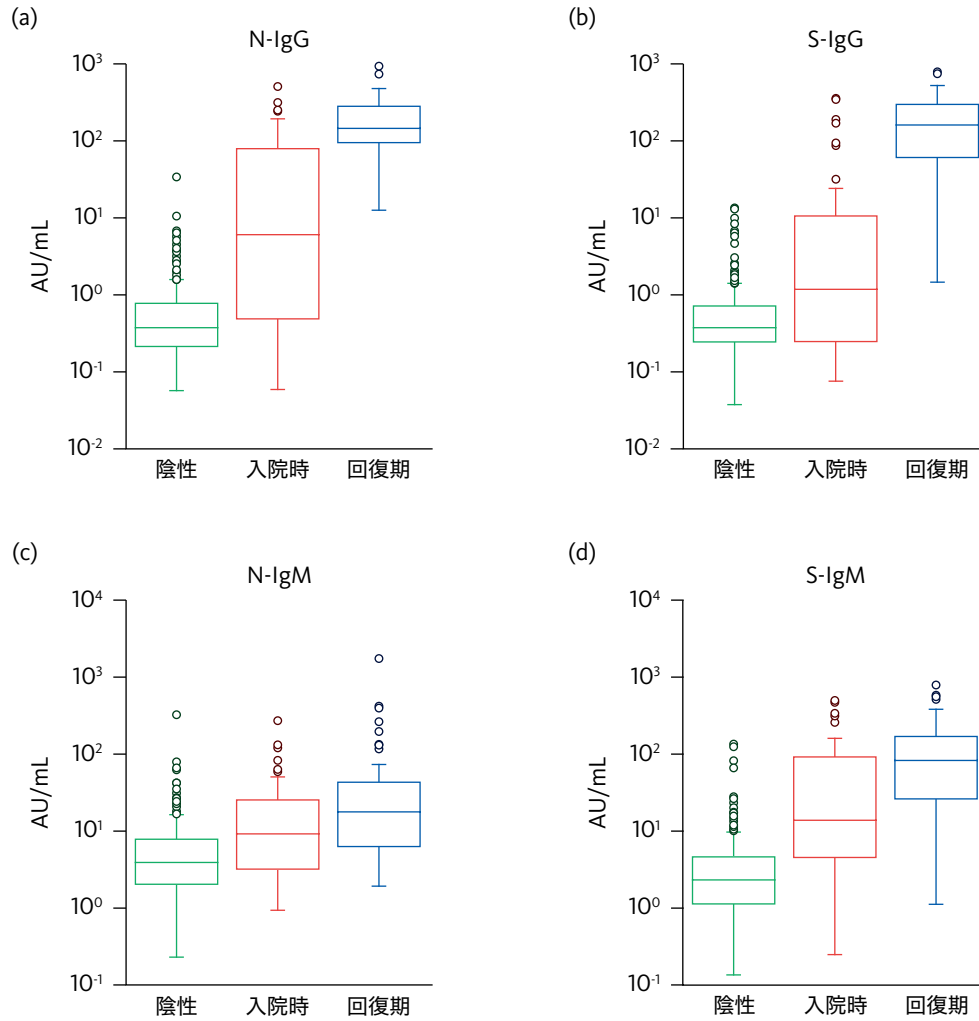


図3. 陰性検体および入院時・回復期の患者における抗体価の比較

500例の陰性検体, 50例の入院時患者検体, 60例の回復期患者検体を各抗体試薬で測定した。
N-IgG (a), S-IgG (b), N-IgM (c), S-IgM (d).

表1. 入院時から回復期における SARS-CoV-2 抗原に対する IgG および IgM の変化

抗体濃度は中央値 (分布範囲) で示した。P 値は Mann-Whitney U 検定および Steel-Dwass 検定により求めた。
C : 重篤, M : 中等症, S : 重症, n.s. : 有意でない。

抗体	入院時				回復期				P-value: 入院時 vs 回復期		
	中等症	重症	重篤	P-value	中等症	重症	重篤	P-value	中等症	重症	重篤
N-IgG	3.4	6.6	51.5	M vs S, n.s.	101.8	214.7	159.2	M vs S, <0.01	<0.001	<0.001	n.s.
(AU/mL)	(0.4-72.8)	(1.6-78.8)	(2.1-156.4)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.	(62.4-205.3)	(127.2-345.8)	(132.2-282.6)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.			
S-IgG	1.6	0.5	6.3	M vs S, n.s.	93	242.6	216.4	M vs S, <0.01	<0.001	<0.001	<0.05
(AU/mL)	(0.2-15.8)	(0.3-2.3)	(1.1-104.5)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.	(44.6-217.0)	(154.9-375.9)	(123.6-448.7)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.			
N-IgM	10.4	7.6	15.2	M vs S, n.s.	13.9	26.5	18.6	M vs S, n.s.	n.s.	<0.05	n.s.
(AU/mL)	(2.7-19.3)	(3.5-59.5)	(9.4-28.4)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.	(5.5-40.5)	(15.0-49.6)	(16.6-28.7)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.			
S-IgM	22.3	9.4	125.8	M vs S, n.s.	51.1	98	196.1	M vs S, n.s.	n.s.	<0.001	n.s.
(AU/mL)	(3.6-111.1)	(3.5-37.5)	(41.7-304.5)	S vs C, <0.05 M vs C, n.s.	(15.6-153.7)	(57.4-166.3)	(59.3-607.6)	S vs C, n.s. M vs C, n.s.			

表2. 患者情報および検体採取情報

変数	発症初期	回復期
検体採取日	2020/2/24 ~ 2020/5/3	2020/4/11 ~ 2020/6/2
検体数合計	50	60
性別 (男/女)	39 / 11	48 / 12
年齢, 中央値 (範囲)	50 (23-85)	53 (25-85)
発症後日数, 中央値 (範囲)	9 (1-25)	36 (20-95)
重症度 ¹ (中等症/重症/重篤)	26/19/5	36/19/5

¹重症度の定義 (中等症: 発熱または倦怠感あり, 肺炎の有無は不問, 酸素吸入は必要としない, 重症: 発熱, 倦怠感, 呼吸困難, 重度の肺炎が確認され, かつ酸素吸入が必要, 重篤: 発熱, 倦怠感, 重度の呼吸困難, 重篤な肺炎が確認され, かつ陽圧換気+体外膜型人工肺 (ECMO) が必要.)

考 察

抗 SARS-CoV-2 特異的抗体を検出する血清学的検査は, 地域社会での COVID-19 の広がりを把握するうえで重要な手段である。これらの特異的抗体の存在は, 本ウイルスに曝露されたという免疫学的な証拠となる。SARS-CoV-2 に対する免疫反応では, 感染後数日のうちにまず IgM が増加し, 次いで IgG が増加する。その後これらの抗体価は, ウイルスが排除された後でも, 感染歴を示す免疫学的バイオマーカーとなる。イムノクロマト法は陽性と陰性を区別するための定性試験として利用されてきたが, 血中の抗体価を定量的に測定できる迅速かつ簡便な方法が求められている。本研究では, SARS-CoV-2 感染を検出するだけでなく, 獲得免疫を反映する抗体価を定量的に測定できる高感度定量測定法を示した。

本研究で開発した方法は, SARS-CoV-2 受容体結合ドメイン (以下, RBD) に対する IgG および IgM の検出を目的としている。特に, S および N タンパク質の定量, ならびに獲得免疫に関連する抗体価の評価は, ワクチン開発のための有用な指標となることが期待される。本測定法の妥当性の評価は, 中和抗体の主要な標的となる³¹⁾ RBD に対する抗体を検出する既報の ELISA³⁰⁾ を用いて実施した。製造の難易度が高い三量体で安定化する S タンパク質とは異なり, RBD は非常に安定した構造であるため, 大規模な ELISA キット製造に向けたスケールアップが容易である。また, RBD の免疫原としての性

質を踏まえると, RBD は集団レベルでのウイルスへの曝露や感染者の免疫に直接関わる抗体価を定量するのに有用な標的であると考えられる。一方で, 感染時に大量に生成される N タンパク質やエンベロープタンパク質などの膜タンパク質を含む他のウイルス成分が^{32, 33)}, さらに診断的価値を生み出す可能性がある。このことは, 抗原濃度が抗体の産生に影響する可能性があることから, 感染初期において特に注目すべきである。

さらに, 抗原濃度が抗体産生に影響を与える可能性があるため, 抗体価の定量測定は感染初期での診断に有用であると考えられる。さらに, 抗体価や免疫反応を定量化することで, SARS-CoV-2 感染症に対する理解を深めることもできる。現在, いくつかの抗体検査法が報告されているが, 抗体価の定性測定の結果が SARS-CoV-2 に対する免疫力を反映するか否かは明らかではない。さらに, スパイク抗原の RBD 以外の部位を標的とする抗体や, 抗体のエフェクター機能を増強させる能力を持つ抗体も, 免疫に寄与する可能性がある。したがって, 別の抗原を用いた次世代測定法の開発は, RNA 検査ができない場合における早期診断としての価値があり, 免疫反応を反映する抗体価についてのさらなる知見が得られる可能性がある。

本稿では, HISCLを用いた N-IgG, S-IgG, N-IgM, S-IgM の迅速かつ再現性の高い測定法について報告した。開発した測定法は高い再現性と広いダイナミック

レンジを有し、一般的な血液成分の影響を受けず、コロナウイルス感染者において高い抗体価を示した。また、開発した抗 S タンパク質抗体測定試薬は SARS-CoV-2 の S タンパク質に対する抗体を特異的に検出し、一般的な風邪コロナウイルスのタンパク質に対する抗体は検出しなかった (**Supplementary Figure 1**)。本測定試薬は、他の S タンパク質を標的とする抗体との間で起こり得る交差反応を避けるため、標的抗原の立体構造を認識するように設計した³⁴⁾。一方、抗 N タンパク質抗体測定試薬は、N タンパク質の相同性がコロナウイルスファミリー間で高いため、風邪コロナウイルスのタンパク質に対する抗体も検出した^{35, 36)}。ただし、COVID-19 は臨床的に一般的な風邪コロナウイルス感染症とは異なるため³⁷⁾、COVID-19 の診断においては、風邪コロナウイルスと SARS-CoV-2 の N タンパク質における交差反応性は許容できる可能性がある。したがって、本研究で開発した新規抗体測定法は、臨床応用するのに十分な試薬性能を有すると考えられる。

最近、IgG 抗体検査が未承認の診断キットとして入手できるようになったが、その多くは臨床診断ツールとしての性能が低い。HISCL での抗体測定法は、SARS-CoV-2 に対する IgG および IgM を定量する頑健な方法となり得る可能性がある。この新規抗体測定法の性能を検討するため、本測定法の結果と市販の ELISA で得られた結果とを比較した。本測定法の検出能が市販の ELISA と比較して高いのは、市販の ELISA は吸光度、OD 比および検出システムに性能が依存するが、HISCL ではこれらと異なる広いダイナミックレンジを達成可能な原理を検出システムとして採用しているためと考えられる。今回の結果から、広範囲の抗体価を測定するには、HISCL の方が優れていることが示された。

前田らは、中和抗体の濃度は患者によって異なり、中和活性と総抗体価は必ずしも相関しないことを確認している (原稿準備中)。SARS-CoV-2 の RBD は、このような中和抗体の重要な標的であろうと予測されているが^{38~41)}、関連性を評価するには、感染初期、治療開始時、回復期および治療後の各時点での抗体価を正確に測定する必要がある。今回、回復期の血中 IgG において、中等症患者と重症/重篤患者の間

で差異を検出できることが示され (図 4)、病状を正確に評価するためには、定量性の高い SARS-CoV-2 抗体測定法が重要であることが示唆された。さらに、本研究では多くの患者において抗 SARS-CoV-2 IgM が感染初期に上昇し、最も早く検出された患者では発症後 3 日目に IgM が検出された (データ未掲載)。実際、重篤患者においては、入院時の S-IgM が有意に高値であった。さらに、IgM から IgG へのクラススイッチに重要であると考えられているインターロイキン (IL)-4 濃度も測定したところ、入院後に重篤化した患者では、入院時の血中 IL-4 濃度が有意に高かった (**Supplementary Figure 3**)。COVID-19 重篤化患者における IL-4 の増加機序は不明であるが、発症時の IL-4 濃度と抗 SARS-CoV-2-S-IgM 抗体価を組み合わせるにより、患者が将来、人工呼吸や体外式酸素補給を必要とする重篤な状態に至るかどうかを予測できる可能性が示唆された。さらに、高感度の抗 SARS-CoV-2 IgM 測定が、重症度の予測や診断に有用であることも示唆された。

本研究にはいくつかの制約がある。まず、本研究の目的は定量抗体測定法の確立であるため、COVID-19 患者や回復患者の検体が少数であり、保存検体を用いた後方視的研究である。そのため、将来的には本測定法の前向き検査としての医療的価値を評価する必要がある。

今後、ワクチン投与前後の抗体価の変化を定量的に解析することが重要になると予想される。COVID-19 のワクチン接種後の免疫系反応のモニタリングには、今回開発した定量抗体測定法が望ましい。日本政府は 2021 年 3 月にワクチン接種を開始する予定であり、我々は現在、ワクチン接種後の医療従事者、医療事務員および患者の抗体価をモニタリングすることで、実臨床における感染率と重症度を評価する観察研究を計画している。

総括すると、我々は、SARS-CoV-2 感染患者における IgG および IgM の抗体価を正確かつ頑健に測定する新しい抗 SARS-CoV-2 抗体測定試薬を開発した。これらの新規試薬は、臨床現場において、また現在の COVID-19 の感染状況を把握するうえで、非常に有用であると考えられる。

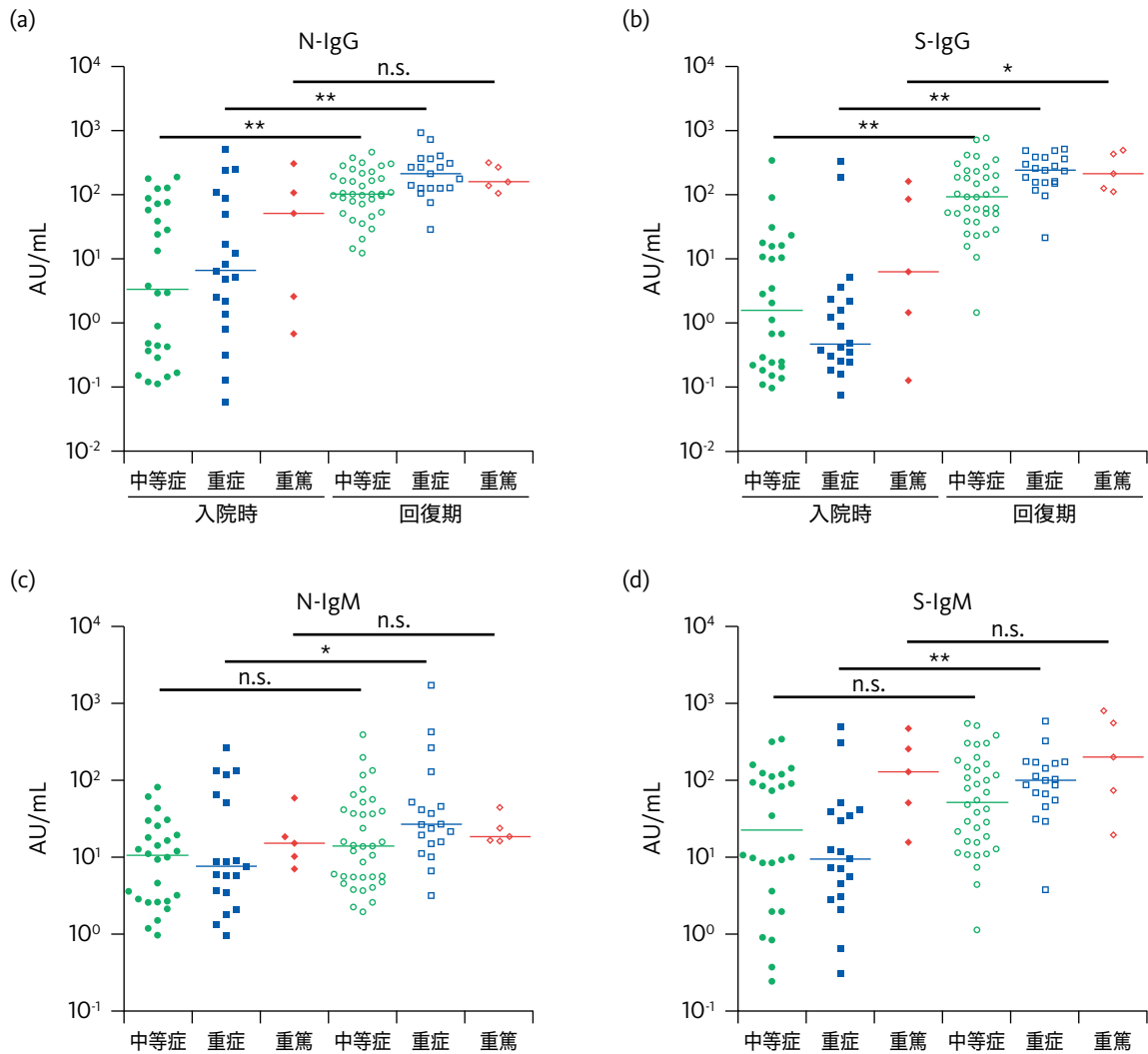


図4. 重症度と抗体価の関係

N-IgG (a), S-IgG (b), N-IgM (c), S-IgM (d) の入院時と回復期の抗体価の比較。

* $P < 0.05$, ** $P > 0.01$.

方法

ヒト臨床検体

本研究では、COVID-19 と臨床診断され、東京の国立研究開発法人 国立国際医療研究センター（以下、NCGM）に入院した患者 60 名を対象とした。患者は全例、本研究への登録時に鼻咽頭スワブ検体の定量的 RT-PCR 法を用いて SARS-CoV-2 陽性であることを確認した（表 2 および Supplementary Table 2）。陰性対照検体として、国立研究開発法人 国立がん研究センター（以下、NCC）バイオバンクから提供さ

れたがん患者（男性 337 名、女性 163 名、年齢：7～87 歳）の血清 500 検体を使用した。本研究は NCGM および NCC の倫理委員会（NCGM-G-003472-02, NCC2020-026）によって承認された。すべての患者から文書による同意を得ており、本研究はヘルシンキ宣言の原則を遵守した。

遺伝子組換え抗原の作製

遺伝子組換えヌクレオカプシドタンパク質は、以下のアクセッション番号の配列を元に作製した。

SARS-CoV-2 : YP_009724397, SARS-CoV : YP_009825061, MERS-CoV : YP_009047211, HCoV-HKU1 : YP_173242, HCoV-OC43 : YP_009555245, HCoV-NL63 : YP_003771, HCoV-229E : NP_073556. スパイクタンパク質におけるS1領域の遺伝子組み換えタンパク質は、以下のアクセッション番号の配列を元に作製した。SARS-CoV-2 : YP_009724390, SARS-CoV : YP_009825051, MERS-CoV : YP_009047204, HCoV-HKU1 : YP_173238, HCoV-OC43 : NP_937950, HCoV-NL63 : YP_003767, HCoV-229E : NP_073551. 製造業者のプロトコルにしたがい、C末端にHisタグを導入した各配列をpcDNA3.4ベクター (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にクローニングし、Expi293細胞 (Thermo Fisher Scientific) ヘトランスフェクションした。トランスフェクション後6日目に培養上清を回収した。遺伝子組換え抗原は、HisTrap HPカラム (Cytiva, Marlborough, MA, USA) およびHiLoad 26/600 Superdex 200 pgカラム (Cytiva) を用いて精製した。精製したSARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質とS1タンパク質はそれぞれ、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (株式会社 同仁化学研究所, 熊本, 日本) およびN-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて磁性粒子と結合させた。

測定法の説明

HISCL抗SARS-CoV-2抗体試薬は、ヒトの血清または血漿中のIgGおよびIgMの抗体価を定量するために開発された。HISCLは化学発光サンドイッチ法を原理としており、測定は全自動で実施された。本システムでは、まず血清または血漿試料を磁性粒子に結合したSARS-CoV-2特異的組換え抗原と反応させる。洗浄後、抗原-抗体複合体をアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体または抗ヒトIgM抗体と反応させ、サンドイッチ免疫複合体を形成させた。2回目の洗浄後、発光基質を加えて化学発光を測定した。基質の添加後17分以内に化学発光強度を測定した。反応槽の温度はすべての工程において42°Cを保った。

分析性能

キャリブレーションおよび標準品の調製

キャリブレーションおよび標準品は、Cantor Bioconnect (Tronto, Canada) およびTRINA BIOREACTIVES (Naenikon, Switzerland) から購入した市販のSARS-CoV-2陽性検体を使用して調製した。キャリブレーションは、SARS-CoV-2陽性検体をリン酸緩衝液で希釈して調製した。各キャリブレーションは3回測定し、キャリブレーションの値は、カットオフ値に基づいて設定した。抗体の測定値は、ロジスティック回帰分析から得られた検量線を用いて算出した。

干渉物質

干渉物質となる可能性のある遊離型ビリルビン (最大200 mg/L)、抱合型ビリルビン (最大200 mg/L)、乳び (最大1600 FTU)、ヘモグロビン (最大500 mg/L) およびリウマチ因子 (最大4,000 IU/L) をSARS-CoV-2陽性患者の血漿に添加した。これらの干渉物質は、干渉チェック・Aプラスおよび干渉チェック・RF (シスメックス) より入手した。

交差反応性

各種コロナウイルス株 (SARS-CoV-2, SARS1, MERS, OC43, HKU1, 229E, NL63) の遺伝子組換えタンパク質を添加した試料を測定し、本試薬の特異性を評価した。市販のSARS-CoV-2抗体陽性検体および陰性検体に、測定試料中の抗原終濃度が20 mg/mLとなるように各抗原を添加した。抗原添加による阻害率から交差反応性を評価した。

臨床性能

感度、特異度および曲線下面積 (以下、AUC) の決定

AUC、感度および特異度を決定するために、各アッセイで陰性血清500検体および陽性血清60検体を測定した。AUCはROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線解析により求めた。感度および特異度はYouden Indexに基づいて設定した閾値を用いて算出した。

統計解析

各抗体マーカーの診断性能はROC解析で、ノンパラメトリックな一対比較はMann-Whitney *U*検定で、StatFlex ver.7.0ソフトウェア(株式会社アーテック)を用いて評価した。ノンパラメトリック多重比較のSteel-Dwass検定はR ver. 3.6.3(The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を用いて実施した。 $P < 0.05$ であれば、有意差があるとみなした。

データの利用

本研究で生成および／または解析したデータは、合理的な請求があれば責任著者から入手できる。

参考文献

- 1) Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 ; **579** : 270–273.
- 2) Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 ; **382** : 727–733.
- 3) World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak situation. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (Accessed June 2020).
- 4) Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020 ; **382** : 1199–1207.
- 5) Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*. 2020 ; **66** (4) : 549–555.
- 6) Wang X, Yao H, Xu X, et al. Limits of detection of 6 approved RT-PCR kits for the novel SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Clin Chem*. 2020 ; **66** (7) : 977–979.
- 7) Ogata AF, Maley AM, Wu C, et al. Ultra-sensitive serial profiling of SARS-CoV-2 antigens and antibodies in plasma to understand disease progression in COVID-19 patients with severe disease. *Clin Chem*. 2020; doi.org/10.1093/clinchem/hvaa213.
- 8) Tang F, Quan Y, Xin ZT, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: A six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011 ; **186** (12) : 7264–7268.
- 9) Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 ; **11** (4) : 665–668.
- 10) Yu F, Le MQ, Inoue S, et al. Recombinant truncated nucleocapsid protein as antigen in a novel immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 ; **14** (2) : 146–149.
- 11) He Q, Chong KH, Chng HH, et al. Development of a Western blot assay for detection of antibodies against coronavirus causing severe acute respiratory syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 ; **11** (2) : 417–422.
- 12) Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, et al. Detection of specific antibodies to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2004 ; **42** (5) : 2306–2309.
- 13) To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020 ; **20** : 565–574.
- 14) Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 ; **71** (15) : 778–785.
- 15) Nicol T, Lefevre C, Serri O, et al. Assessment of

- SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol.* 2020 ; **129** : 104511.
- 16) Algaissi A, Alfaleh MA, Hala S, et al. SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2020 ; **10** : 16561.
- 17) Tang MS, Hock KG, Logsdon NM, et al. Clinical performance of two SARS-CoV-2 serologic assays. *Clin Chem.* 2020 ; **66** (8) : 1055–1062.
- 18) Tang MS, Case JB, Franks CE, et al. Association between SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and commercial serological assays. *Clin Chem.* 2020 ; doi.org/10.1093/clinchem/hvaa211.
- 19) Shrock E, Fujimura E, Kula T, et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science.* 2020 ; **370** (eabd4250).
- 20) Espejo AP, Akgun Y, Mana AFA, et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol.* 2020 ; **154** (3) : 293–304.
- 21) Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* 2020 ; **26** : 845–848.
- 22) Sun B, Feng Y, Mo X, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020 ; **9** (1) : 940–948.
- 23) Liu W, Liu L, Kou G, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020 ; **58** : e00461-20.
- 24) Bundschuh C, Egger M, Wiesinger K, et al. Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. *Clin Chim Acta.* 2020 ; **509** : 79–82.
- 25) Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM–IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 2020; **92** (9) : 1518–1524. doi.org/10.1002/jmv.25727.
- 26) Lippi G, Salvagno GL, Pegoraro M, et al. Preliminary evaluation of Roche Cobas Elecsys Anti-SARS-CoV-2 chemiluminescence immunoassay. *Clin Chem Lab Med.* 2020 ; **58** (11) : e251–e253.
- 27) Bryan A, Pepper G, Wener MH, et al. Performance characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *Clin Microbiol.* 2020 ; **58** (8) : e00941-e1020.
- 28) Jekarl DW, Lee S, Park HI, et al. Analytical and clinical evaluation of chemiluminescent carcinoembryonic antigen (CEA) by HISCL-5000 immunoanalyzer. *Ann Clin Lab Sci.* 2020 ; **50** (3) : 417–422.
- 29) Feng S, Wei B, Liu Q, et al. Evaluation of the novel HISCL chemiluminescence enzyme immunoassay for laboratory screening of hepatitis C virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2016 ; **23** : 652–654.
- 30) Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020 ; **26** : 1033–1036.
- 31) Quinlan BD, Mou H, Zhang L, et al. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody-dependent enhancement. *bioRxiv.* 2020 ; doi.org/10.1101/2020.04.10.036418v1.
- 32) Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell.* 2020; **181** (4) : 914-921.e10.
- 33) Hofmann H, Pöhlmann S. Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol.* 2004 ; **12** (10) : 466–472.
- 34) Ladner JT, Henson SN, Boyle AS, et al. Epitope-resolved profiling of the SARS-CoV-2 antibody response identifies cross-reactivity with an endemic

- human CoV. bioRxiv. 2020 ; doi.org/10.1101/2020.07.27.222943v1.
- 35) Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, et al. A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020 ; **27** (4) : 671-680.e2.
- 36) Klompus S, Leviatan S, Vogl T, et al. Cross-reactive antibody responses against SARS-CoV-2 and seasonal common cold coronaviruses. medRxiv. 2020 ; doi.org/10.1101/2020.09.01.20182220v2.
- 37) Murchu EO, Byrne P, Walsh KA, et al. Immune response following infection with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A rapid review. *Rev Med Virol*. 2020 ; doi.org/10.1002/rmv.2162.
- 38) Peterhoff D, Glück V, Vogel M, et al. A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. *Infection*. 2020 ; doi.org/10.1007/s15010-020-01503-7.
- 39) Deshpande GR, Secchi M, Pirillo MF, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Indian J Med Res*. 2020 ; **152** : 82-87.
- 40) Tan CW, Chia WN, Qin X, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol*. 2020 ; **38** : 1073-1078.
- 41) He Y, Lu H, Siddiqui P, et al. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol*. 2005 ; **174** (8) : 4908-4915.

謝辞

臨床検体に関する情報をご提供いただいた木下 典子博士，本活動をご支援くださった一口 毅氏と成川 隆也氏に感謝する。

著者貢献

濱田 哲暢氏，前田 賢次氏，吉田 智一氏は本プロジェクトを着想した。野田 健太氏，濱田 哲暢氏，前田 賢次氏は研究コンセプトを立案し原稿を執筆した。野田 健太氏，山下 和人氏，新 勇介氏，渡部 俊介氏，井出 信幸氏は，N-IgG，S-IgG，N-IgM および S-IgM の測定試薬を確立した。松田 幸樹氏，柳下 薫寛氏，前田 賢次氏，秋山 裕太郎氏，寺田 純子氏，松下 弘道氏，岩田 敏氏，大曲 貴夫氏，満屋 裕明氏，濱田 哲暢氏はデータを収集し解釈した。著者全員が最終原稿を読み承認した。

資金調達

本研究は，濱田 哲暢氏，満屋 裕明氏に交付された国立高度専門医療研究センター医療研究連携推進本部の研究費（2020-A-01），前田 賢次氏に交付された国立研究開発法人 日本医療研究開発機構からの助成金（JP20fk0108160）を受けて実施した。また，本研究はシスメックス株式会社からも資金提供を受けた。国立がん研究センターバイオバンクは，国立がん研究センター研究開発費による助成を受けている。

利益相反

野田 健太氏，山下 和人氏，新 勇介氏，渡部 俊介氏，井出 信幸氏，吉田 智一氏は，シスメックス株式会社の社員である。濱田 哲暢氏，満屋 裕明氏はシスメックス株式会社から研究助成金を受けている。その他の著者については開示すべき利益相反はない。

問い合わせ・資料請求先：シスメックス株式会社
 学術本部 学術情報部