

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)の 診断法の研究開発

国立感染症研究所 感染病理部

鈴木忠樹

AMED研究班「新型コロナウイルス(2019-nCoV)
感染症の診断法開発に資する研究」 班長

ウイルス感染症の病原体検査の原理

患者に病原体が感染している（していた）証拠を見つける

1. ウイルスを検出

◆ 特異度高い。活動性の感染を検出。検出期間が限定的。

2. ウイルスに対する免疫反応を検出

◆ 特異度低い。長期間検出可能。過去の感染履歴が分かる。

ウイルスを検出（遺伝子・抗原検査）

➤ **ウイルス存在部位に関する情報が必要**

1. ウイルスゲノムRNA（遺伝子検査）

RT-PCR, RT-LAMP法など

➤ **プライマー/プローブが必要**

➤ **ゲノム情報が必要**

2. ウイルスタンパク質（抗原検査）

免疫ノット、ELISA法など

➤ **抗ウイルス抗体が必要**

免疫反応を検出（抗体検査）

1. IgG抗体・IgM抗体・IgA抗体

免疫ノット、IFA, ELISA法など

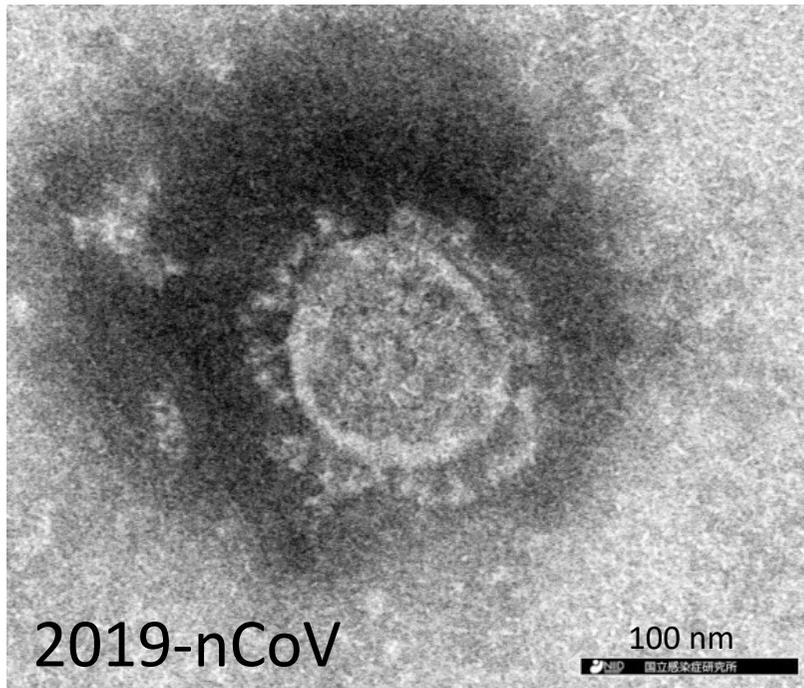
➤ **ウイルス抗原が必要**

2. 中和活性

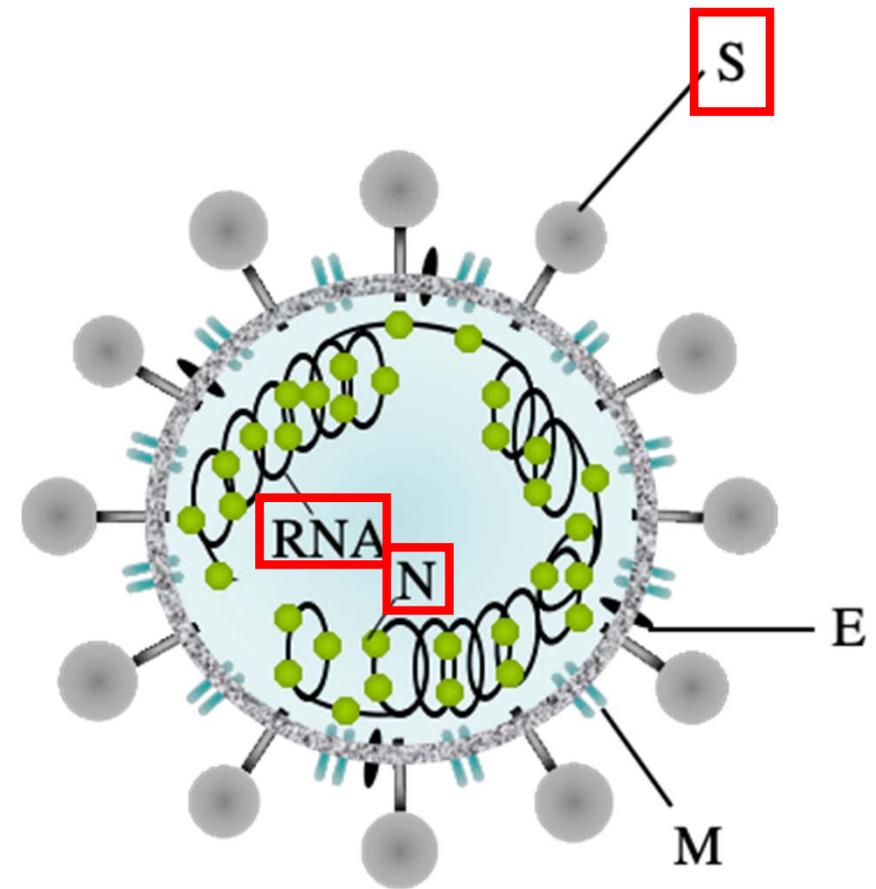
PRNT, MicroNT法など

➤ **感染性ウイルスが必要**

SARS-CoV-2のウイルス粒子構造



Order *Nidovirales*
Family *Coronaviridae*
Subfamily *Orthocoronavirinae*
Genus *Betacoronavirus*



(図1) 2019-nCoVの粒子構造

SARS-CoV-2 遺伝子検査開発における感染研の役割

感染研・ウイルス3部／インフルエンザウイルス研究センター

1. 未知の病原体に対するPCR検査法の開発と行政検査の確立

- 1月9日 中国疾病対策センター（CCDC）へ本感染症に関する情報提供を依頼した（病原体の特徴、流行の状況、患者の症状など）。
- 1月10日 本感染症の原因と考えられる新型コロナウイルス(SARS-nCoV-2)の遺伝子配列が公表されたため、直ちにウイルス遺伝子検査系の開発に着手した。
- 1月12日 世界保健機構（WHO）が主催する電話会議に参加し、検査法に関する情報を収集した。
- 1月14日 プロトタイプPCR検査法で国内症例の検査を開始した。
- 1月20日 新型コロナウイルスを高感度に検出するためのコンベンショナルPCR検査法の開発を完了した。
- 1月22日 全国約80箇所の地方衛生研究所へ検査用プライマーをプロトコールとともに発送した。
- 1月23日 厚労省から自治体に検査協力を依頼する事務連絡が発出され、中国の春節開始直前には新型コロナウイルスの行政検査が可能になった。
- 1月24日 **新型コロナウイルス検査用のリアルタイムPCR検査法の開発を完了した。**
- 1月29日 全国の地方公共団体の衛生研究所、検疫所にリアルタイムPCRに必要な試薬を発送した。これにより、本感染症に対する公衆衛生対策のための検査体制が整備された。
- 1月30日 **ウイルスの分離に成功した。**
- 1月31日 分離に成功したウイルスを[検査法開発のために広く分与](#)すること、感染研が開発した培養細胞株がSARS-CoV-2分離に大きな効果を示すことを公表した。
- 2月5日 開発した検査法の内容を地方衛生研究所以外にも広く情報提供するために、「[新型コロナウイルス病原体検出マニュアル 2019-nCoV](#)」を本所のウェブサイトに公表した。
- 2月13日 WHOからも情報提供がなされていたロシュ社製のプライマー・プローブセットを使用した方法と本所で開発した方法との相互検証を行い、ロシュ社製プライマー・プローブセットの推奨利用方法と、その方法を用いた場合には両検査法の検出感度が同等であることを公表（[病原体検出マニュアル 2019-nCoV](#)に追加記載）した。また、民間の検査機関での検査実施に向け協力を開始した。

2. 患者の診断目的で使用されるPCR検査への支援

PCR検査体制構築を準備する保健所、大学病院等の医療機関、民間の衛生検査所に対して試薬（プライマー、プローブ、陽性コントロール）の配布

3. 新型コロナウイルスの核酸を検出する検査法の開発

臨床検体パネルの配布

国内で使用可能なSARS-CoV-2 遺伝子検査キット

リアルタイムRT-PCR法によるウイルスRNAの検出

- Roche社 LightMixR Modular SARS-CoV(COVID19) E-gene
- BGI社 新型コロナウイルス検出RT-qPCRキット
- 医学生物学研究所 FLUOROSEARCH Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Detection Kit
- ライフテクノロジーズジャパン TaqMan SARS-CoV-2 Assay Kit v2
- 杏林製薬 SARS-CoV-2 GeneSoC ER杏林
- 島津製作所 2019新型コロナウイルス検出試薬キット
- 日本BD BD MAX ExK TNA-3 セット及び BD MAX PCR Cartridges
- タカラバイオ SARS-CoV-2 Direct Detection RT- qPCR Kit
- 富士フイルム和光純薬 SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit

その他の核酸増幅法によるウイルスRNAの検出

- 栄研化学 Loopamp 2019-nCoV検出試薬キット
- ダナフォーム SmartAmp2019 新型コロナウイルス検出試薬
- キヤンメディカルシステムズ 新型コロナウイルスRNA検出試薬 Genelyzer Kit

自動遺伝子解析装置

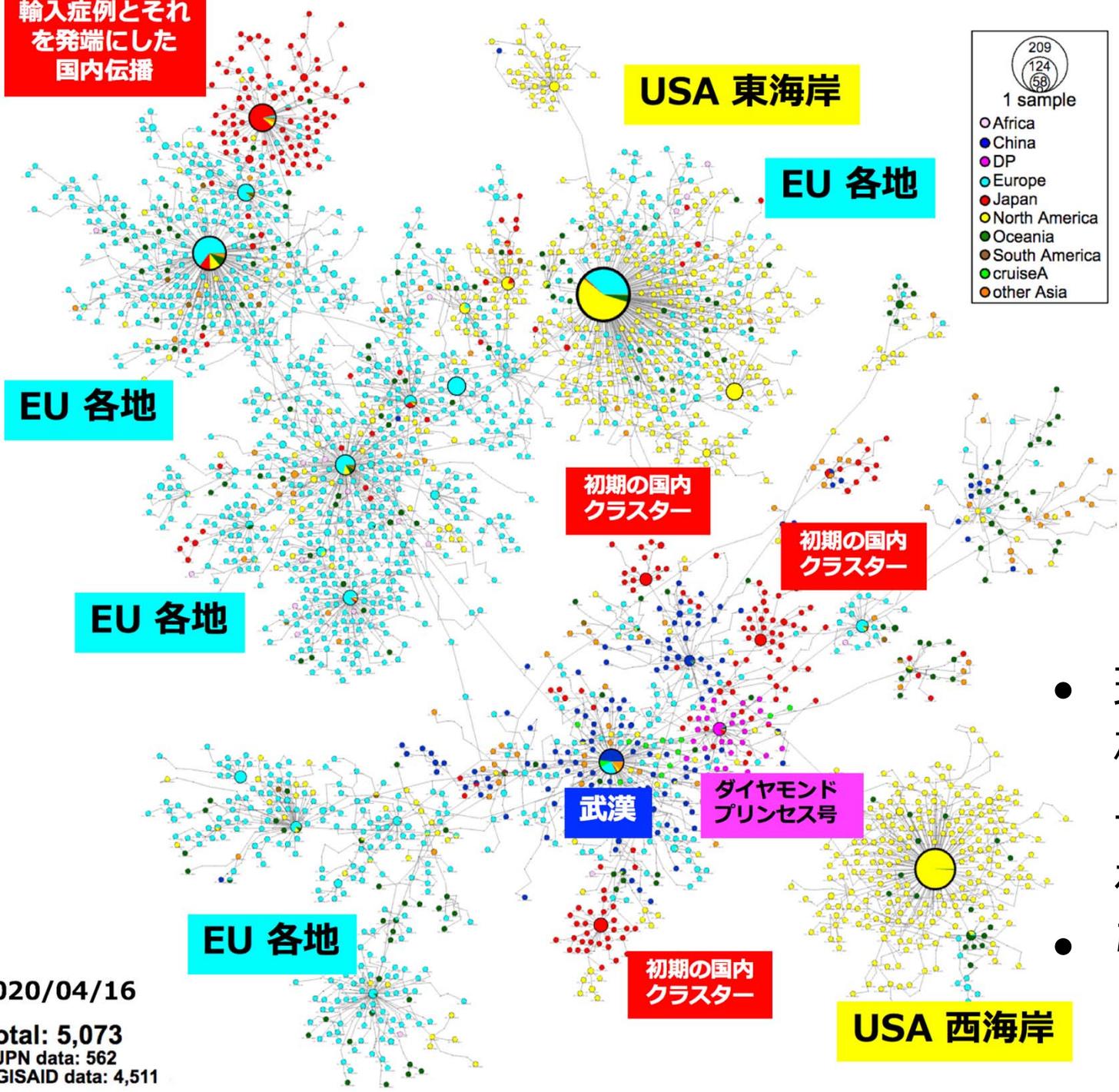
- 富士フイルム和光純薬 ミュータスワコーCOVID-19
- ベックマン・コールター Xpert Xpress SARSCoV-2「セフィエド」
- ロシュ コバス® SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 遺伝子検査の今後の課題

- 核酸抽出ステップを省略した検査キットの充実
- 核酸抽出から解析まで自動化された自動遺伝子解析装置用の検査キットの充実
- 唾液などの採取が容易な検体を用いた検査用キット開発
- ウイルスゲノム解析による変異モニタリング（検査キットが機能しなくなる変異を同定）
- 各検査機関における検査精度管理

SARS-CoV-2 全ゲノム情報を用いた SNVs (1塩基変異) ネットワーク解析

輸入症例とそれを発端にした国内伝播



感染研・病原体ゲノム解析
研究センターによる解析

EU 各地

初期の国内
クラスター

EU 各地

初期の国内
クラスター

EU 各地

武漢

ダイヤモンド
プリンセス号

EU 各地

初期の国内
クラスター

USA 西海岸

- 現在までのところ、感染研の公開している遺伝子検査法の検出に影響を与えそうな変異はない。
- 引き続き、監視が必要。

2020/04/16
Total: 5,073
JPN data: 562
GISAID data: 4,511

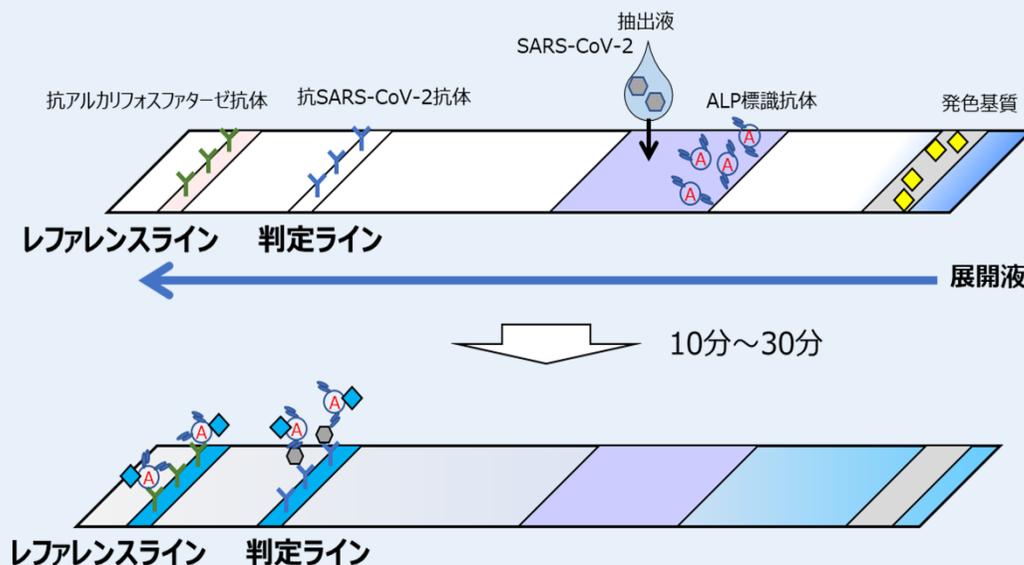
SARS-CoV-2 抗原検査

原理：ウイルスに特異的な抗体で、ウイルスタンパク質（ウイルス抗原）を検出

方法：イムノクロマト法、ELISA法、CLEIA法など

迅速抗原検出系の開発

AMED研究班の成果



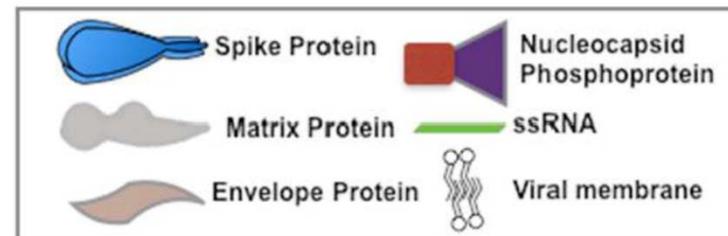
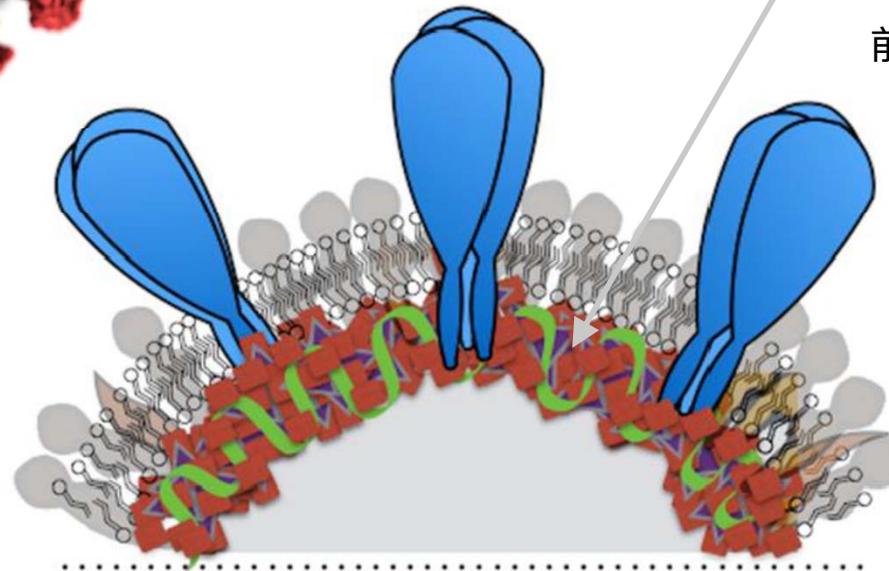
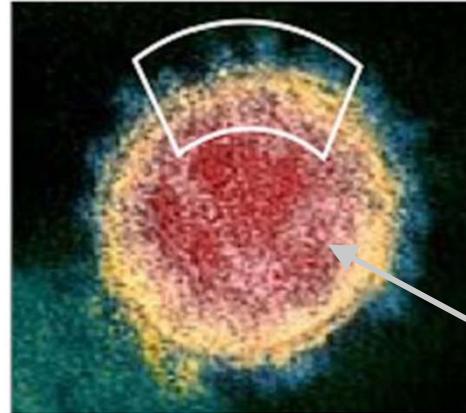
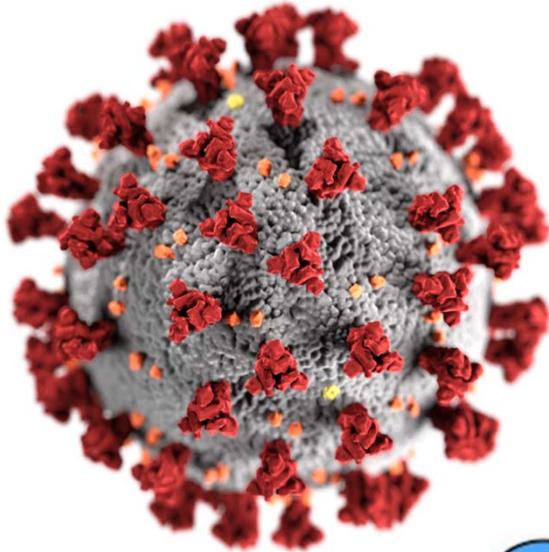
富士レビオ株式会社

- **「エスプライン」**シリーズは、酵素免疫測定法を原理としたイムノクロマトグラフィ法による迅速診断キットで、開業医を含む幅広い医療現場で使用されている（インフルエンザ等）
- **医療現場で直ちに検査結果が分かる。検査ラボに検体送付の必要なし。どこでも実施可能。**
- **感度が悪い。一般的にPCR法に比べて5-7割程度と低い。**
 - **排出ウイルス量が高い患者**は見つけれられる。**陽性 = 排出ウイルス量が多い。**
 - 感染管理上、最も注意が必要な患者を迅速に同定可能。
 - 院内感染の抑制に期待。

SARS-CoV-2の構造と標的抗原

<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23311>

Dinesh et al. (2020). Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein
bioRxiv <https://dx.doi.org/10.1101/2020.04.02.022194>



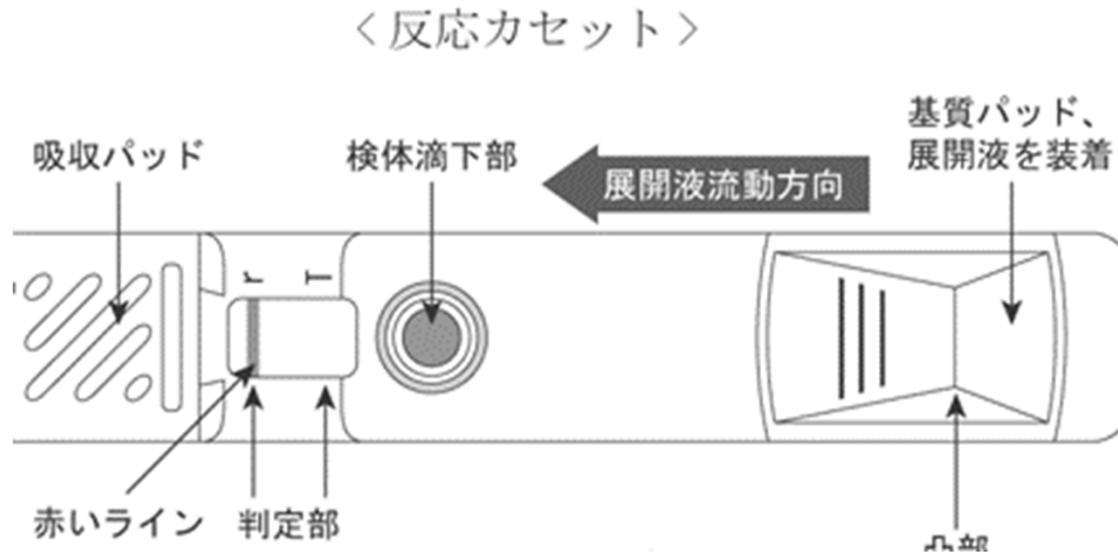
標的 = NP (Nucleocapsid protein) 抗原

前処理剤 (界面活性剤) による脱膜と、
核酸からの遊離

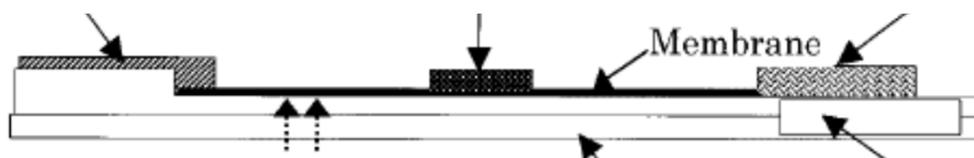


サンドイッチ免疫アッセイ
による検出

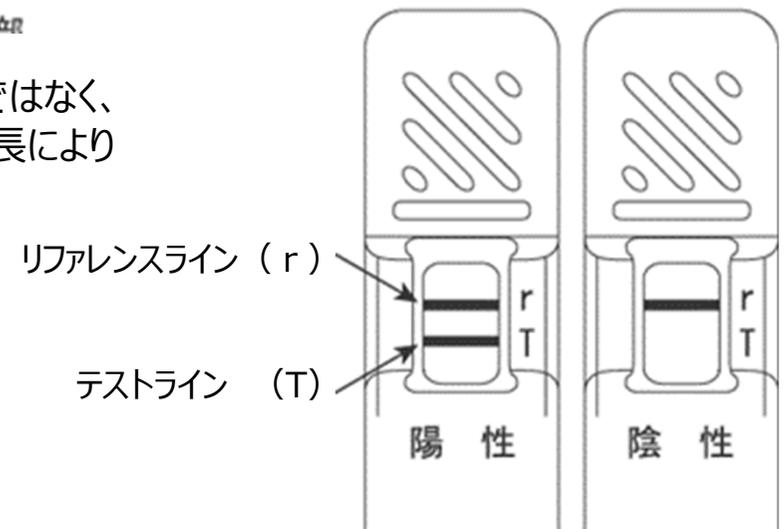
エスプラインの原理



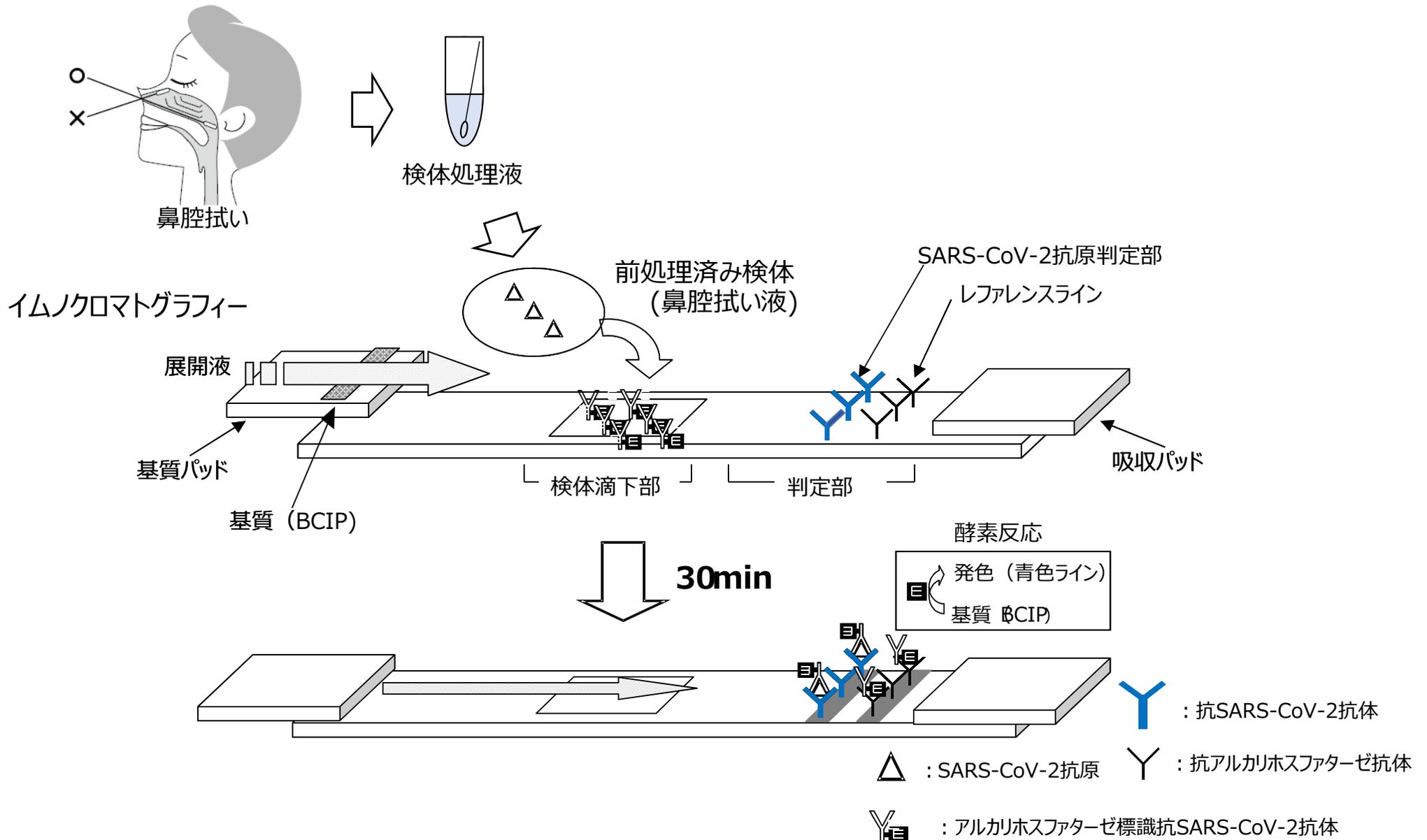
特徴：イムノクロマト法で一般的に用いられる金コロイド標識ではなく、**ALP標識体を用いたEIA**を原理とする。呈色反応時間の延長により感度上昇を図ることが出来る。



＜判定例＞



測定原理



培養ウイルスを用いた感度検証試験 (国立感染症研究所感染病理部部長 鈴木忠樹先生検証)

- SARS-CoV2培養上清 (SARS-CoV2 JPN/TY/WK-521 : 感染性ウイルスタイトー 2.37×10^7 pfu/mL、qRT-PCR推定 Ct換算値 = 18) を、専用検体処理液を用い、連続4倍希釈(例)。希釈後、5分間静置した検体20μLを被検試料とし、弊社プロトタイプにてSARS-CoV2 N蛋白質を検出した (同時二重検定)。
- リファレンスラインは反応開始後30分、テストラインは、反応開始後30分、60分の2点で確認した。
- 陽性コントロールのテストラインを基準とし、テストラインの発色度合いを目視判定した (鈴木部長、永田室長により判定)
- 検討は国立感染症研究所村山研究庁舎BSL3施設で行われた。

サンプル			30分				60分	
			Ref. Line		Test Line		Test Line	
名称	希釈倍数	ウイルス量 pfu/20μL 処理サンプル	1	2	1	2	1	2
陰性			+		-		-	
陽性			+		2+		2+	
#1	1	118,569	+	+	3+	3+	3+	3+
#2	4	29,642	+	+	3+	3+	3+	3+
#3	16	7,411	+	+	3+	3+	3+	3+
#4	64	1,853	+	+	2+	2+	3+	3+
#5	256	463	+	+	2+	2+	2+	2+
#6	1024	116	+	+	+	+	2+	2+
#7	4096	29	+	+	-	-	+	+

プロトタイプをさらに高感度化
(組換え抗原での感度は4倍以上)



体外診断用医薬品 (クラスIII) として
薬事承認申請 (4/27)

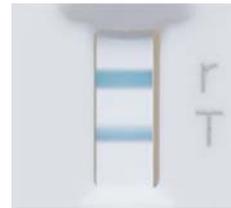
エスプラインSARS-CoV-2抗原検出キット

■ 申請中

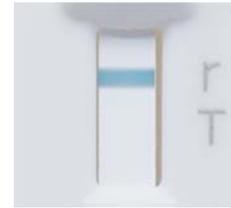


■ 判定例

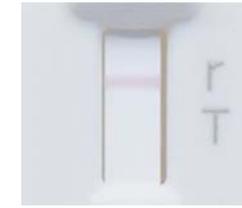
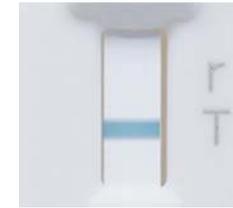
陽性



陰性



要再測定



- テストラインは10分～20分程度で検出
- 陰性判定のため、30分後に判定を行う



感度試験（組換え抗原を用いた希釈感度）

試料	濃度	レファレンスLine	テストLine	
		発色時間	発色時間	判定
自社製SARS-CoV-2 リコンビナント抗原	800 pg/mL	10'10	9'40	陽性
	400 pg/mL	9'35	9'40	陽性
	200 pg/mL	12'10	12'05	陽性
	100 pg/mL	13'15	14'55	陽性
	50 pg/mL	13'30	18'20	陽性
	25 pg/mL	10'50	22'00	陽性
	12.5 pg/mL	11'40	–	陰性
	6.25 pg/mL	11'25	–	陰性
	3.125 pg/mL	9'30	–	陰性
AMED班標準 SARS-CoV-2 リコンビナント抗原	800 pg/mL	11'20	10'30	陽性
	400 pg/mL	11'20	10'45	陽性
	200 pg/mL	10'40	11'55	陽性
	100 pg/mL	10'55	13'45	陽性
	50 pg/mL	14'05	17'20	陽性
	25 pg/mL	10'55	23'20	陽性
	12.5 pg/mL	11'10	–	陰性
	6.25 pg/mL	11'40	–	陰性
	3.125 pg/mL	11'35	–	陰性

交差反応性の検証

- ヒトインフルエンザウイルス・ヒトコロナウイルスのN抗原を用いて検証

	抗原種	結果
1	SARS-CoV-2	陽性
2	SARS-CoV	陽性
3	MERAS-CoV	陰性
4	ヒトコロナウイルス 229E	陰性
5	ヒトコロナウイルス DC43	陰性
6	ヒトコロナウイルス NL63	陰性
7	ヒトコロナウイルス HKU1	陰性
8	インフルエンザウイルスA型 H1N1	陰性
9	インフルエンザウイルスA型 H3N2	陰性
10	インフルエンザウイルスB型	陰性

- SARS-CoVの組換えNP抗原とは交差するが、MERS、HCoV-229E、OC43、NL63、HKU1の組換えNP抗原と反応を認めない
- インフルエンザウイルスとの反応を認めない

- ヒトコロナウイルス培養液を用いて検証
(感染研・鈴木先生検証)

	判定	
	Run 1	Run 2
HCoV-229E	—	—
HCoV-OC43 – ATCC	—	—
HCoV-OC43 – 1436	—	—
HCoV-NL63	—	—
HCoV-HKU1	—	—

- HCoV-229E、OC43 (2株)、NL63、HKU1と反応を認めない

- インフルエンザ抗原とは反応しない
 - 風邪（感冒）の原因であるコロナウイルスとは反応しない
 - MERSコロナウイルスとは反応性しない
 - SARS-CoVとは交差する
- ⇒ 風邪患者に対し擬陽性とならないと考えられる
(検体を用いた追加検討を計画)

PCRとの判定一致率

(1) 国内臨床検体を用いた相関性

n=72

		RT-PCR法**		
		陽性	陰性	total
本品	陽性	10	1*	11
	陰性	17	44	61
	total	27	45	72

陰性一致率： 98 % (44/45)

陽性一致率： 37 % (10/27)

全体一致率： 75 % (54/72)

陽性検体についての陽性一致率を、RT-PCR法テスト試料中の換算RNAコピー数に応じて比較すると、100 コピー/テスト以上の検体に対して一致率83% (5/6例)、30 コピー/テスト以上の検体に対して一致率50% (6/12例) でした。

注) 入院患者の検査検体が主な対象

*判定不一致の1例は判定基準では「再検査：陰性または陽性の判定がしづら」検体でしたが、検体量不足で再検査未実施のため、陽性と判定しました。

注)換算RNAコピー数は、検体（ウイルス保存液に懸濁された鼻咽頭拭い液）からのRNA抽出効率が基準物質と同じと仮定した時に得られたCt値(Cycle Threshold)から換算した推定値です。

(2) 行政検査検体を用いた試験

n=124

		RT-PCR法**		
		陽性	陰性	total
本品	陽性	16	0	16
	陰性	8	100	108
	total	24	100	124

陰性一致率： 100.0% (100/100)

陽性一致率： 66.7% (16/24)

全体一致率： 93.5% (116/124)

陽性検体についての陽性一致率を、RT-PCR法テスト試料中の換算RNAコピー数に応じて比較すると、1,600 コピー/テスト以上の検体に対して一致率100% (12/12例)、400 コピー/テスト以上の検体に対して一致率93% (14/15例)、100コピー/テスト以上の検体に対して一致率83% (15/18例) でした。

但し、本検体群はRT-PCR法で用いた試料液（予めスワブがウイルス輸送液に浸されている）を使用しております。

患者スクリーニングを主とした行政検体において、より高い感度を示したことから、初診患者のスクリーニングにより効果的と考えられた

まとめ

- 簡易迅速抗原検出テストは、感度、特異度、主要な風邪原因ウイルスとの交叉反応性、高濃度検体でのプロゾン、反応条件への抵抗性（妨害物質・温度・試料量）などの各種試験を行い、臨床研究で検体との反応性を確認し、臨床的有用性を確認

体外診断用医薬品（クラスIII）として薬事承認申請（4/27）

- **5月中旬承認の見込み**
 - 20万テスト/週での生産体制構築
 - 承認翌日には出荷予定
- **臨床試験（有用性の確認・検体種の拡大）を計画し研究機関と協議中**

SARS-CoV-2 抗原検査の今後の課題

- 高感度な検査キットの開発
→ 高性能な抗体の作製が必須。アカデミアや感染研でシーズとなる抗体の開発が進行中。
- 高感度な全自動測定系の開発。
- 現在、デンカ（株）など複数社が開発中。

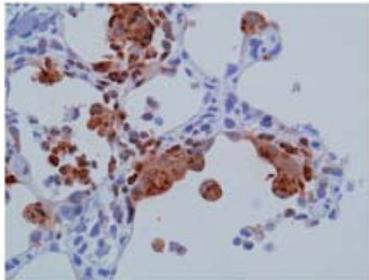
迅速診断イムノクロマトキットの開発に必要なモノクローナル抗体の作製

感染研・免疫部／感染病理部

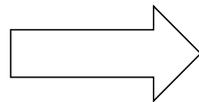
SARS-CoVモノクローナル抗体のSARS-CoV-2への利用

SARS-CoV-2に交差するモノクローナル抗体を特定
(感染病理部・免疫部)

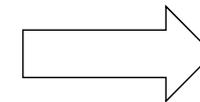
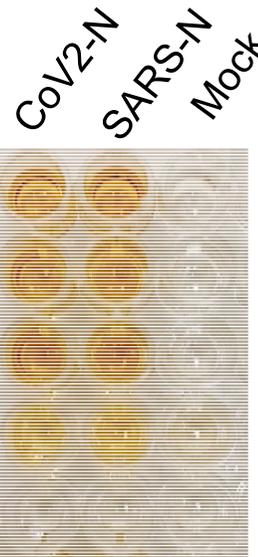
SARS-CoVに結合する
12種類のモノクローナル抗体



(Jpn J Infect Dis, 2005)



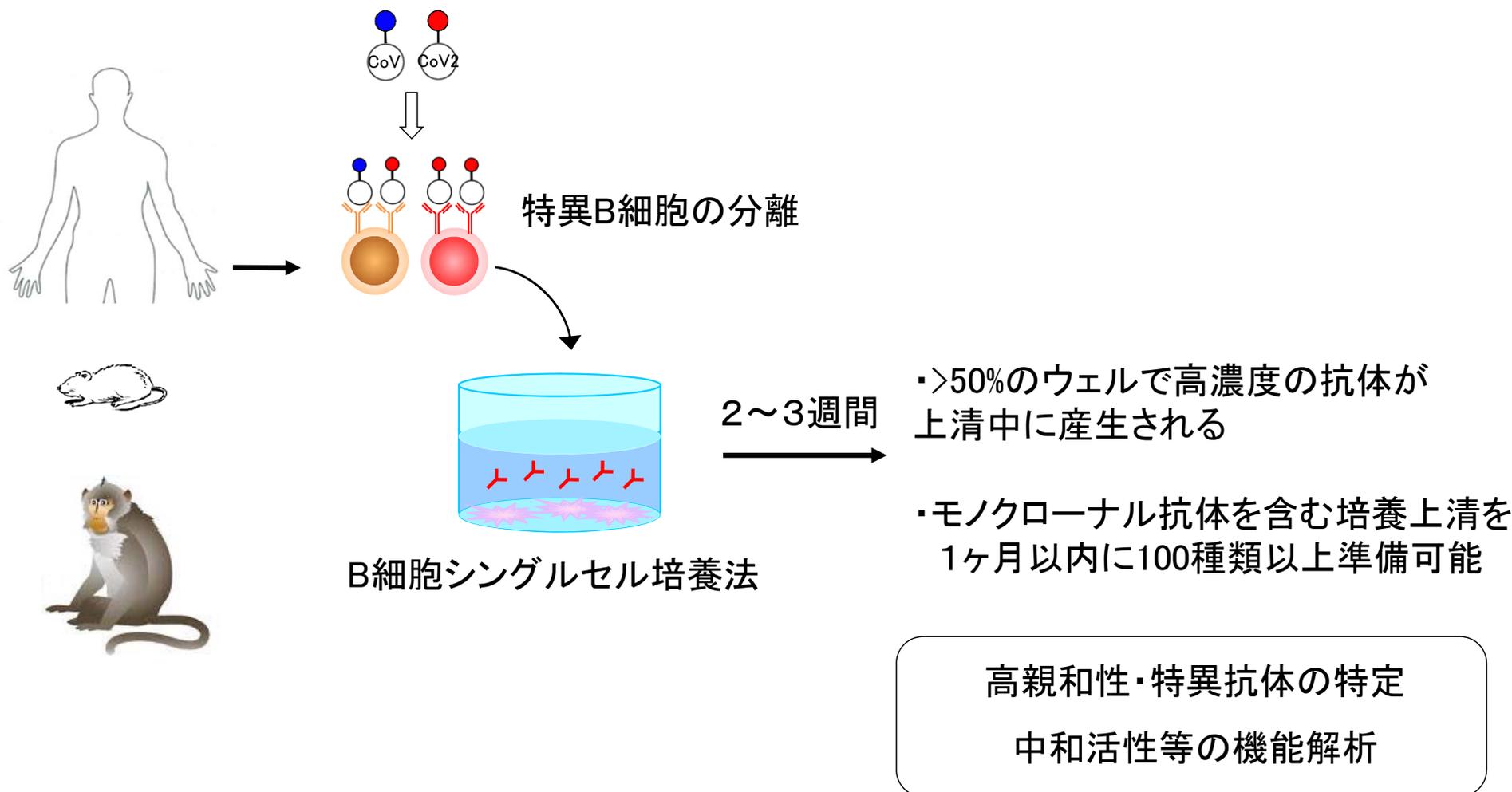
SKOT7
SKOT8
SKOT9
SOAT34
CTRL



- ・製造メーカー4社に分与済み
- ・大学にも分与

シングルセル培養法による特異モノクローナル抗体の作製

感染研・免疫部



抗SARS-CoV-2抗体検査

血清抗体検査の3つの目的

1. 病原体診断

- ◆ 感染早期に上昇するIgM抗体は診断的価値が大きい。
- ◆ 迅速な測定系が必要で高い感度が求められる。
- ◆ IgG抗体での診断はペア血清が必要。
- ◆ 病態との関連を評価するには定量的評価が重要。

2. 疫学調査

- ◆ 無症候者を含めた感染者数 (感染履歴) を調査
 - 受診行動を伴わない軽症者や無症候者を捉える感度の良い系が必要
- ◆ 感染感受性者数 (感染防御免疫の有無) を調査
 - 感染防御と相関性が高い抗体を定量的に測定する系が必要
 - 感染防御の作用機序に関与する因子の測定系が必要

3. ワクチン有効性評価

- ◆ 感染防御に有効な免疫の定量的評価
 - 感染防御の作用機序に関与する因子の定量的な測定系が必要

血清抗体検査の注意点

- 抗体陽性は、患者体内にウイルスが存在することを示すものではない。
- 診断に用いる場合は、抗体検査の臨床的位置付けを熟慮する必要がある。
- 抗体アリ≠感染防御免疫アリ（どんな抗体がどれだけあるのかが重要）
- 抗体検査は、ウイルスを検出するのではなく、ウイルスに対する免疫反応を検出することから、必ず非特異反応がある（特異度100%はあり得ない）
- ヒトの免疫反応は個人差が大きく、年齢、性別、人種、居住地域の新型コロナ以外の感染症の流行状況、ワクチン接種歴などに影響される可能性がある。
- 陽性率が低い疫学調査の場合は、非特異反応が大きな問題となる。
- 陽性率が低いことが予想される疫学調査を実施する場合は、調査対象集団における非特異反応の頻度を事前調査するか、複数の異なるアッセイ系を組み合わせることにより特異度を上げる工夫が必要
 - 上記のような取り組みのない疫学調査の結果の解釈には注意が必要
 - アッセイ系の精度を無視した調査研究は、誤った解釈を導き、感染症対策の混乱させる可能性がある

様々な血清抗体検査法

標的抗原：Nucleoprotein, Spike, ウイルス

測定系：イムノクロマト, ELISA, CLIA, ECLIA, 中和試験

- 既に多くのキットが研究用試薬として販売されているが性能評価が不十分なものが多い（欧米系大手企業製のキットはデータが多く信頼できる）。
- ELISAなどのウイルスタンパク質への結合抗体を評価する方法は、標的抗原の種類や製造方法により感度・特異度が変わるだけでなく、臨床的意義が変わる可能性がある。
- どの測定系が最も良いか世界的にも統一見解が得られていない
- ウイルス学における血清抗体検査のゴールドスタンダードは中和試験
- 中和試験は、スループットは低いですが、感染防御に寄与すると推測されている機能性抗体を測定ことができ、特異度が高い
- 中和試験のためには、活きたウイルスが必要でBSL3実験室内で実施する必要がある。
- 中和試験に代わるハイスループットな機能性抗体検査を開発する必要がある。

コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いた血清抗体検査法の開発 (ELISA・イムノクロマト)

横浜市立大学・梁明秀先生

項目

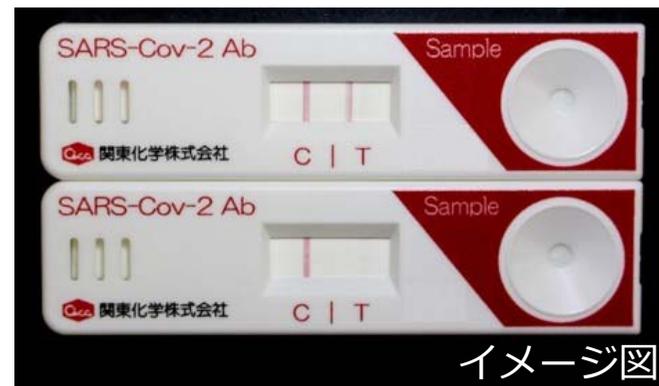
ELISA法

概要	新型コロナウイルスに対する抗体価 (IgG) の 定量分析
検体	血清
必要量	100 μ L
所要時間	血清添加後、約2時間半
特徴	多検体を定量的に測定可能



イムノクロマト法

概要	新型コロナウイルスに対する抗体価 (IgG) の 定性分析
検体	血清
必要量	100 μ L
所要時間	血清添加後、約15~30分
特徴	簡単な操作で迅速な分析が可能



現在、評価試験を実施中

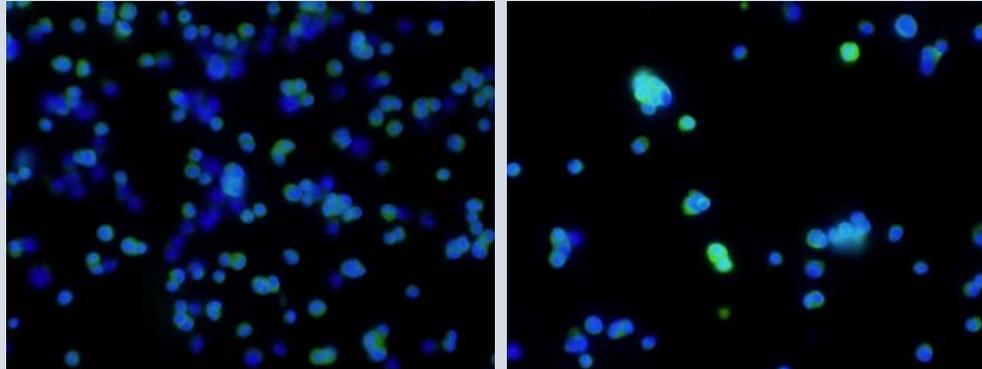
感染性ウイルスとシュードタイプウイルスを用いた中和抗体測定法の確立

感染研・感染病理部／ウイルス1部

AMED研究班の成果

間接蛍光抗体法

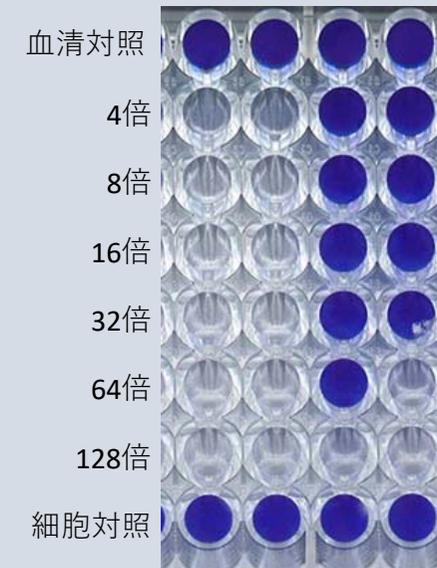
発症期： 検出限界以下 回復期： 320倍



IF抗原/中和攻撃ウイルス：JPN/TY/WK-521株
使用細胞：VeroE6/TMPRSS2細胞

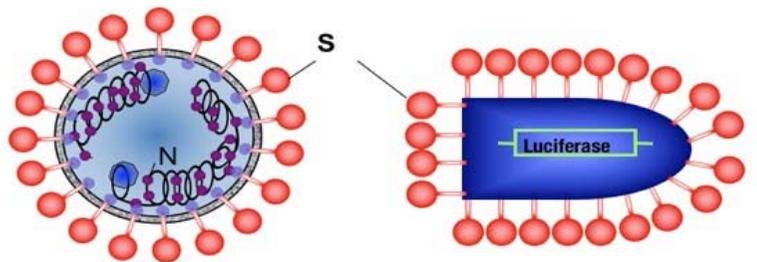
中和試験

発症期 回復期



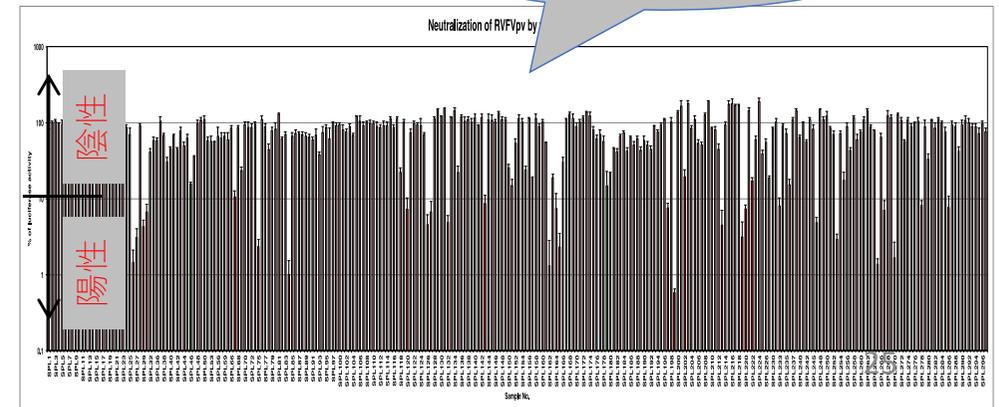
VSVシュードタイプによる中和抗体測定法の開発

迅速ハイスルー
ット中和試験法



2019-nCoV
(BSL3)

2019-nCoV S-bearing VSV
pseudotype



新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の 診断法の研究開発のまとめ

(1) SARS-CoV-2遺伝子検査

- リアルタイムPCR法、LAMP法などの検査キットの開発は充実
- 核酸抽出を省略した検査キットや自動遺伝子解析装置の開発が必要
- 鼻咽頭スワブ検体以外の唾液などの検体を用いた検査キットの開発が必要

(2) SARS-CoV-2抗原検査

- イムノクロマトが実用化間近
- 高感度系の開発が必要
- さらに多くのメーカーによる開発が必要

(3) 抗SARS-CoV-2抗体検査

- 既に多くのキットが市販されているが、ほとんどのキットの性能評価は不十分。
- 感染履歴を評価する検査と感染防御免疫を評価する検査は異なる。検査の目的に合わせて検査系を選択する必要がある。
- 感染防御免疫に寄与する免疫は未だ明らかでないが、感染防御に重要と考えられている中和抗体などの機能性抗体検査を拡充していく必要がある。
- ELISA抗体価・中和抗体価などの定量系については、調査毎に測定値を比較することが可能となるように国内・国際標準化を進める必要あり。