

新型コロナウイルス抗体検査キットの性能評価と標準品策定に関する海外動向

西村和子, 柴田寛子, 斎藤嘉朗, 石井明子[#]

International trends in evaluations of antibody tests and establishment of the reference standard for anti-SARS-CoV-2 antibody

Kazuko Nishimura, Hiroko Shibata, Yoshiro Saito, Akiko Ishii-Watabe[#]

Antibody tests for SARS-CoV-2 can be used to identify people who were previously infected by SARS-CoV-2, and useful to elucidate the relationship between antibody titer and infection protective function if the test is quantitative. Antibody tests have some unique characteristics; e.g., the limit of detection and the characteristics of antibodies to be detected differ depending on the type of antigen (Nucleocapsid protein or Spike protein) and its domain used, host cell, immobilization method and detection method of the bound antibody etc. In addition, antibody having cross reactivity with coronavirus strains other than SARS-CoV-2 may exist in human samples. These characteristics affect the analytical performance of antibody tests, and thus some tests that will not work as expected may be distributed. Standardized performance criteria and the reference standard for the evaluation of the antibody test are required. In this paper, we investigated and summarized the activities about evaluations of antibody tests and establishments of the reference standards for anti-SARS-CoV-2 antibody in the US, UK and WHO in order to cope with next spread of emerging and re-emerging infectious diseases.

Keywords: Anti-SARS-CoV-2 antibody, antibody test, reference standard

はじめに

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染拡大に伴い、感染の有無等を調べる検査薬の整備が求められてきた。新型コロナウイルス感染症の検査には、被験者の鼻咽頭拭い液や唾液中のウイルスRNAを検出するPCR検査等の核酸増幅検査、被験者の鼻咽頭拭い液や唾液中のウイルスタンパク質を検出する抗原検査がある。体外診断用医薬品として用いられているこれらの検査薬の他、薬事承認の対象ではないが、被験者の血液中のウイルスに対する抗体を検出する抗体検査キットも開発されている。抗体検査は、ウイルスに対して免疫が応答して誘導される抗体を検出するもので、核酸増幅検査や抗原検査

のように感染症罹患の診断に使うことはできないが、感染履歴の把握や抗体保有と感染防御能の関連の解明、ワクチンの有効性の評価等の研究的な利用での役割が期待されている。

新型コロナウイルスを構成する主なタンパク質として、ウイルス内部でゲノムRNAと結合するNucleocapsidタンパク質 (N protein)、それらを包むエンベロープには、Eタンパク質、Mタンパク質、ヒト細胞表面の受容体と結合するSpikeタンパク質 (S protein) がある。抗体検査では一般的に、S proteinやN proteinが抗原として使用され、これらの抗原に結合するIgM、IgG、IgAあるいはTotal Igを検出する。

抗原との結合性に基づいて抗体を検出する抗体検査には、イムノクロマト法、ELISA法の他、自動分析装置を利用した測定に用いられる電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) 等の様々な分析原理のものがある。イムノクロマト法は、毛細管現象を利用して、試料中に含まれる抗体を分離・検出する方法であり、多くの場合10~15分程度で目視により結果を判定でき、特別な装置を用いる

[#] To whom correspondence should be addressed:

Akiko Ishii-Watabe; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 3-25-6, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel: +81-44-270-6512; Fax: +81-44-270-6513; E-mail: watabe@nihs.go.jp

ことなく測定が可能である。ELISA法は、試料中に含まれる抗体を抗原で捕捉するとともに、検出試薬として酵素標識体を利用し、捕捉された抗体を検出・定量する方法であり、通常研究室にある装置のみで測定可能であることから、比較的汎用されている。その他に、種々の自動分析装置を利用する抗体検査キットに用いられている測定法としては、ECLIAの他化学発光免疫測定法 (CLIA)、蛍光酵素免疫測定法 (FEIA)、化学発光微粒子免疫測定法 (CMIA) 等がある。これらの他に、ウイルス感染を阻害できる中和活性を測定するキットも開発されているが、本研究では抗原との結合性に基づいて抗体を検出する抗体検査キットを主な対象として調査を行った。

これまで国内外で抗体検査キットが多数開発・販売されているが、抗体検査では、抗体の補足のために使用されている抗原 (N proteinあるいはS protein) の種類や使用された抗原タンパク質上の部位、発現細胞、固定化や標識方法等により、検出される抗体の特性や検出下限が異なるという特徴がある。加えて、抗SARS-CoV-2以外のコロナウイルスに対する抗体との交差反応性などの課題もあり、期待されるような性能が発揮できない検査キットもあることが報告されている。したがって、抗体検査の信頼性確保のためには、検査キットの評価に必要な標準品の整備や、標準化された性能基準が必要である。

これらの課題を踏まえ、本研究では、新型コロナウイルス感染症のパンデミックが生じた当初から2021年3月までの間に、海外で行われた抗体検査キットの性能評価および標準品の策定に関する取り組みについて調査し、整理した。

1. 海外公的機関における新型コロナウイルス抗体検査の性能評価試験

抗体検査の性能の評価指標のひとつとして、PCR検査等で感染が確定診断され、抗体を保有すると想定される患者の検体 (血液、血漿、血清) を「陽性」と判断できる割合を評価する「感度」と、新型コロナウイルス流行前検体など非感染が明確な検体を「陰性」と判定できる割合を評価する「特異度」がある。

米国食品医薬品局 (FDA) では、2020年5月に緊急時の対応として通常の審査を経ていない未承認の検査キットの中で、一定の水準を満たすと判断されたものに緊急使用許可 (EUA) を与えることとされた。満たすべき水準については、抗体検査キットに関するFDAガイダンスに付随するテンプレート¹⁾において表1-1のように示され、この水準はテンプレートの改定に伴って更新されてきている。しかしながら、感度・特異度の評

価に基づく臨床性能は、評価に用いる臨床検体中の抗体価 (タイター) によって変動する数値であるため、2020年7月以降、政府研究機関において、それぞれ陽性検体 (30検体) と陰性検体 (80検体) から成る数種の検体パネルを用いた感度及び特異度の評価が行われ (表2)²⁾、イムノクロマトキット、ELISAキットおよびCLIA法など自動分析装置を用いた試薬キットの評価結果を随時、発表している。

図1 (A) に示すように、2021年3月時点で72品目の抗体検査キットがEUAを取得していた。同時点で、これらEUA取得品目のうちの28キット、及び、EUAを取得できていない61キット、計89キットについて政府研究機関による評価がなされ、結果が発表されていた (図1 (B))。EUAを取得したイムノクロマトキット20キット中18キットが評価対象となり、ELISAキットは13キット中7キットが評価対象となっていた。これに対し、自動分析装置用キットはEUAを取得した34キットのうち3キットのみが評価対象となっていた。評価対象となったイムノクロマトキットの多くがEUAを取得できていない製品であり、一度EUAが付与された後、政府研究機関による評価で性能が不十分とされ、EUA取り消しとなったイムノクロマトキットも2例報告されている²⁾。

FDAがホームページ²⁾に掲載している評価結果データを用いて、検査キットの検出対象別に感度と特異度の関係を図2に示した。EUA取得キットは、ほとんどが感度は90%以上、特異度は95%以上と高い結果である一方、EUA非取得キットは、感度・特異度ともにEUA取得キットに劣るものが多く、特にIgMの検出については特異度も低いキットが多かった。全般的に各キットの添付文書に記載の感度・特異度より低いものが多く、表1-1に示した臨床性能の基準を満たさないキットも多かった。

またイングランド保健省 (Public Health England: PHE) は、2020年4月から7月の間に、代表的な市販抗体検査キット (ELISAキット: 1キット、自動分析装置用キット: 7キット) について陽性検体 (100検体)、陰性検体 (400検体)、交差反応性検体用検体 (100検体) を共通試料に用いた性能評価を行い発表した (表3)³⁾。この評価結果データを用いて、感度と特異度を図3に示した。評価された8キットの添付文書によれば、いずれも感度は90%以上、特異度は99%以上であったが、PHEの評価では特異度は100%近いが、英国の医薬品・医療製品規制庁 (MHRA: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency) から示されている基準 (表1-2)⁴⁾と比較すると、感度が不十分なキットもあった。

表 1-1 FDAガイダンス付属テンプレートにおいて新型コロナウイルス抗体検査キットの性能に求められる基準

テンプレート 発出日	臨床性能	交差反応性
2020.5.11版	RT-PCR陽性患者（30人）からの少なくとも30検体と、 RT-PCR陰性確定75検体あるいは2019年12月以前に収集した 75検体について ・感度：90%以上 ・特異度：95%以上 ・IgMのみの感度：70%以上 ・IgGのみの感度：90%以上	2019年12月以前に米国で収集した75検体以上など、 多数の陰性既知検体を用いて特異度の評価を行い、 特異度が98%以下であった場合、あるいは多数の検体を用いた 特異度の評価が出来なかった場合は、その他のウイルス12種類 について、交差反応性を試験。
2020.6.26版～ 2021.3.17版	RT-PCR陽性患者（30人）からの少なくとも30検体と、 RT-PCR陰性確定75検体あるいは2019年12月以前に収集した 75検体について IgGとIgMを区別して検出する検査 ・IgMとIgGを併せた感度：90%以上 ・IgMのみの感度：70%以上 ・IgGのみの感度：90%以上 ・IgMとIgGを併せた特異度：95%以上 Total Ig, IgGのみ、あるいはIgMのみを検出する検査 ・感度：90%以上 ・特異度：95%以上	2019年12月以前に米国で収集した75検体以上など、 多数の陰性既知検体を用いて特異度の評価を行い、 特異度が95%以上であり、別に交差反応性の試験を行わない 場合は、特異度の評価に用いた試料の特性について説明すること。 多数の陰性既知検体を用いた特異度の評価が出来なかった 場合は、その他のウイルス12種類について、交差反応性を 試験すること。

表 1-2 MHRAガイダンスにおいて新型コロナウイルス抗体検査キットの性能に求められる基準

ガイダンス 発出日	臨床性能	交差反応性
2021.5.25版	感度 ：発症後20日以降に収集した陽性確定検体を少なくとも 200検体用い、98%以上が陽性（95%信頼区間：96-100%） 特異度 ：新型コロナウイルス出現より6カ月以上前に収集した 検体あるいは陰性確定検体を少なくとも200検体用い、98% 以上が陰性（95%信頼区間：96-100%）	望ましい性能 ・他の既知のコロナウイルスおよび一般的な呼吸器疾患の 病原体と交差反応性がない（0.1%以下） 許容可能な性能 ・他の既知のコロナウイルスあるいはリストに示される 一般的な呼吸器疾患の病原体との交差反応性が最小（1%以下）

表 2 FDAによる新型コロナウイルス抗体検査キットの性能評価試験（Independent Evaluations of COVID-19 Serological Tests）の概要

試験実施機関 および 評価キット数	米国 政府研究機関 ・ National Cancer Institute (NCI) 86キット ・ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2キット ・ National Institutes of Health (NIH) 1キット
評価対象キット	コロナ抗体検査キット：89キット（2021.3.8現在） 内訳 イムノクロマトキット 76キット ELISAキット 10キット 自動分析装置用キット 3キット
使用した試料	「Panel 1」, 「Panel 2」, 「Panel 3」 各パネルは、以下から成る 陽性血清試料（30検体）…核酸増幅検査で陽性確定検体 陰性血清・血漿試料（80検体）…2020年より前に収集された検体
評価項目	IgM, IgG, IgA, Total Igについて、感度と特異度 ⇒抗体保有率5%における陽性的中率、陰性的中率を計算
評価時期	2020年7月～

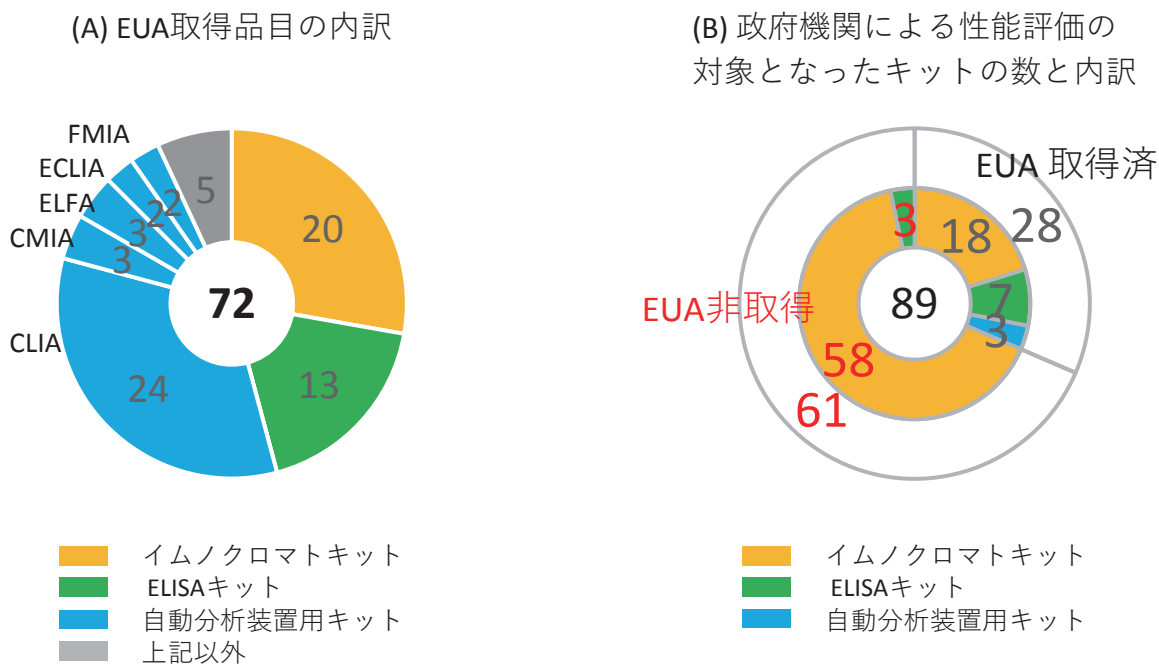


図1 FDAがEUAを与えた品目の内訳 (A) および政府研究機関における評価対象となった抗体検査キットの数と分類 (B) (2021年3月8日時点)

(A) のEUA取得72キットのうちの28キットに加えてEUA非取得の61キットが評価対象となった。

- CLIA: Chemiluminescence immunoassay
- CMIA: Chemiluminescent microparticle immunoassay
- ELFA: Enzyme-linked fluorescence immunoassay
- ECLIA: Electrochemiluminescence immunoassay
- FMIA: Fluorescent microsphere immunoassay

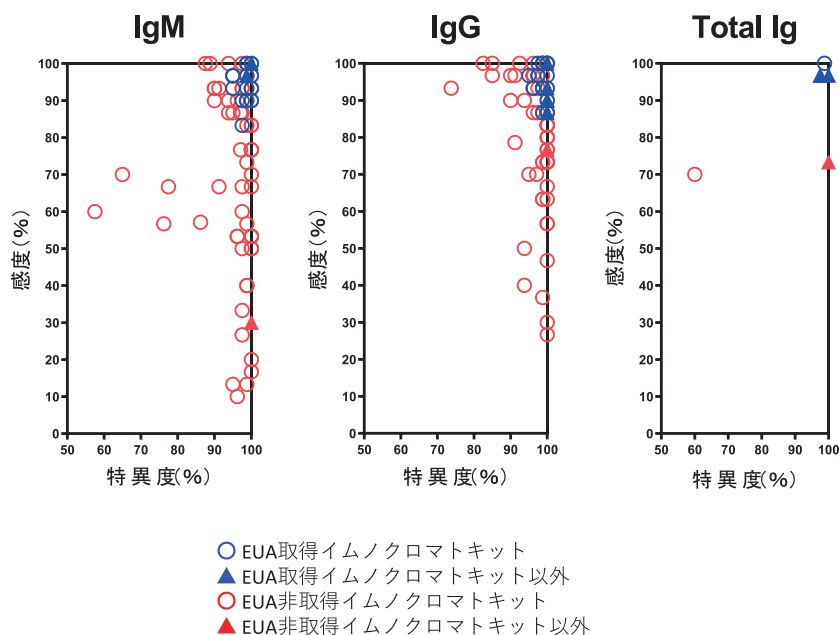


図2 FDAによる抗体検査キットの性能評価結果

公表されているデータを用いて、検査キットの検出対象 (IgG, IgM, Total Ig) 別に感度と特異度をプロットした。

表3 PHEによる新型コロナウイルス抗体検査キットの性能評価試験 (PHE commercial serology assay evaluations) の概要

試験実施機関	PHE Porton Down laboratory (Abott社以外の7キット) PHE Colindale laboratory (Abott社のキット)
評価対象キット	ELISAキット…1キット 自動分析装置用キット…7キット
使用した試料	陽性検体…PCRで陽性確定した回復期患者からの100検体 陰性検体…2019年12月以前に収集した400検体 交差反応性検討用検体 (Confounder samples) 50検体 …季節性コロナウイルス, リウマチ因子, EBウイルス, サイトメガロウイルス, 水痘・帯状疱疹ウイルス陽性でSARS-CoV-2陰性検体 RIPL*) ライム病検体 (SARS-CoV-2陰性) 50検体 ※ キットによって評価に使用した検体パネルに一部違いがある
評価項目	感度 特異度 ⇒抗体保有率5%における陽性的中率, 陰性的中率を計算 精度評価…5濃度のプール試料を1日に5回, 5日間測定して日内変動と日間変動を評価
評価時期	2020年4月～7月

*) Rare and Imported Pathogens Laboratory

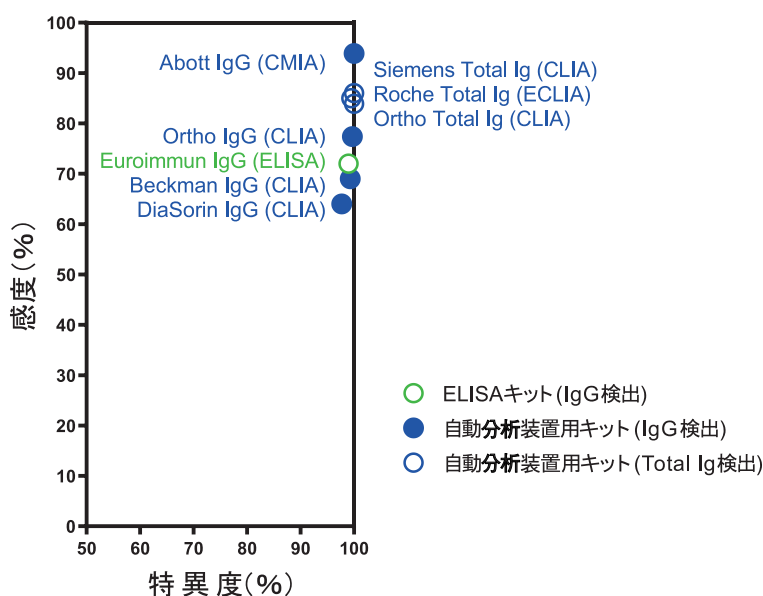


図3 PHEによる抗体検査キットの性能評価結果
公表されているデータを用いて, 検査キットの感度と特異度をプロットした。

2. 新型コロナウイルス抗体検査の評価に使用する国際標準品の整備状況

新型コロナウイルス感染症の診断に用いられる核酸増幅検査では, 測定対象が新型コロナウイルスのRNAであり, RNA標準品のコピー数あるいはウイルス標準品の粒子数を定量の指標として, 検査手法の性能評価を行うことが可能である。一方, 新型コロナウイルス感染により誘導される抗体は, 様々な抗原に対する抗体の混合物であり, 抗体の構造にも大きな多様性がある。また, 患者によっても抗体のプロファイルは異なる。

したがって, 抗体検査では, 核酸増幅検査におけるウイルスRNAコピー数のような, 定量的ための明確な指標となるものが存在しない。そのため, 抗体を含む患者の血清や血漿から標準品の候補となる試料を調製し, 標準品候補品に含まれる抗体の測定が可能であることを確認後, 標準品候補品の抗体価として, 1バイアルあたり1000単位, のようにある値を付与し, 以降はその値を基準に定量的な評価を行う, という方法がとられる。WHOは, 抗体検査を含め様々な分析において基準となる標準品設定に関する取り組みを行っ

ており、標準品のうち特に重要性の高いものに対して国際標準品 (International Standard), 国際参照パネル (International Reference Panel), あるいは国際参照試薬 (International Reference Regent) を策定しており、英国のNIBSC (National Institute of Biological Standards and Control) が製造、管理、分与などを行っている。

抗SARS-CoV-2抗体検査キットの開発および評価に必要な標準品についても、表4に示すように新型コロナウイルス感染症回復患者検体から調製した抗SARS-CoV-2抗体の陽性対照や抗体パネルがNIBSCから頒布されてきた⁵⁾。患者個別血漿から調製された20/130は、感染拡大初期の2020年4月には頒布が開始され、2021年6月末までに頒布終了となった。2021年7月時点で、患者プール血漿から調製された抗体検査用のキャリブレーションや品質管理用試料が3種類、複数の患者血漿と新型コロナウイルス陰性検体からなる2種類の抗体パネルが頒布されている。

抗SARS-CoV-2抗体検査に用いる国際標準品や国際参照パネルの策定に際して、WHOは、NIBSCが調製し

たキャリブレーションや抗体パネル等 (表4) を試料として、2020年7月から10月の期間に15ヶ国44機関による国際共同検定を行った。この国際共同検定の概略を表5に示す⁶⁾。共同検定において標準品20/136は複数のアッセイ法で評価され、国際標準品として使用できることが確認され、中和活性として「1000 international units (IU)/mL」の値が付与された。結合活性は、同じ抗原に対する同じクラスの抗体 (例えば、抗RBD protein IgG, 抗N protein IgMなど) を検出するアッセイ法の比較に用いることとされ、「1000 binding antibody units (BAU)/mL」の値が付与された。即ちBAUは、同じ抗原に対する同じクラスの抗体の比較に限って用いることができる。また、この標準品20/136を用いて参照パネル20/268を構成する各プール血漿について、抗体価 (IUおよびBAU) の比較がなされた。最低抗体価の試料 (20/140) を検出できなかった少数の例外を除いて、すべてのアッセイ法においてパネルを構成する各標準品の抗体価の順序が一致しており、参照パネルとしての目的にかなっていることが示された。WHOはこの共同検定結果を2020年12月に公表し⁶⁾、プール血漿20/136を国際

表4 NIBSCが頒布している新型コロナウイルス抗体の標準品

タイプ	用途	NIBSC code	名称	内容
患者 プール血漿	抗体検査におけるキャリブレーション	20/136	First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human [WHO 国際標準品]	COVID-19回復期患者11名に由来するプール血漿 (高タイトターの抗SARS-CoV-2抗体を含む)
	抗体検査の相対的感度の評価と比較に使用するキャリブレーション	20/162	Anti-SARS-CoV-2 Antibody Diagnostic Calibrant	COVID-19回復期患者3名に由来するプール血漿 (高タイトターの抗SARS-CoV-2抗体を含む)
	診断機関における検査性能モニター用の外部QC試料	20/B764	External Quality Control reagent for anti-SARS-CoV-2 antibody	COVID-19回復期患者2名に由来するプール血漿
抗体パネル	抗体検査の開発および評価、ワクチン評価、研究用、抗SARS-CoV-2抗体パネル	20/268	First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin, human [WHO 国際参照パネル]	5種類のプール血漿で構成したパネル ・ COVID-19回復期患者に由来するプール血漿4種 抗SARS-CoV-2抗体価：高 抗SARS-CoV-2抗体価：中 抗SARS-CoV-2抗体価：低 抗S抗体は低いが抗N抗体が比較的高い ・ 陰性対照 2019年以前に収集した健康人ドナー由来プール血漿
	抗体検査評価用の抗SARS-CoV-2抗体パネル	20/B770	Anti-SARS-CoV-2 Verification Panel for Serology Assays	反応性と抗体組成の異なる23本の陽性検体と14本の陰性検体
患者 個別血漿	抗体検査の開発及び評価における陽性対照	20/130	Research reagent for anti-SARS-CoV-2 Ab	COVID-19回復期患者の血漿 (高タイトターの抗SARS-CoV-2抗体を含む)

表5 WHOが行った新型コロナウイルス抗体国際標準品および参照パネル策定のための国際共同研究の概要

試料		試料の内容	共同検定参加機関	評価に使われたアッセイ法	評価項目
NIBSC Code: 20/136	WHO 国際標準品の候補品	COVID-19回復期患者11名に由来するプール血漿 (高タイター)	15カ国44機関 オーストラリア (4) ブラジル (1) カナダ (1) 中国 (1) ドイツ (3) インド (1) イタリア (1) 日本 (1) ケニア (1) オランダ (2) サウジアラビア (1) シンガポール (1) 韓国 (3) イングランド (11) アメリカ (12)	のべ125アッセイ ・中和アッセイ ・in house ELISA ・commercial ELISA ・自動分析装置によるイムノアッセイ ・フローサイトメトリー ・イムノクロマト法 ・その他	陽性タイター 機関間の陽性タイターのばらつき (アッセイ別) 20/136 の安定性 (保存温度/保存期間)
20/150	参照パネル候補品【高タイター】	COVID-19回復期患者に由来するプール血漿 (高タイター)			
20/148	参照パネル候補品【中タイター】	COVID-19回復期患者に由来するプール血漿 (中程度のタイター)			
20/144	参照パネル候補品【S:低, N:高】	COVID-19回復期患者に由来するプール血漿 (S抗体:低タイター, N抗体:高タイター)			
20/140	参照パネル候補品【低タイター】	COVID-19回復期患者に由来するプール血漿 (S抗体:低タイター, N抗体:低タイター)			
20/142	参照パネル候補品【陰性対照】	2019年以前に収集した健康人由来プール血漿			
NIBSC Code: 20/130	回復期1患者血漿	COVID-19回復期患者1名の血漿 (比較的高タイター)			
回復期患者プール血清		COVID-19回復期患者由来プール血清 (陽性)			
回復期患者プール血清		COVID-19回復期患者由来プール血清 (微弱陽性)			
回復期1患者血漿		COVID-19回復期患者1名の血漿 (弱陽性)			

標準品として設定した⁷⁾。また、抗体パネル20/268を国際参照パネルとして設定し、20/136の抗体価をもとにパネルを構成する各標準品に抗体価が付与された⁸⁾。同時に20/130にも改めて抗体価が付与された⁹⁾。

このように患者検体から標準品を調製することにより、早期から標準品を設定・頒布でき、異なる抗原に対する抗体を含み、抗体価に差のある標準品を複数作成することが可能であった。しかしながら、患者検体の量には限りがあり、同一ロットの標準品を大量に作成できず、標準品のロット更新時には標準品に含まれる抗体の特性が変動すると考えられ、国際標準品を用いて抗体検査の性能を評価する場合、標準品が変われば異なる結果が得られる可能性があることに留意が必要である。この点を補完するには、抗SARS-CoV-2モノクローナル抗体を用いた性能評価も有用であると考えられ、抗体検査キットの信頼性確保には、国際標準品や適切なモノクローナル抗体等の種々の自家標準品を組み合わせた対応が必要と考えられる。

まとめ

SARS-CoV-2感染拡大に伴い海外の規制当局やWHOによって、抗体検査キットの性能評価および標準品の策定に関する速やかな対応がなされてきた。これらの取り組みにより、抗体検査キットの性能評価が適切に行われ、臨床情報と合わせて、適切な陽性判定基準や抗体検査キットに求められる分析性能が定まっていくと考えられる。

新興感染症の感染拡大時における検査キットの品質の担保には、共通試料を用いた公的機関でのキットの性能評価や、性能評価に用いる公的標準品策定等に早期から取り組むことが有用である。

引用文献

1) FDA Serology Template for Test Developers in “Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised)”;
<https://www.fda.gov/medical-devices/>

- coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas#individual-serological
- 2) FDA Independent Evaluations of COVID-19 Serological Tests; <https://open.fda.gov/apis/device/covid19serology/>
 - 3) PHE COVID-19: laboratory evaluations of serological assays; <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-laboratory-evaluations-of-serological-assays>
 - 4) MHRA Guidance: Target Product Profile: antibody tests to help determine if people have recent infection to SARS-CoV-2: Version 2; <https://www.gov.uk/government/publications/how-tests-and-testing-kits-for-coronavirus-covid-19-work/target-product-profile-antibody-tests-to-help-determine-if-people-have-recent-infection-to-sars-cov-2-version-2>
 - 5) Coronavirus (COVID-19)-related research reagents available from the NIBSC; https://www.nibsc.org/science_and_research/idd/cfar/covid-19_reagents.aspx
 - 6) WHO/BS.2020.2403 Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody; <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>
 - 7) First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136, Instructions for use; <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>
 - 8) First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin NIBSC code: 20/268. Instructions for use; <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-268.pdf>
 - 9) Data Sheet, Research reagent for anti-SARS-CoV-2 Ab, NIBSC code 20/130; <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-130.pdf>