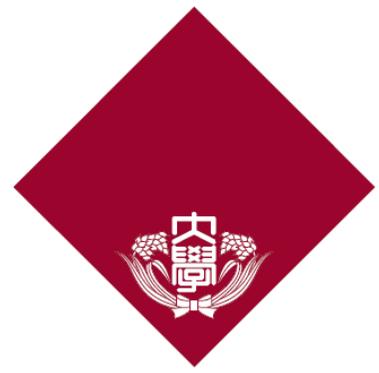


Biophysics and Physicobiology (J-STAGE DATA公開用)



新型コロナウイルスの超高感度抗原検査法

伊藤 悦朗

早稲田大学

教育学部・理学科・生物学専修

大学院先進理工学研究科・生命理工学専攻

WHOから見たCOVID-19

On the New Year's Eve 2020, the WHO China Country Office was informed of a pneumonia of unknown cause, detected in the city of Wuhan in China.

2019年12月31日、WHOの中国オフィスに、中国武漢において原因不明の肺炎が起こっていることが報告された。

In January 30, 2020, WHO declared the 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak a Public Health Emergency of International Concern.

2020年1月30日、WHOは2019年の新型コロナウイルスの大発生を「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」と宣言した。

The virus was initially designated as 2019-nCoV, but has been renamed as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by the International Committee on Taxonomy of Viruses.

今回のウイルスは始めは2019-nCoVと名付けられたが、その後、国際ウイルス分類委員会によってSARS-CoV-2と名前が付け直された。

On February 11, 2020, WHO debuted the illness as coronavirus disease 2019 (COVID-19).

2020年2月11日、WHOは今回の疾病をCOVID-19と呼ぶことにした。

On March 11, 2020, the WHO Director-General said: "We have therefore made the assessment that COVID-19 can be characterized as a pandemic."

2020年3月11日、WHO事務局長が「COVID-19はパンデミックである」と宣言した。

At the time of April 8, 2020, however, WHO did not “recommend the use of antigen-detecting rapid diagnostic tests for patient care, although research into their performance and potential diagnostic utility is highly encouraged”.

2020年4月8日の時点では、WHOは「抗原検出の迅速検査の使用は勧めない。もちろんその検査の研究は奨励される」とした。

There are 2 main reasons for this WHO judgement: (1) The main weakness of antigen tests is low detection sensitivity. The fact would make many false negative responses at diagnosis. (2) The detection specificity must be strict.

その理由は2つあって、(1)抗原検査は検出感度が低い。すなわち偽陰性が出る。(2)検出の特異度をもっと上げなければならない、というものであった。

*A famous article appeared in Science on May 22, 2020, describing “**Coronavirus antigen tests: quick and cheap, but too often wrong?**”.*

2020年5月20日の *Science* 誌に「新型コロナウイルスの抗原検査は迅速で安価だが、あまりにも間違いが多い」という記事が出た。

言葉の整理

新型コロナウイルスの名称： SARS-CoV-2
severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

感染症の名称： COVID-19
coronavirus disease 2019

PCR検査： RNAの量を調べることで、ウイルスの存在を知る。

抗原検査： ウイルスに含まれる特定のタンパク質の量を調べることで、ウイルスの存在を判定する。

抗体検査： 抗体の存在を調べることで、かつてこのウイルスに罹患したかを判定する。

新型コロナウイルスの検査方法の種類

検査方法	何がわかるのか？	検査対象、精度	検体	有利な点
PCR検査	現在感染しているのか？	ウイルスの核酸（RNA）を増幅して検出する。正しく判定できる精度は6～9割。	鼻・のどの粘膜、唾液	正確
抗原検査	現在感染しているのか？	ウイルス内のタンパク質を増幅しないで検出する。一般的には <u>PCR検査よりも精度が劣る</u> 。	鼻・のどの粘膜	<u>早い、安い、簡単</u>
抗体検査	過去に感染したのか？	ウイルス感染後に血液中につくられた抗体（タンパク質）を検出する。精度は現在確認中。	血液	早い、安い、簡単



TOPページ



保健センターとは



受診のご案内



健康診断について



健康診断結果



Q&A・その他

検査

II-3) 検査

1. 検査にはどういったものがあるでしょうか？

新型コロナウイルス感染症を診断するための検査としては、PCR法等による遺伝子検出法（検査材料は鼻咽頭ぬぐい液、あるいは喀痰、唾液（これまで、発症9日以内の有症状者が対象でしたが、7月17日より無症状者も対象になりました））があります。これに加え、血液（やその成分）を用いたイムノクロマト法による抗体検出法も一部で試験的に導入されています。インフルエンザの検査で頻用される抗原検査は、新型コロナウイルス感染症においても2020年5月13日に保険適応となりました。現在国内で診断に使えると承認されているのはPCR検査と抗原検査になります。

肺炎があるかを調べるには、胸部エックス線検査や胸部CT検査、また血液検査などを行うことになるでしょう。

2. PCR法で陰性だった場合、新型コロナウイルス感染症で無いと言えるでしょうか？

PCR法では検体採取や検体保存の条件などで偽陽性(本当は新型コロナウイルス感染症で無いのに、陽性と出てしまう)、偽陰性(本当は新型コロナウイルス感染症であるのに、陰性と出てしまう)が起こりえます。この割合ははっきりしていませんが、PCR検査の感度(新型コロナウイルス感染症の方で、PCR検査が陽性となる割合)は現時点では高く70%程度と考えられており、検査結果の判断は慎重に行う（PCR法で陰性でも、新型コロナウイルス感染症でないとは言い切れないことがある）必要があります。

[<コラム>感度・特異度と陽性的中率](#)

PCR検査の感度(新型コロナウイルス感染症の方
で、PCR検査が陽性となる割合)は現時点では高
くて70%程度と考えられており、検査結果の判断
は慎重に行う (PCR法で陰性でも、新型コロナウ
イルス感染症でないとは言い切れないことがあ
る) 必要があります。

統計学による説明

	疾患あり	疾患なし
検査結果が陽性	真陽性 A	偽陽性 B
検査結果が陰性	偽陰性 C	真陰性 D

$$\text{感度 (sensitivity)} = \frac{A}{A+C}$$

検査の感度が高いとは、その検査で病気の人を逃さないということ。逆に言うと、陰性と出ればほぼ陰性。

$$\text{特異度 (specificity)} = \frac{D}{B+D}$$

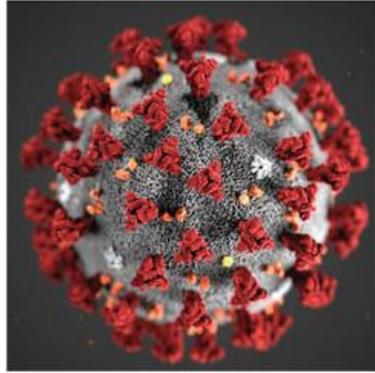
検査の特異度が高いとは、病気でない人には陰性と出る可能性が高いということ。つまりこの検査で陽性ならばほぼ陽性（確定診断）。問題は陰性であっても、病気でないとは言い切れない。

$$\text{精度 (accuracy, precision)} = \frac{A+D}{A+B+C+D}$$

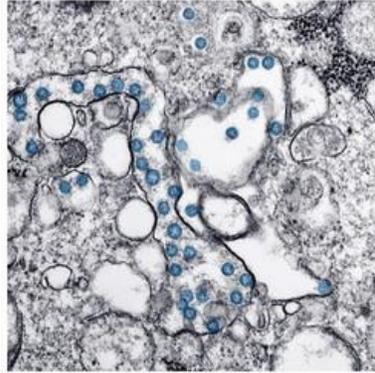
ただし人によって使い方がさまざま。マスコミ報道を聞いていると「確からしい」程度。

Portraits of a virus

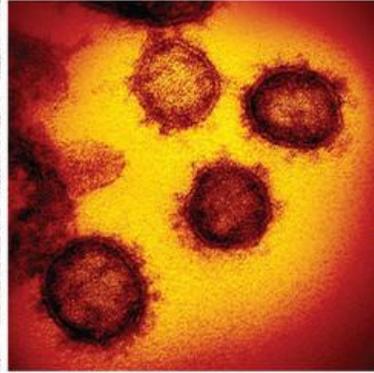
Technical illustrations and artificially coloured handout images of the new coronavirus (formally known as SARS-CoV-2) which causes the disease known as COVID-19



Ultrastructural morphology, CDC ¹



Transmission electron microscope image by CDC, virus coloured blue



Transmission electron microscope image by NIH ²

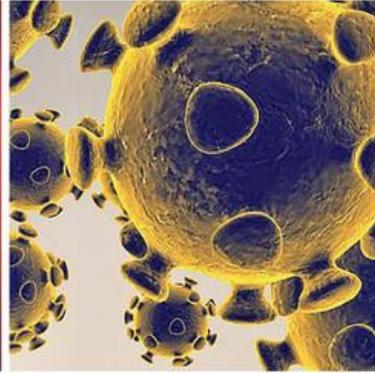
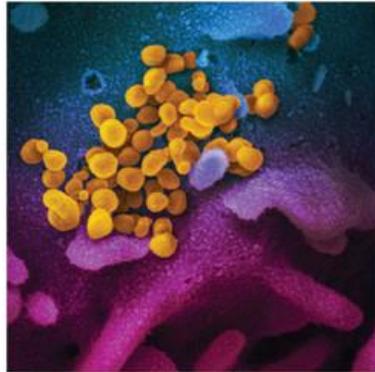
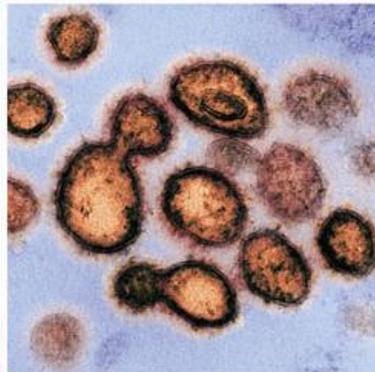


Illustration by the FDA ³



Scanning electron microscope image by NIH showing yellow virus particles emerging from cells cultured in a lab



Transmission electron microscope image by NIH

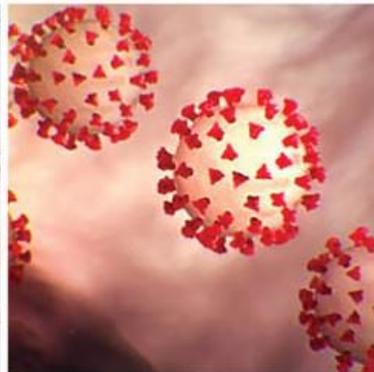
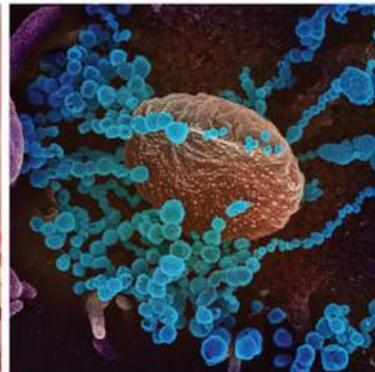


Illustration released by CDC

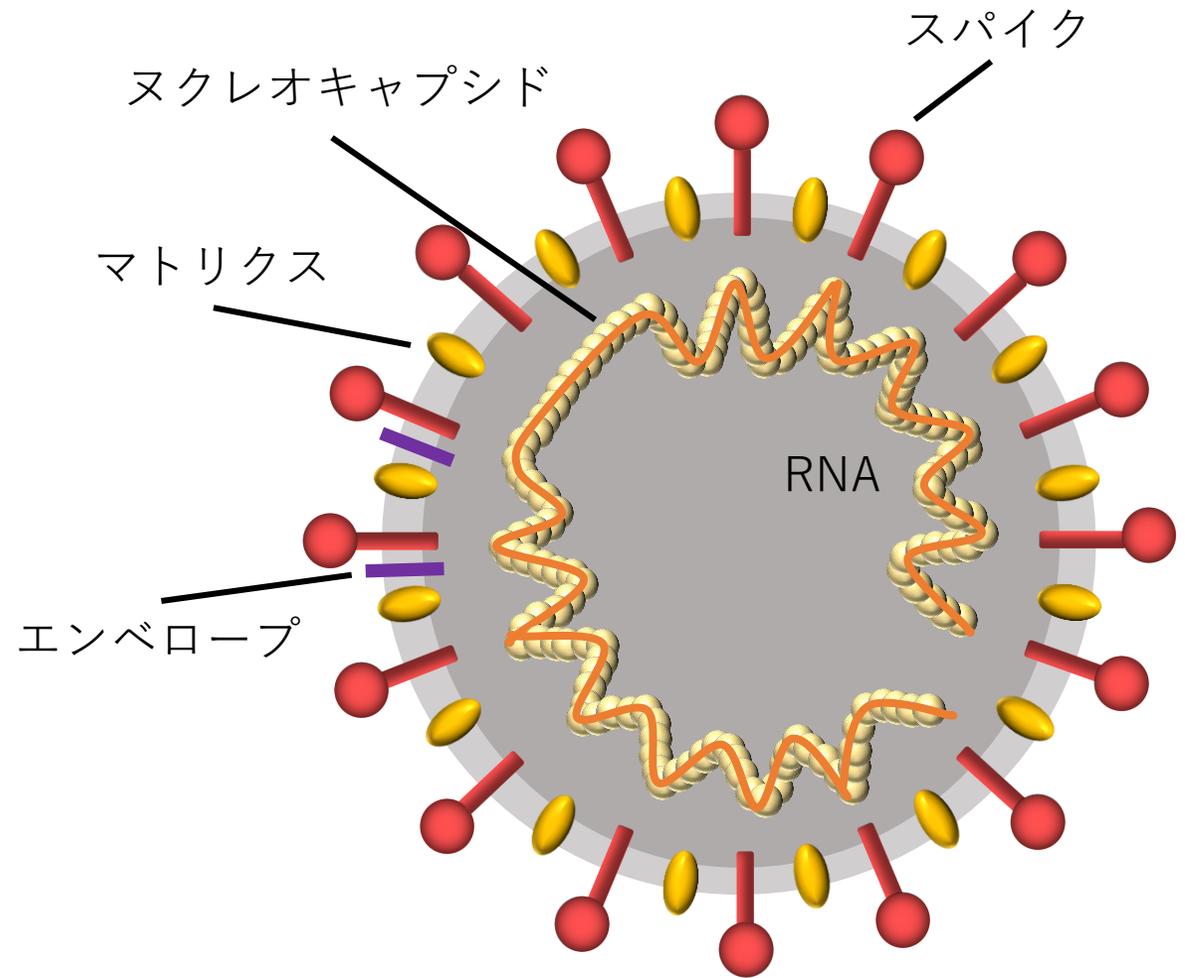
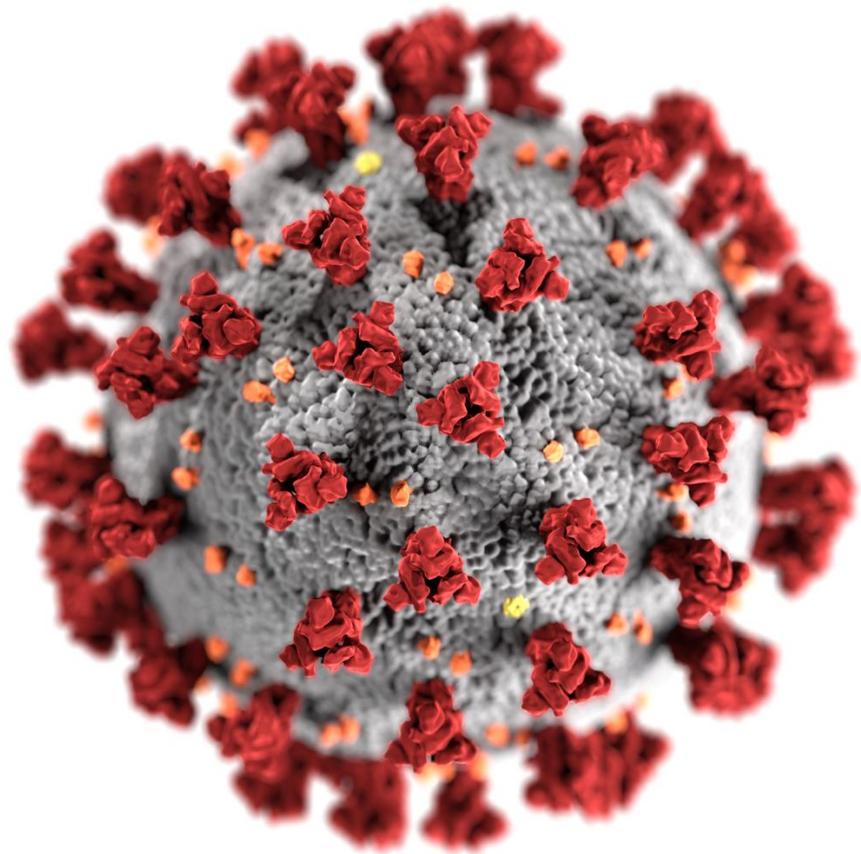


Scanning electron microscope image by NIH, virus coloured blue, emerging cells

Sources: ¹Centers for Disease Control and Prevention, ²National Institutes of Health, ³Food and Drug Administration

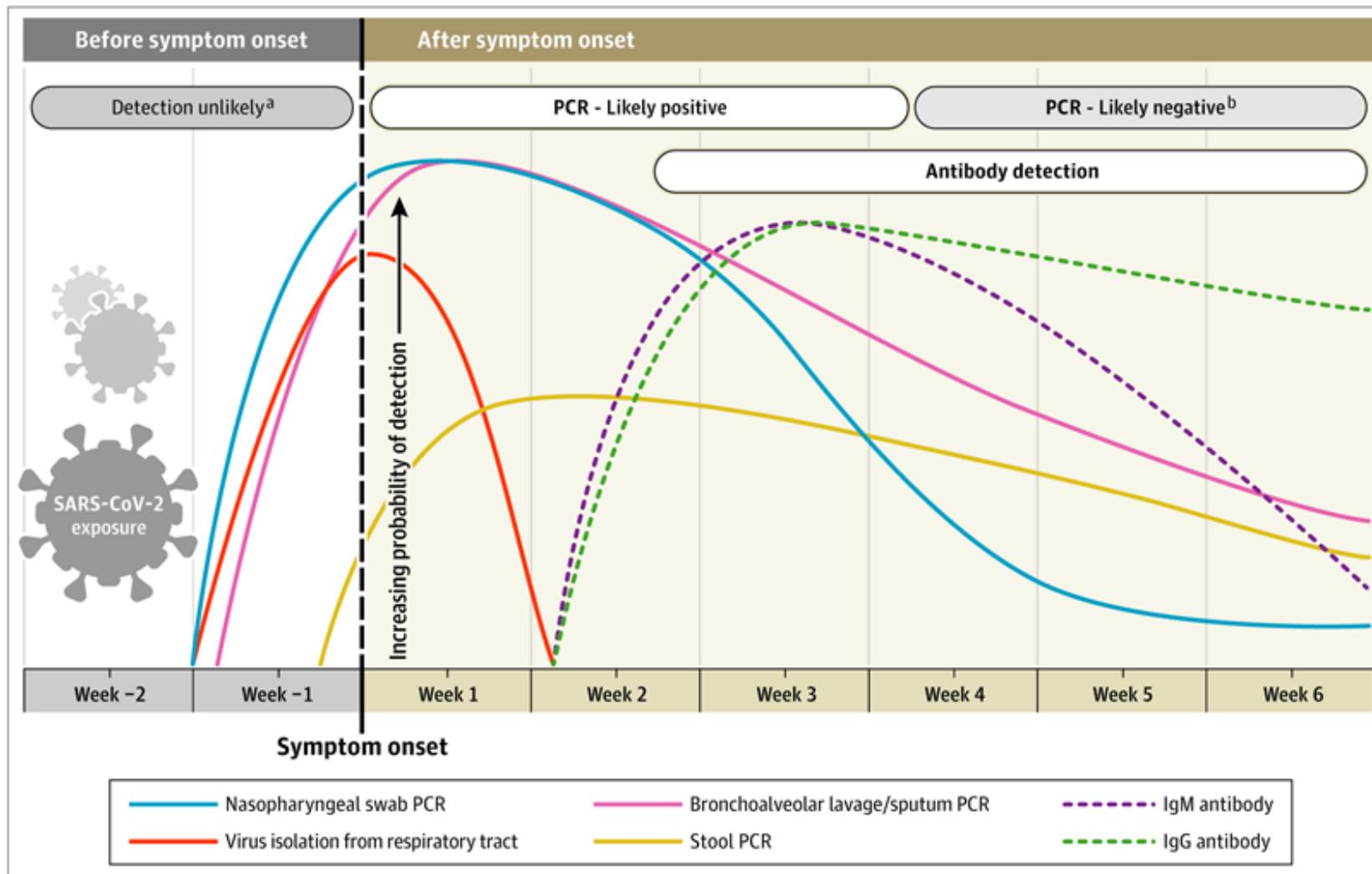
© AFP

アメリカ疾病予防管理センター、アメリカ国立衛生研究所、アメリカ食品医薬品局

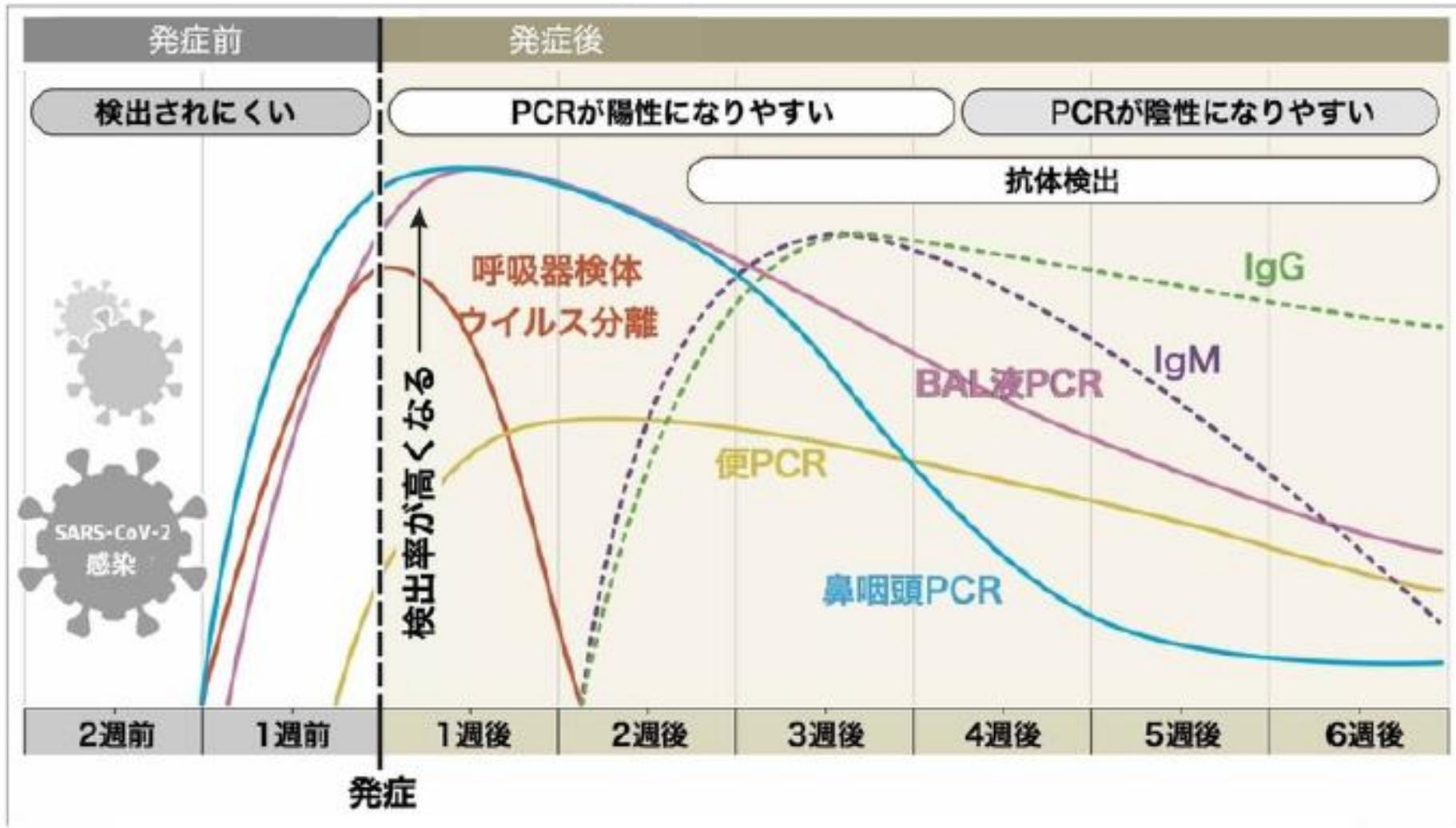


<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=23312>

伊藤研究室作図



Nandini Sethuraman, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Akihide Ryo
 Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2
 JAMA, on line, May 6, 2020
 doi:10.1001/jama.2020.8259



忽那賢志氏 訳

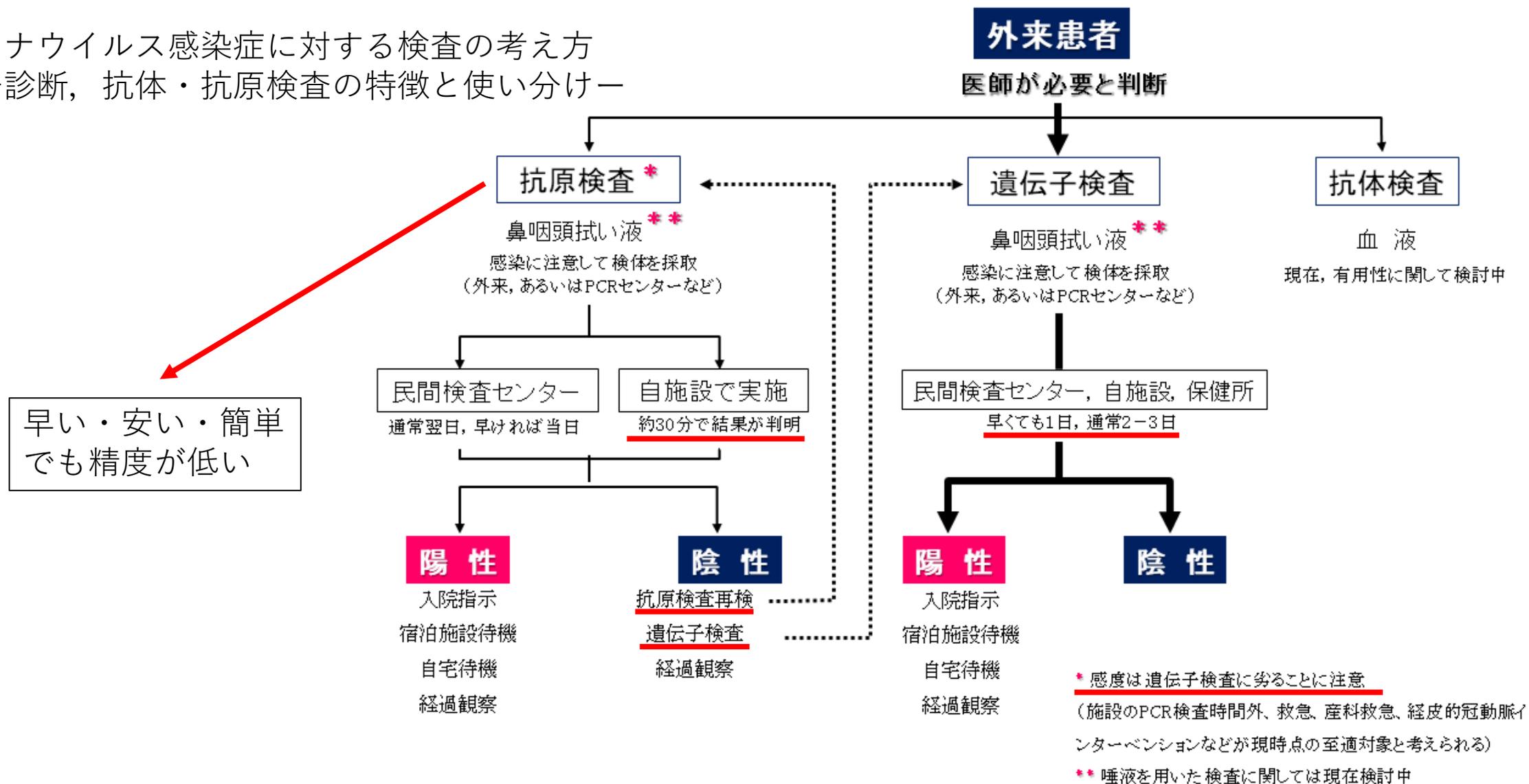
BAL： 気管支肺胞洗浄（気管支鏡を用いて肺の一部に生理食塩水を大量に注入し、回収した洗浄液を解析する）

2020年5月25日

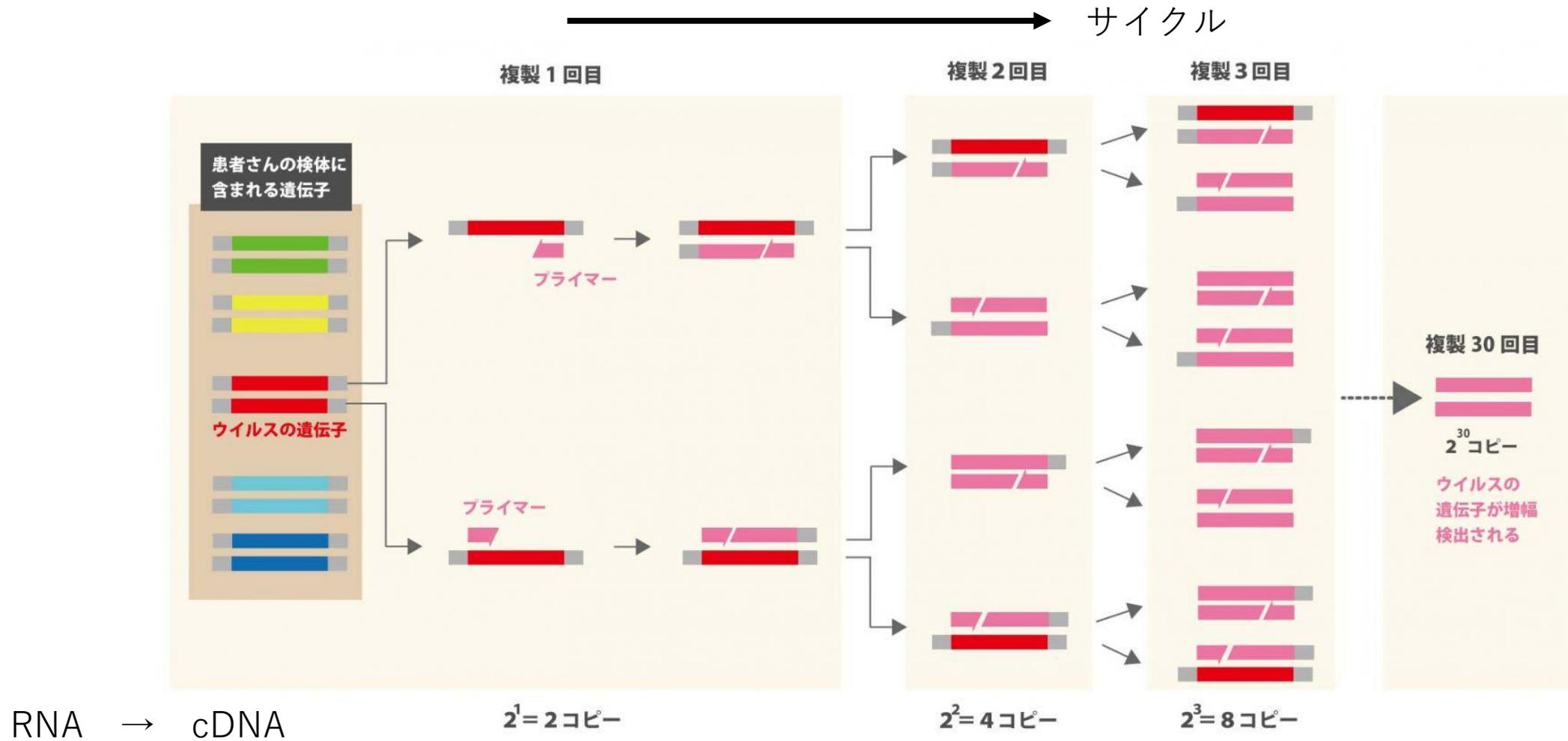
一般社団法人日本臨床微生物学会
一般社団法人日本感染症学会
一般社団法人日本環境感染学会

図 新型コロナウイルス感染症の検査の適応と流れ

新型コロナウイルス感染症に対する検査の考え方
— 遺伝子診断, 抗体・抗原検査の特徴と使い分け —



PCR検査 (PCR法) とは



PCR検査を金魚すくいに例えると。。。



問題点 1 : 金魚すくいができない？



問題点 2 : 取れる容量が少ない



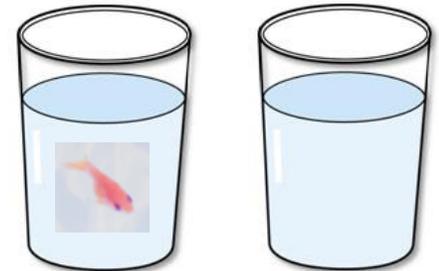
問題点 3 : 死んでいても



死んでいても、残がいても、核酸は残る。

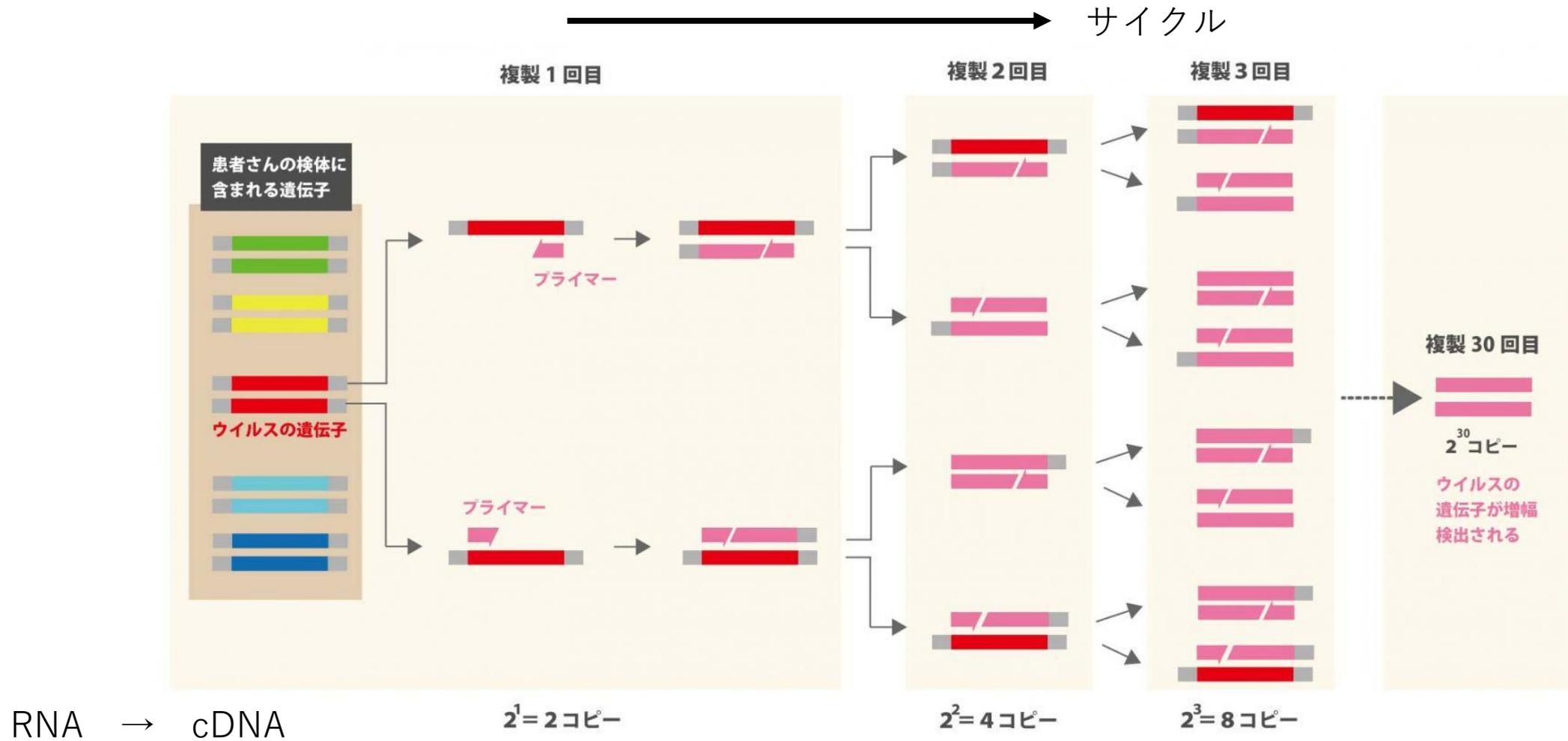
日本臨床検査医学会では、PCR検査の実施が進まない背景などについて、学会員に情報収集や意見聴取を行い、2020年4月13日付で「SARS-CoV-2（新型コロナウイルス）核酸検出検査の体制の課題対応について」との報告書を公表した。

プールの水全体を取り扱えば良いが、プールからすくえる量が、例えばコップ一杯の水しか採取できなければ。。。



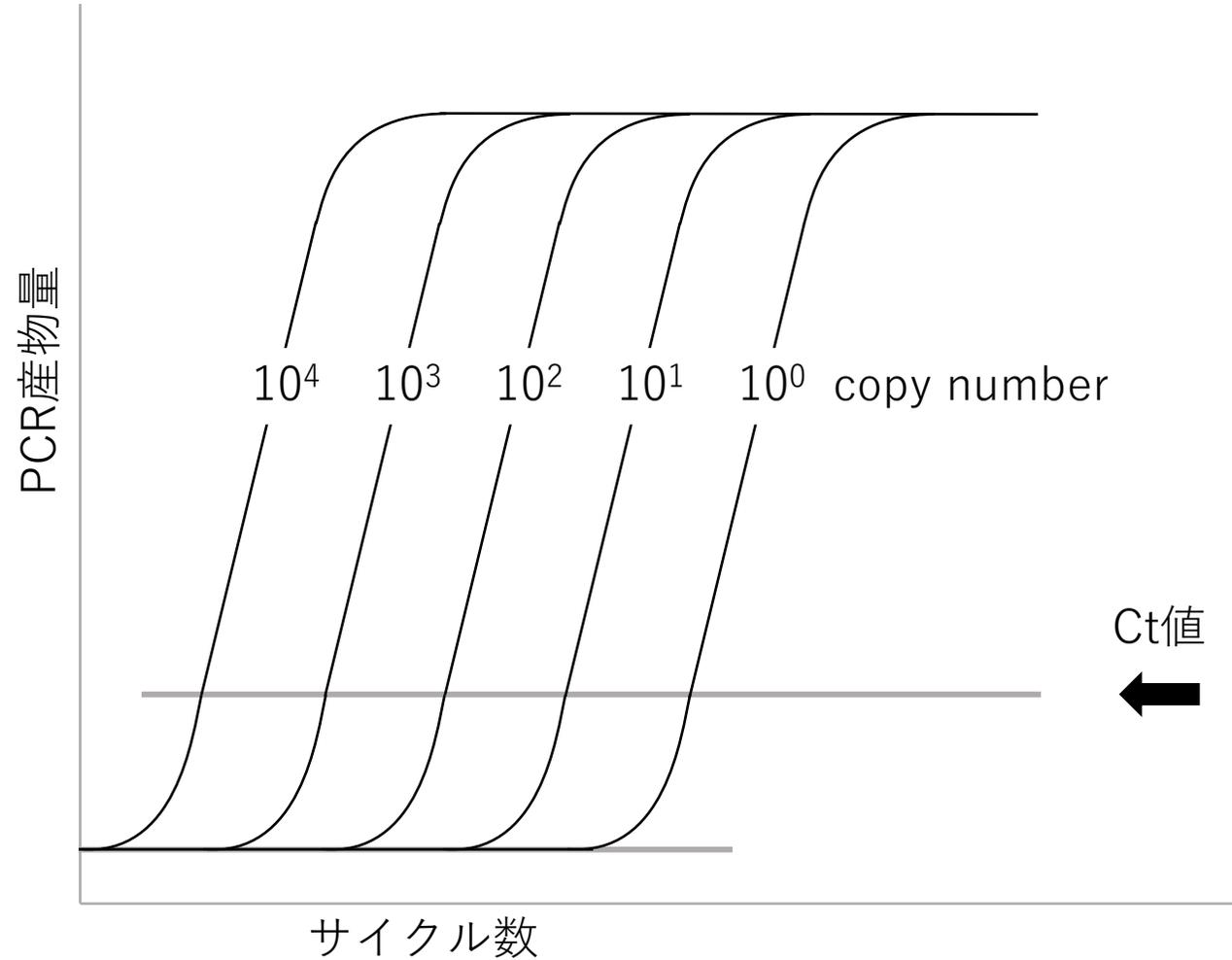
増幅すると・・・

PCR検査 (PCR法) とは



サイクル数 核酸（PCR産物）の量

0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000



新型コロナウイルスの検査方法の種類

検査方法	何がわかるのか？	検査対象、精度	検体	有利な点
PCR検査	現在感染しているのか？	ウイルスの核酸（RNA）を増幅して検出する。正しく判定できる精度は6～9割。	鼻・のどの粘膜、唾液	正確
抗原検査	現在感染しているのか？	ウイルス内のタンパク質を増幅しないで検出する。一般的には <u>PCR検査よりも精度が劣る</u> 。	鼻・のどの粘膜	<u>早い、安い、簡単</u>
抗体検査	過去に感染したのか？	ウイルス感染後に血液中につくられた抗体（タンパク質）を検出する。精度は現在確認中。	血液	早い、安い、簡単

統計学による説明

	疾患あり	疾患なし
検査結果が陽性	真陽性 A	偽陽性 B
検査結果が陰性	偽陰性 C	真陰性 D

$$\text{感度 (sensitivity)} = \frac{A}{A+C}$$

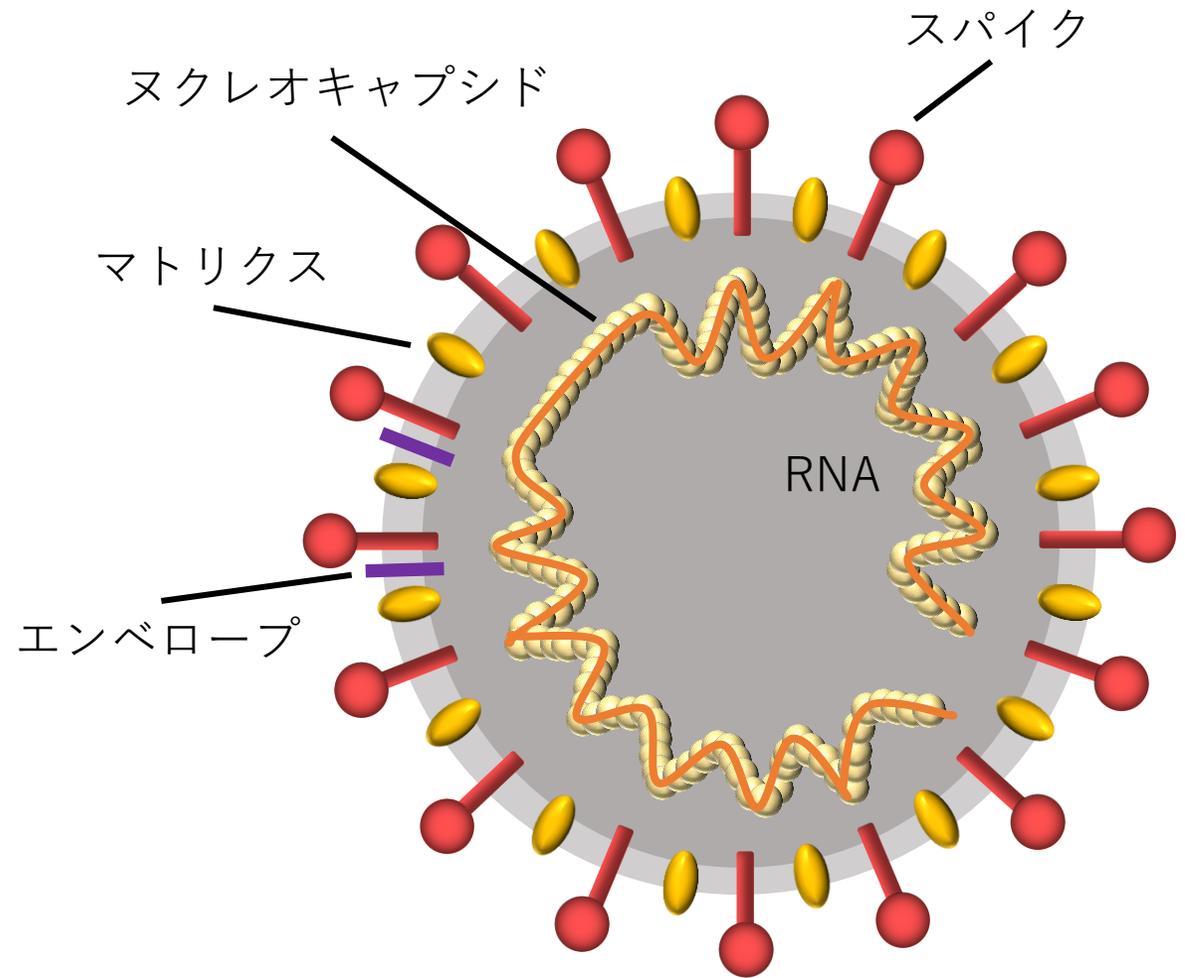
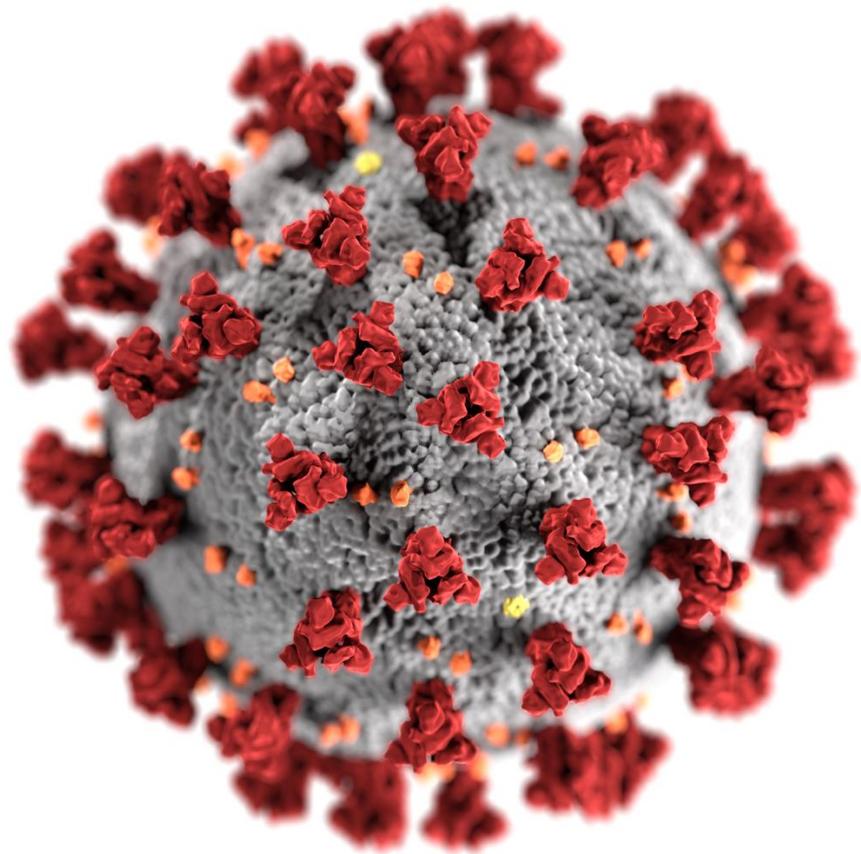
検査の感度が高いとは、その検査で病気の人を逃さないということ。逆に言うと、陰性と出ればほぼ陰性。

$$\text{特異度 (specificity)} = \frac{D}{B+D}$$

検査の特異度が高いとは、病気でない人には陰性と出る可能性が高いということ。つまりこの検査で陽性ならばほぼ陽性（確定診断）。問題は陰性であっても、病気でないとは言い切れない。

$$\text{精度 (accuracy, precision)} = \frac{A+D}{A+B+C+D}$$

ただし人によって使い方がさまざま。マスコミ報道を聞いていると「確からしい」程度。



<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=23312>

伊藤研究室作図

1. なぜ核酸（つまりRNA）ならば高感度に検出できるのか？

2. なぜタンパク質ではそれができないのか？

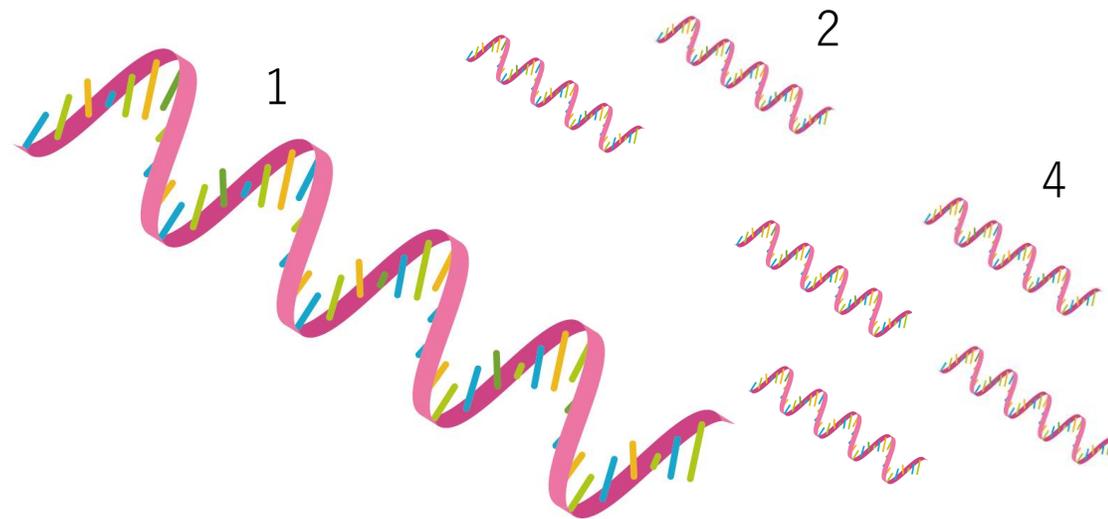


1. 核酸はそれ自身を増幅できるから。

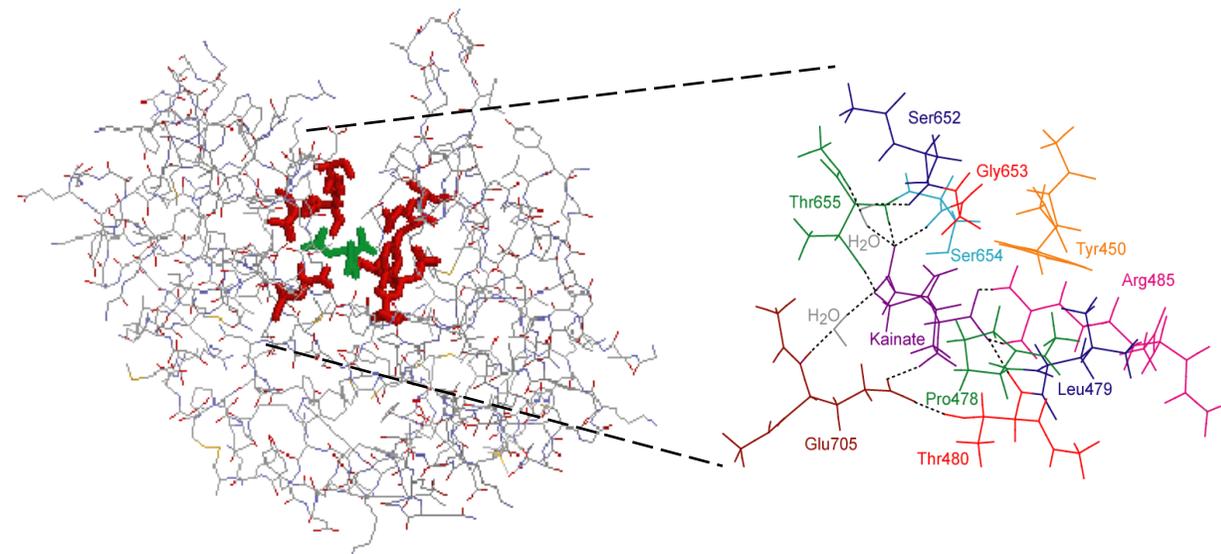
2. タンパク質は増幅できないから。



ではタンパク質（抗原）はどうすれば高感度に検出できるようになるのか？



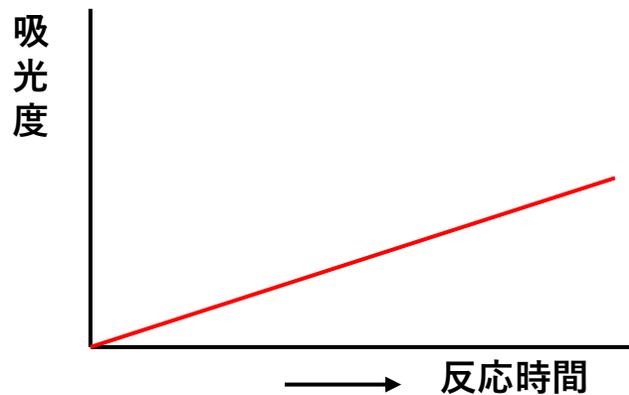
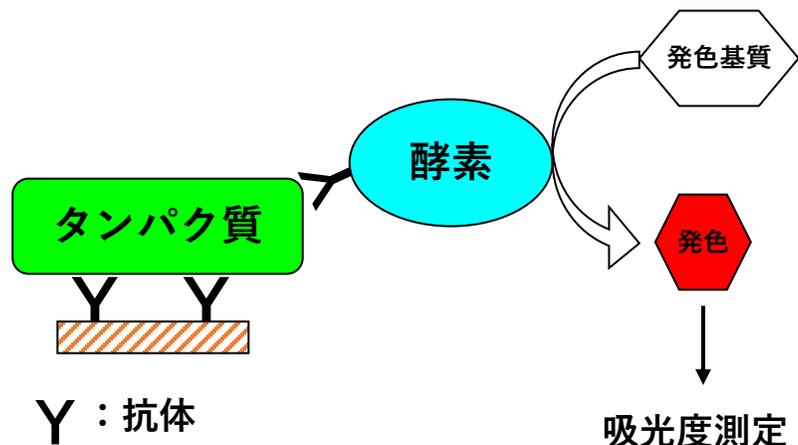
RNA: 無料画像



タンパク質: 伊藤研究室作図 (グルタミン酸受容体)

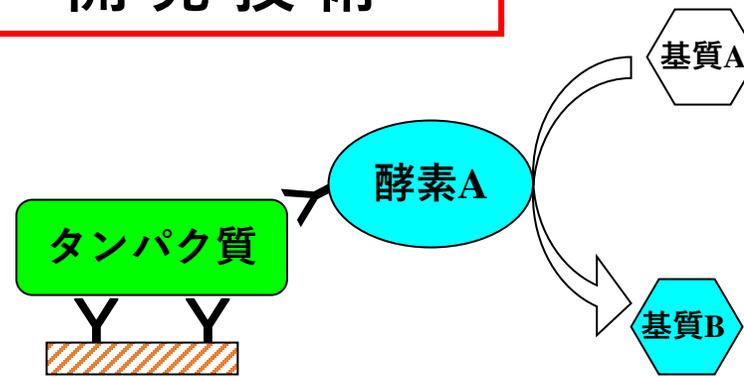
伊藤研究室の試み（抗原検査の超高感度化）

従来の酵素免疫測定法

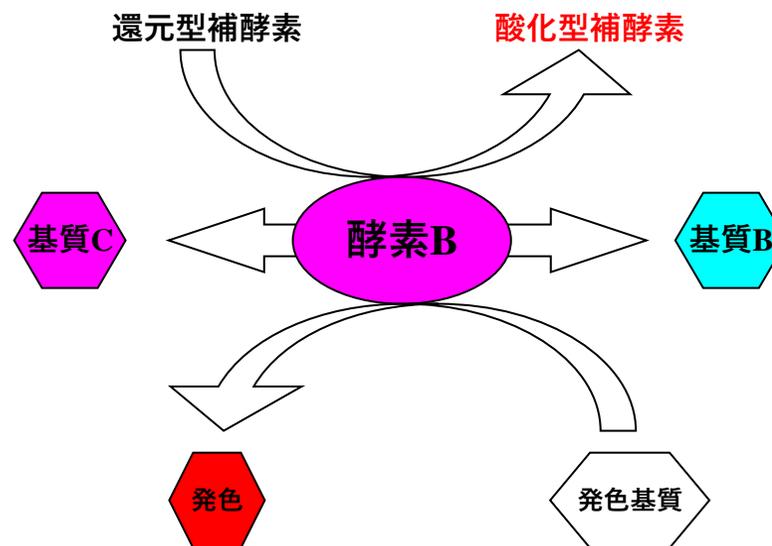


反応が直線的

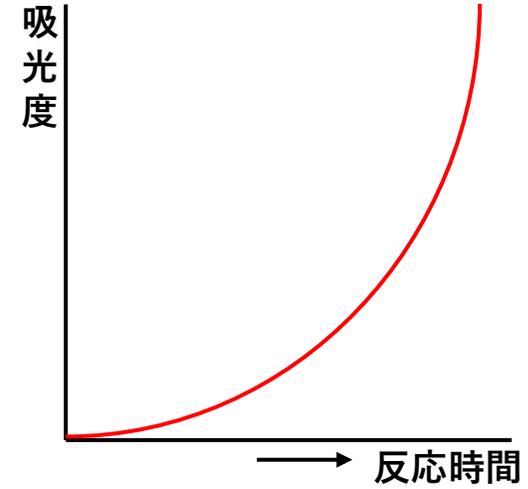
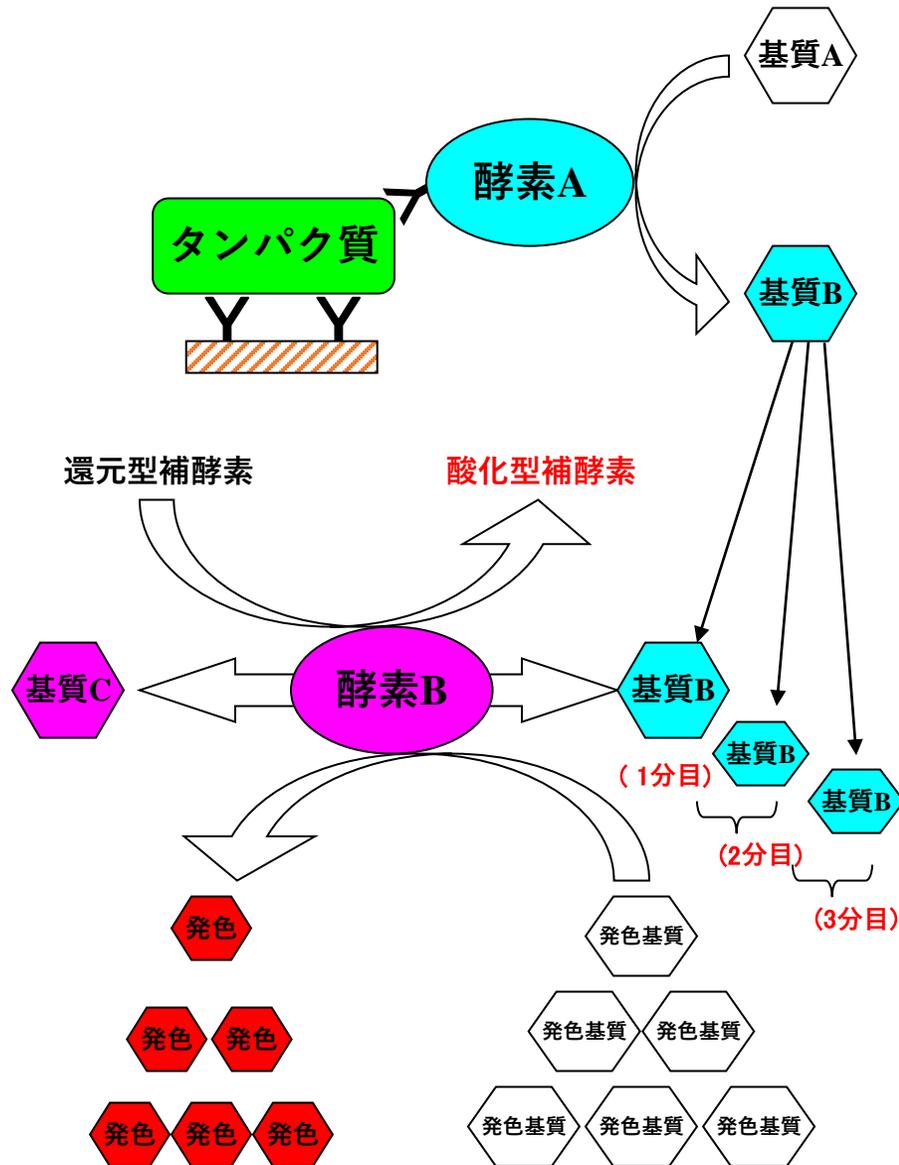
開発技術



従来の酵素免疫測定法の技術に
酵素サイクリング技術を組み合わせる



抗原（タンパク質）の超高感度測定法：シグナルを増幅する

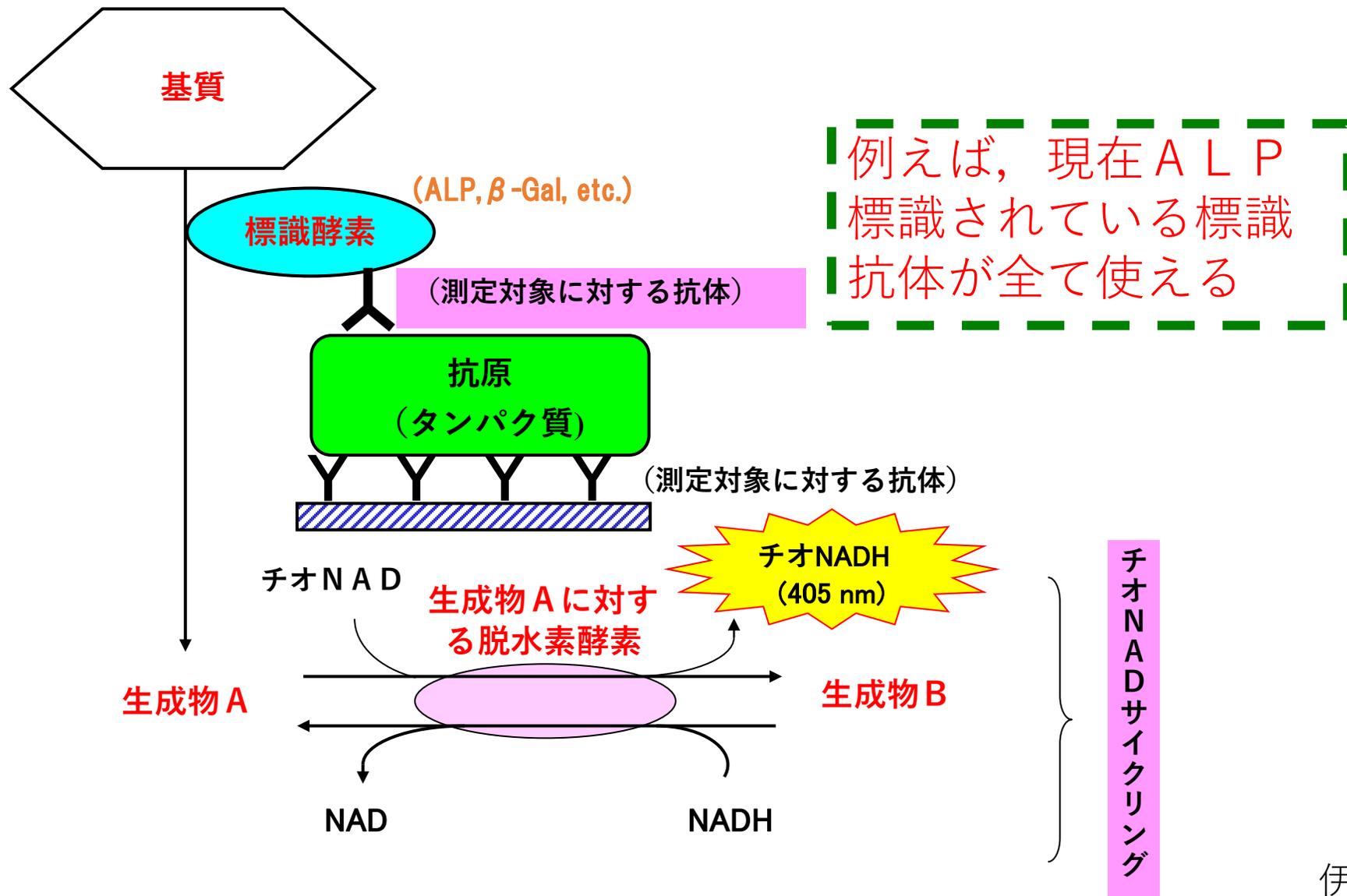


反応が2次関数的

↓

超高感度

酵素免疫測定法とチオNADサイクリングとの組み合わせ



アボガドロ数

モルの定義：6.02214076に10の23乗を乗じた数の要素
粒子又は要素粒子の集合体（組成が明確にされたもの
に限る）で構成された系の物質質量。

分子1つは、 1.66×10^{-24} モル。

新型コロナウイルスの新しい抗原検査

Diagnostics 2020, 10, 594; doi:10.3390/diagnostics10080594



diagnostics

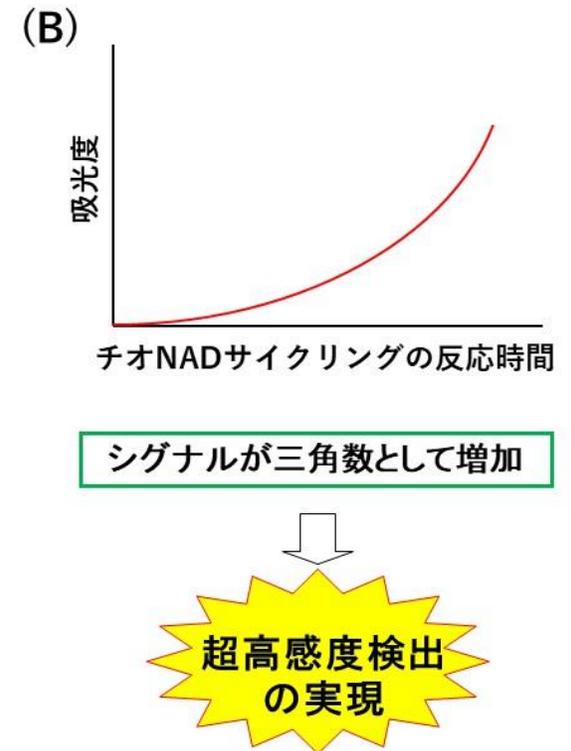
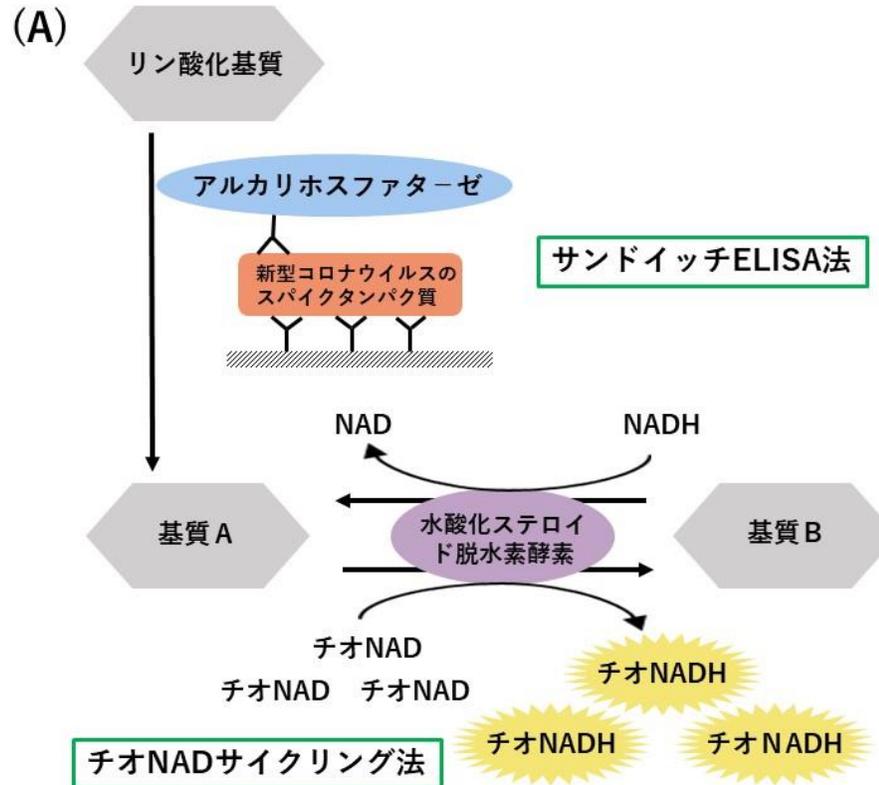
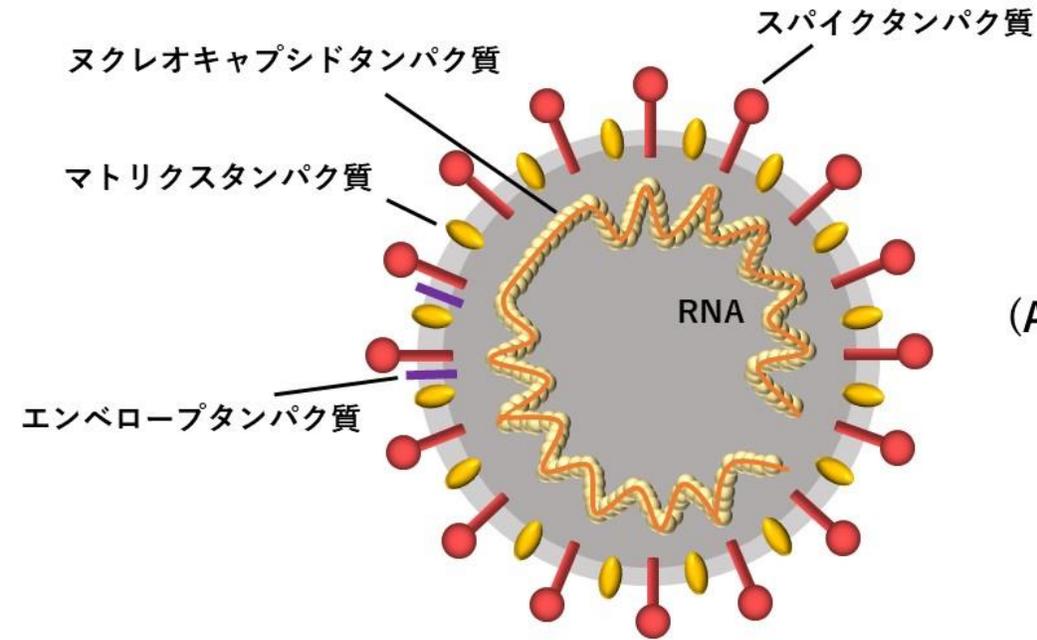


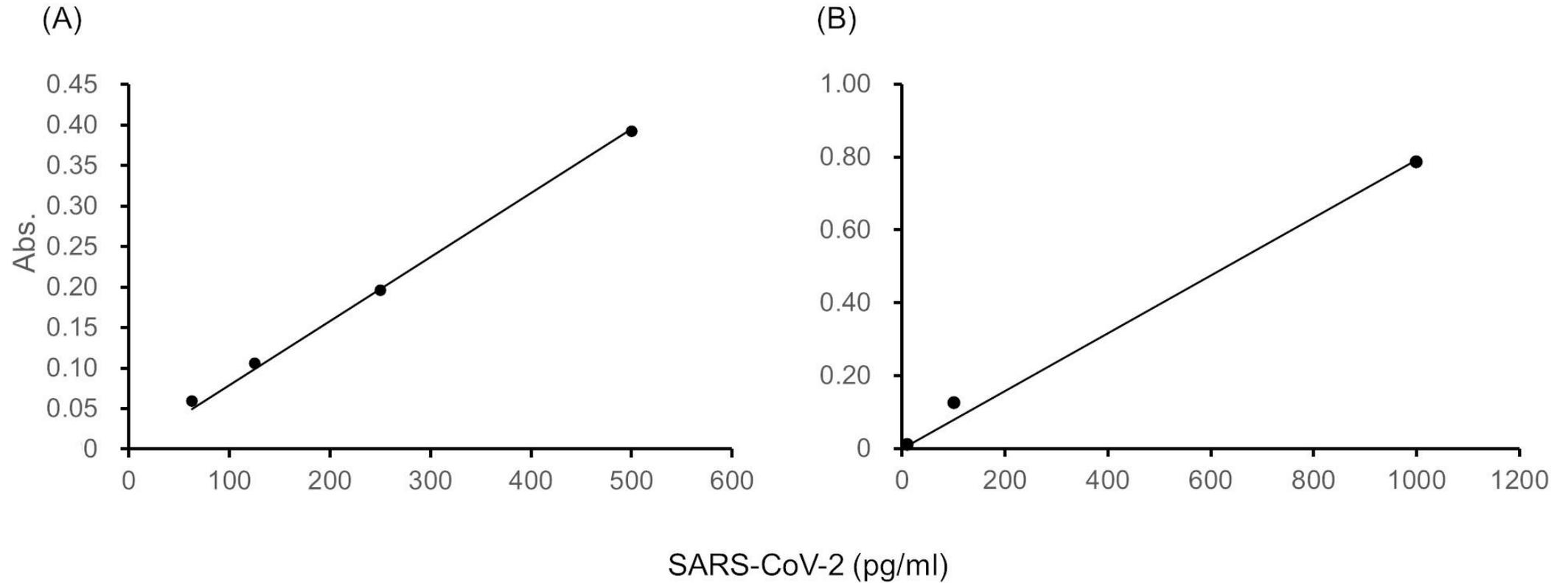
Communication

Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2

Yuta Kyosei ¹, Mayuri Namba ¹, Sou Yamura ¹, Rikiya Takeuchi ² , Noriko Aoki ²,
Kazunari Nakaishi ^{3,4} , Satoshi Watabe ^{2,4} and Etsuro Ito ^{1,4,5,*} 

スパイクタンパク質を超高感度で測定することに成功！
 スパイクタンパク質はSARS-CoV-2に特異的。





SARS-CoV-2のスパイクタンパク質を 2.3×10^{-18} moles/assayで検出できた。

SARS-CoV-2のスパイクタンパク質を 2.3×10^{-18} moles/assayで検出できた。さてこの測定感度がどれだけ超高感度かというのと次のように考えることができる。

1つのウイルス上には約25個のスパイクタンパク質が存在すると報告されている。したがって、われわれの方法によってスパイクタンパク質を検出することは、すなわちウイルス自体を 10^{-20} moles /assayで、言い換えると、ウイルスのRNAを約 10^4 copies/assayで検出できるというわけである。

この感度はPCR検査の感度に肉薄している。実際に行われているPCR検査において、鼻咽頭ぬぐい検体では 10^5 copies/assayのウイルスRNA量が無いと検出は難しいと言われているからである。すなわち、われわれの方法であれば、PCR法の欠点を克服し、かつCOVID-19に特異的な検査方法を確立できる可能性を拓いたことになる。

その他の関連論文

UVB照射によって不活性化したウイルスも測定可能

1332

Biol. Pharm. Bull. 44, 1332–1336 (2021)

Vol. 44, No. 9

Regular Article

Improved Detection Sensitivity of an Antigen Test for SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins with Thio-NAD Cycling

Yuta Kyosei,^a Mayuri Namba,^a Sou Yamura,^a Satoshi Watabe,^b Teruki Yoshimura,^c
Tadahiro Sasaki,^d Tatsuo Shioda,^d and Etsuro Ito^{*a,b,e}

Take-home message

抗原検査は早い・安い・簡単だけど
精度が低いとか感度が悪いとかは言わせない！