

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Immunochromatography and chemiluminescent enzyme immunoassay for COVID 19 diagnosis
別タイトル	COVID 19診断のための免疫クロマトグラフィー法および化学発光酵素免疫測定法
作成者（著者）	石井, 利明
公開者	東邦大学
発行日	2021.11.25
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：瓜田純久 / タイトル：Immunochromatography and chemiluminescent enzyme immunoassay for COVID 19 diagnosis / 著者：Toshiaki Ishii, Masakazu Sasaki, Kageto Yamada, Daiki Kato, Hiroyoshi Osuka, Kotaro Aoki, Toshisuke Morita, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Journal of Infection and Chemotherapy / 巻号・発行年等：27(6): 915 918, 2021 / 本文ファイル：出版者版
著者版フラグ	none
報告番号	32661乙第2951号
学位記番号	乙第2790号
学位授与年月日	2021.11.25
学位授与機関	東邦大学
DOI	info:doi/10.1016/j.jiac.2021.02.025
その他資源識別子	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X21000659?via%3Dihub
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD64554033

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

石井利明より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2790 号

学位申請者 : いし 井 利 明
石 井 利 明

学位論文 : Immunochromatography and chemiluminescent enzyme
immunoassay for COVID-19 diagnosis

(COVID-19 診断のための免疫クロマトグラフィー法および
化学発光酵素免疫測定法)

著 者 : Toshiaki Ishii, Masakazu Sasaki, Kageto Yamada, Daiki Kato, Hiroyoshi
Osuka, Kotaro Aoki, Toshisuke Morita, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : Journal of Infection and Chemotherapy 27(6): 915-918, 2021

論文内容の要旨 :

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) によるコロナウイルス感染症 2019 (COVID-19) は、今日、世界が直面している深刻な問題である。COVID-19 の診断は主に患者の鼻咽頭スワブと唾液を使用して定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によるウイルスゲノム RNA を検出している。RT-PCR は高い感度と特異度を有するが特別な装置と結果の判読力が要求されるため、すべての臨床検査室で実施することは困難である。

今回、ウイルスヌクレオカプシド抗原を検出するイムノクロマトグラフィー迅速抗原検出キットエスブライン®SARS-CoV-2 (エスブライン; 富士レビオ株式会社) および化学発光酵素免疫測定法による定量的抗原検出試薬ルミパルス®SARS-CoV-2 (ルミパルス; 同社) が新たに開発された。ルミパルスは当初、対象が鼻咽頭スワブのみとされていたため唾液検体に関する情報が少ない。本研究は、鼻咽頭スワブと唾液検体を使用してエスブラインとルミパルスの有用性について RT-PCR を対象として評価した。

検体は 2020 年 8 月から 9 月に東邦大学医療センター大森病院を受診した 33 件の COVID-19 患者と 564 件の非感染者を使用した。鼻咽頭スワブは RT-PCR 陽性 24 検体を含む 486 件、唾液検体は RT-PCR 陽性 9 検体を含む 136 件で、ルミパルスと RT-PCR はすべての検体で測定し、エスブラインはランダムに選択した 271 個の鼻咽頭スワブと 93 件の唾液検体を測定した。すべての検体は凍結保存しない状態でメーカー推奨手順に従い実施した。エスブラインは唾液検体が不適とされているが本研究ではル

ミパルスと比較するために対象とした。唾液検体は12,000rpm、2分間遠心分離後、上清をエスプラインとルミパルスに使用した。エスプラインは30分後にラインの有無で判定し、ルミパルスはG1200システムを使用し、測定時間に35分要した。ルミパルスはメーカー提示の評価に従い、陽性（鼻咽頭 >10 pg/mL；唾液 >4.0 pg/mL）、判定保留（鼻咽頭 1.0-10 pg/mL；唾液 0.67-4.0 pg/mL）、陰性（鼻咽頭 <1.0 pg/mL；唾液 <0.67 pg/mL）判定した。RT-PCR で使用するウイルス RNA は、ルミパルスで使用する溶液から抽出、判定は35未満の閾値サイクル（Ct）値は陽性、35以上は検出限界未満とした。

鼻咽頭スワブでのエスプラインは、一致率および感度（10/11 陽性）、特異度（260/260 陰性、100%）で共に高く、偽陰性は、RT-PCR のCt 値が33.7であった。一方、唾液検体は感度が低く（3/9 陽性）、検体として不適であることを示唆した。エスプラインの感度と特異度は、検体処理での遠心分離に関連している可能性があった。既報では、発症から1週間または9日以内の高いウイルス量で高い感度が得られたとされており、エスプラインの感度は検体採取のタイミングに依存することが考えられる。本研究は陽性検体が少数ながら鼻咽頭スワブでのエスプラインはCOVID-19 診断に充分満足できる性能であった。また、特別な装置を必要としないため検査の所要時間が短く、判定が容易なため、ポイントオブケアとして有用である。

鼻咽頭スワブでのルミパルスの感度と特異度は、それぞれ22/24（陰性2件）と460/462（99.6%、陽性1件、判定保留1件）であった。偽陽性判定は抗原27.3pg/mL、RT-PCR のLOD 未満であったが、同日鼻咽頭スワブのRT-PCR は陽性判定であり、4日前に抗原20.9pg/mL（RT-PCR Ct 値33.7）でCOVID-19 と診断されていた。従って本症例はRT-PCR の偽陰性と考察した。これは抗原検査溶液からのRNA抽出が原因と推察される。1件の判定保留は抗原量（1.0pg/mL）でRT-PCR 陰性、2件の偽陰性はRT-PCR でCt 値が高かった（33.4、34.1）。したがって、偽陰性はウイルス量が少ないことが原因と考えられた。

唾液検体のルミパルスは、エスプラインより高感度であり（8/9、判定保留1件）、特異度は123/127（96.9%、陽性1件、判定保留3件）、1件の偽陽性は4.54pg/mL と少ない抗原量であった。4件の判定保留は1件が抗原量1.04pg/mL、Ct 値32.6で陽性、3件の抗原量が0.71、0.86、および3.39pg/mL でRT-PCR が陰性であった。

これらはルミパルスが鼻咽頭綿棒および唾液検体に対して高い感度と特異度を有し、また、SARS-CoV-2 患者の鼻咽頭スワブでRT-PCR 陰性、ルミパルス陽性判定症例からも、ルミパルスがRT-PCR と同等の性能を有していることが示唆された。ルミパルスの鼻咽頭スワブを使用した感度と特異度に関して既報では55.2%-91.7%、97.3%-99.6%とされ、結果のばらつきは検体採取のタイミングに依存していた。しかし、本研究の検体は発症後7日以内を使用している点で大きく異なる。また、基礎疾患の有無と検査結果に関連は認められなかった。

COVID-19 患者におけるSARS-CoV-2 抗原値の分布は4.5から>5000pg/mL（幾何平均は808.9pg/mL）であった。抗原量が少ない陽性結果または判定保留の場合、RT-PCR を追加検査し、患者の臨床症状を観察することが重要である。

本研究の陽性件数は少なく、更なるエスプラインおよびルミパルスの評価が必要である。エスプラインは唾液検体の使用は不適であるが、ポイントオブケアテストに有効である。ルミパルスは専用分析装置と試薬が必要であるがRT-PCR と同等の性能を有し、手順が簡単で処理能力が高いため日常診断に有用である。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2790 号	氏 名	石 井 利 明
学位審査担当者	主 査	瓜 田 純 久
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	渡 邊 善 則
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	伊 豫 田 明
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>世界の医療従事者が最前線で戦った新型コロナウイルス感染症であるが、日常生活や通常診療が大きく制限される状況が続いている。当初は検査体制が十分でなかったため、37.5℃以上が 4 日間持続しなければ、検査を受けることができなかった。そのため診断が遅れ、大きな感染拡大を招いた。日本では 170 万人以上が感染し、死者は 1 万 7 千人以上に膨れ上がった。そのような背景から、迅速に診断できるツールが切望されていた。本論文はそのような背景から開発されたウイルスヌクレオカプシド抗原を検出するイムノクロマトグラフィ―迅速抗原検出キットエスプライン®SARS-CoV-2 (エスプライン) および化学発光酵素免疫測定法による定量的抗原検出試薬ルミパルス®SARS-CoV-2 (ルミパルス) の有用性について PCR を基準として評価したものである。COVID-19 患者、非感染者から採取した検体を使用し、鼻咽頭スワブ、唾液検体を用いて、ルミパルスと PCR の検査、エスプラインで定性検査を実施。Table1 (a) に示すように、鼻咽頭スワブでのエスプラインは感度、特異度共に高く、COVID-19 診断に実用的であったが、唾液検体は感度が低値であり、スクリーニング検査としては不適と思われる。Table1 (b) に示すように、ルミパルスは鼻咽頭検体および唾液検体ともに高い感度と特異度を有し、PCR と同等の性能を有していることが示唆された。Table2 (a) にあるように、COVID-19 患者における SARS-CoV-2 抗原値の分布は広く、抗原量が少ない症例では PCR を追加することが重要である。以上から抗原定量検査ルミパルスは鼻咽頭および唾液検体ともに高い感度特異度を有し、COVID-19 スクリーニング検査として有用と思われる。一方、抗原定性検査エスプラインは鼻咽頭検体では感度特異度は良好であったが、唾液検体では著しく感度が低下しており、唾液検体での実施は不适当と思われる。世界の医療現場が熱望していた迅速抗原検査、抗原定量検査を実用化するために必要な診断能について、詳細に検討した貴重な報告である。学位審査会では活発な議論が展開された。検体でのカットオフ値の違いの意義についての質問では検体におけるウイルス濃度の違いによること、唾液検体の保存方法によってほとんど影響はないことが明らかとなった。偽陰性の判定基準の妥当性については、明らかに抗原の存在を示す判定基準もあり、見直すべきとの結論となった。PCR の Ct 値を 34 で打ち切ることにについては、偽陽性を減らすためと説明があった。スワブの違いによる影響については、スワブから検査薬へのリリースの違いがあることが示された。唾液中のアミラーゼによる影響については、これまで文献的報告もなく、今後の検討課題となった。下痢患者については、糞便中へのウイルス排泄があるため便検体が望ましいが、検査法が確立されていないのが現状であった。申請者はこれまでの報告や経験から、質問に的確に答え、レベルの高い討論となった。審査委員は研究論文および質疑応答の内容から、審査委員全員一致で本論文は学位に相応しいと結論し、学位審査会を終了した。</p>		