

Virus inspection about Covid-19 and Antibodies

How it works on inside of the body.

諸検査の特性と分子生物学的オピニオン

Hiroshi Fujita (D.D.S,Ph.D)

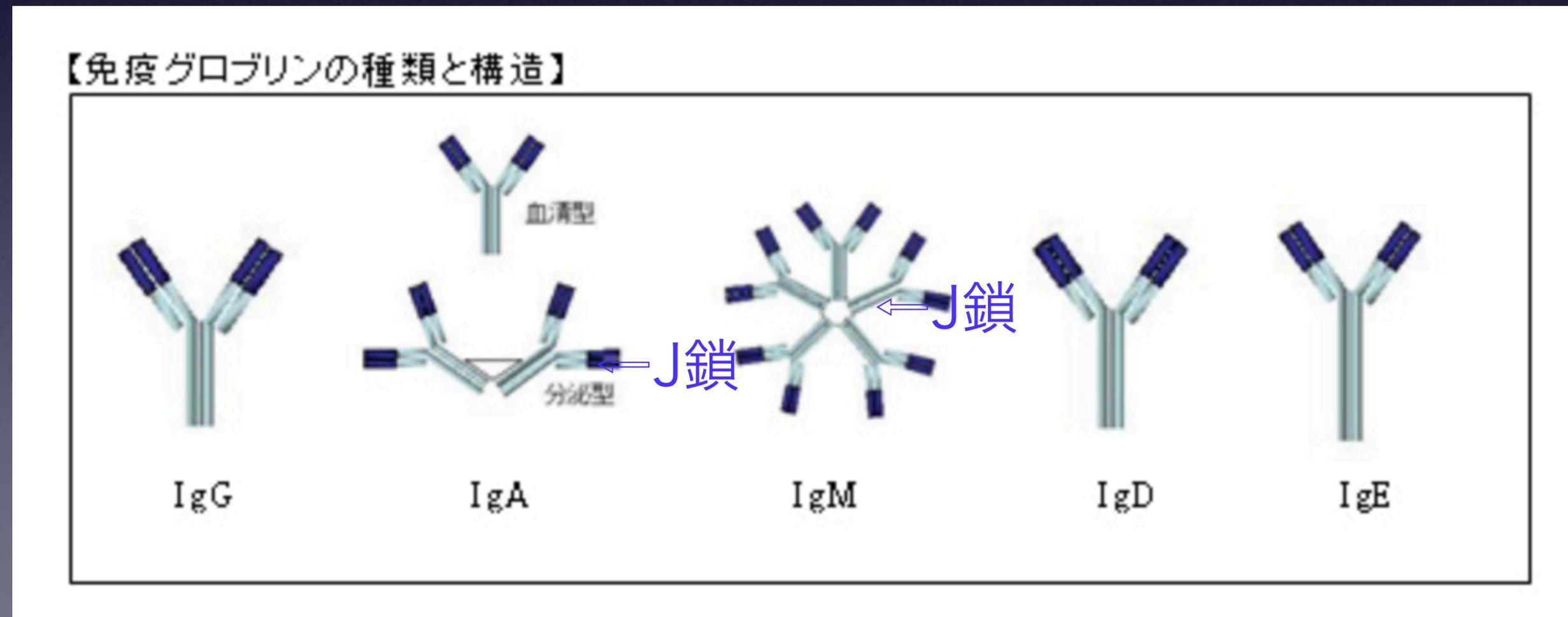
藤田 裕 歯学博士、口腔外科学分野専攻

日本大学兼任講師

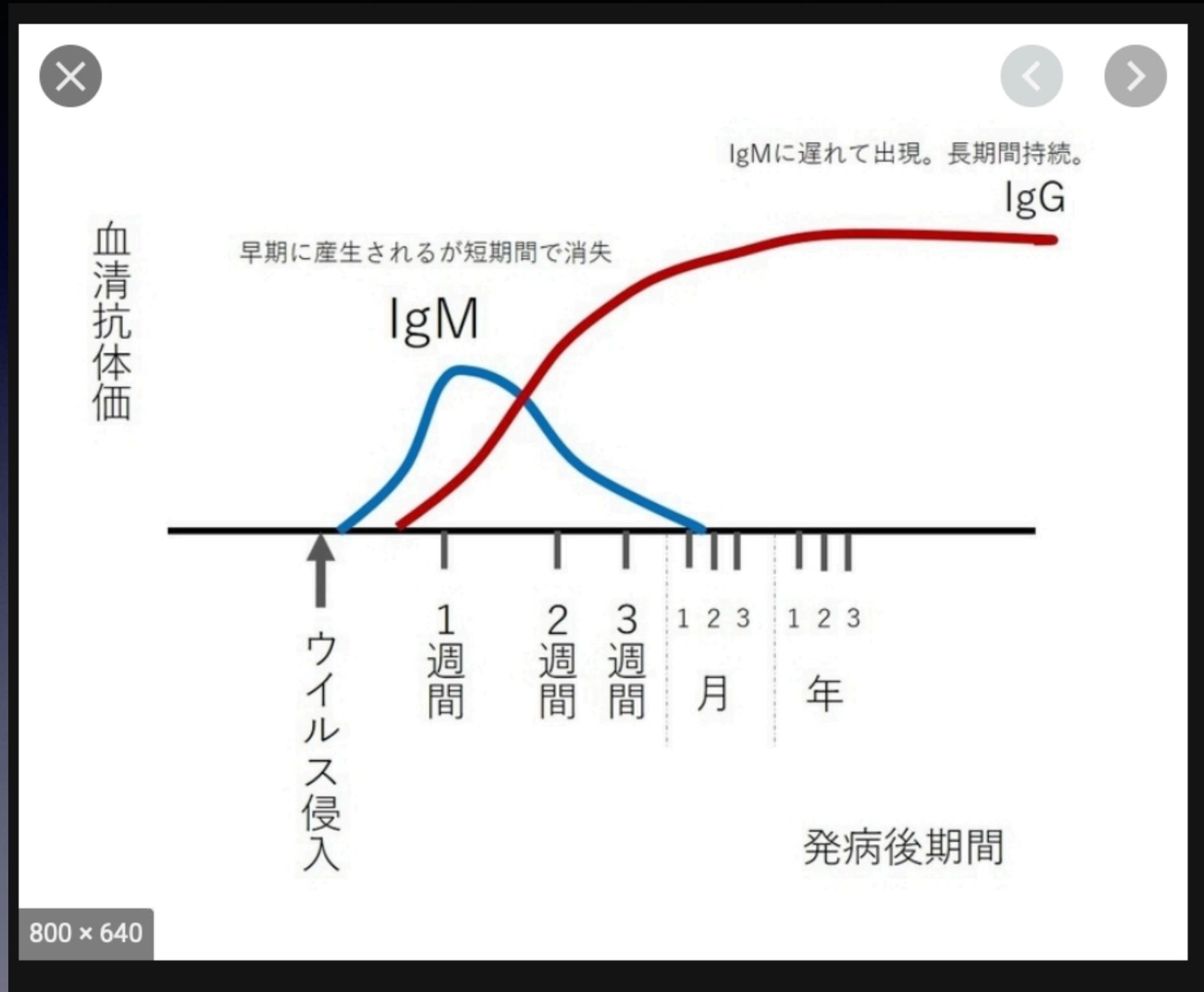
IgMとIgGは何が違うのか？

IgMは5量体、IgGは1量体抗体。唾液、鼻腔粘液にはIgA,2量体
一つあたりの分子量はタンパク分子量は、その高い遺伝子相同性から
Immunoglobulin superfamily (IgSF)間にはほぼ同じであるから、5量体は
1量体の大体5倍の分子量と考えよう！また体内の7割から8割はIgG
であり抗体免疫（液性免疫）の主役を司る。

（J鎖の”謎”について”おまけ6”で解説、結構面白いですよ！）



IgMは感染**極めて**初期に発動しその後情報提示をうけIgG抗体価が上がる。



免疫クロマト法 (ICT)仕組み (いわゆる抗体検査)

クロマト法とは荒さの異なるふるい (フィルター) にかけて

分子量の異なるタンパク質を識別する方法でかつ

そこに検体のターゲットを認識する抗体を仕込んでおいて

よりターゲットの捕捉を確実にする方法が

免疫クロマト法(イムノクロマト法)

新型コロナの抗体検査の場合は

抗IgM抗体と抗IgG抗体が該当

この検査の特性については”おまけ3

”で解説！

果たして抗体検査の評価をするのに
感度、特異度を評価するのがどれだけ意味があるのか？
コントロールとしてPCRと比べても、、、

参考

CRESCO 感度、再現率 recall

- 「問題あり」を見逃さない割合 ※全部を「陽性」と言えば 100%になる

	疾患あり	疾患なし
陽性	真陽性	偽陽性
陰性	偽陰性	真陰性

検出できた数
真陽性

真陽性 + 偽陰性

「疾患あり」の数

All Rights Reserved. Copyright © CRESCO LTD.

CRESCO 特異度 specificity

- 「問題なし」を捨てない(問題ありとしない)割合

	疾患あり	疾患なし
陽性	真陽性	偽陽性
陰性	偽陰性	真陰性

「陰性」で正答の数
真陰性

偽陽性 + 真陰性

「疾患なし」の数

All Rights Reserved. Copyright © CRESCO LTD.

FDA 米国食品薬品管理局 抗体検査非認証リスト

FDA'S FULL LIST OF UNVETTED COVID-19 ANTIBODY TESTS:

Artron BioResearch Inc./ Artron Laboratories Inc. COVID-19 IgM/IgG Antibody Test*

BestNovo (Jiangsu) Medical Technology Co., Ltd. BestNovo COVID-19 IgM/IgG Antibody Rapid Test Kit

Biobase Biodustry (Shandong) Co., Ltd. SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Test Kit (Colloidal Gold)

BioMedomics, Inc. COVID-19 IgM-IgG rapid test*

Bioscience(Chongqing) Diagnostic Technology Co., Ltd. Qualitative Diagnostic Kit for Novel Coronavirus (2019-nCoV) IgM Antibody

Bioscience(Chongqing) Diagnostic Technology Co., Ltd. Qualitative Diagnostic Kit for Novel Coronavirus (2019-nCoV) IgG Antibody

Bioscience(Tianjin) Diagnostic Technology Co., Ltd. Qualitative Diagnostic Kit for Novel Coronavirus(2019-nCoV) IgM Antibody

Bioscience(Tianjin) Diagnostic Technology Co., Ltd. Qualitative Diagnostic Kit for Novel Coronavirus(2019-nCoV) IgG Antibody

Boson Biotech Ltd. Co (Distributed by Pure Genetic Medical Ltd.) Rapid 2019-nCoV IgG/IgM Combo Test Card

Changchun Wancheng Bio-Electron Co., Ltd. COVID-19 IgG/IgM ANTIBODY RAPID TEST KIT (Colloidal gold immunochromatography)

Diazyme Laboratories, Inc. Diazyme SARS-CoV-2 Antibody Rapid Test*

Genlantis Diagnostics, Inc. CovidQuik Coronavirus (COVID-19) IgM/IgG Antibody Test*

Hangzhou Clongene Biotech Co., Ltd. COMBRA COVID-19 IgM/IgG Rapid Test Cassette

Hangzhou Testsea Biotechnology Co., Ltd. One Step SARS-CoV2(COVID-19) IgG/IgM Test*

Hunan RunKun Pharmaceutical Co., Ltd. SARS-CoV-2 IgM/IgG Test Kit (Colloidal Gold)*

Jiangsu Eubo Biotechnology Co., Ltd. EUBO COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette (WB/S/P)

Lifeassay Test-it COVID-19 IgM/IgG Lateral Flow

FDAは中国製品を標的にほぼ未認証 アメリカの単なるPolicy?残念ながらFDAもかなり信用できない。

ICT法の欠点と組み合わせるべき新たな手法
IgMの感度を感染後しばらくして評価しても感染初期

の検出能は評価できません。感染初期の
検出できない期間をWindow periodと言う。

またIgGが陽性でも感染しない保証はない。
(それが何故かは話が長くなります) (おまけ4)

理想は、抗原検査や初期の検体を増幅できる
PCR(Polymerase Chain Reaction)やCT
など複合し診断すべき。

現在は、増幅検査でさらにWindowperiodの短い
NAT(Nucleic acid Amplification,核酸増幅検査)

おまけ7にて解説

が導入されより初期感染からの捕捉が可能になり

武漢においてはほぼ全市民980万人にNATを

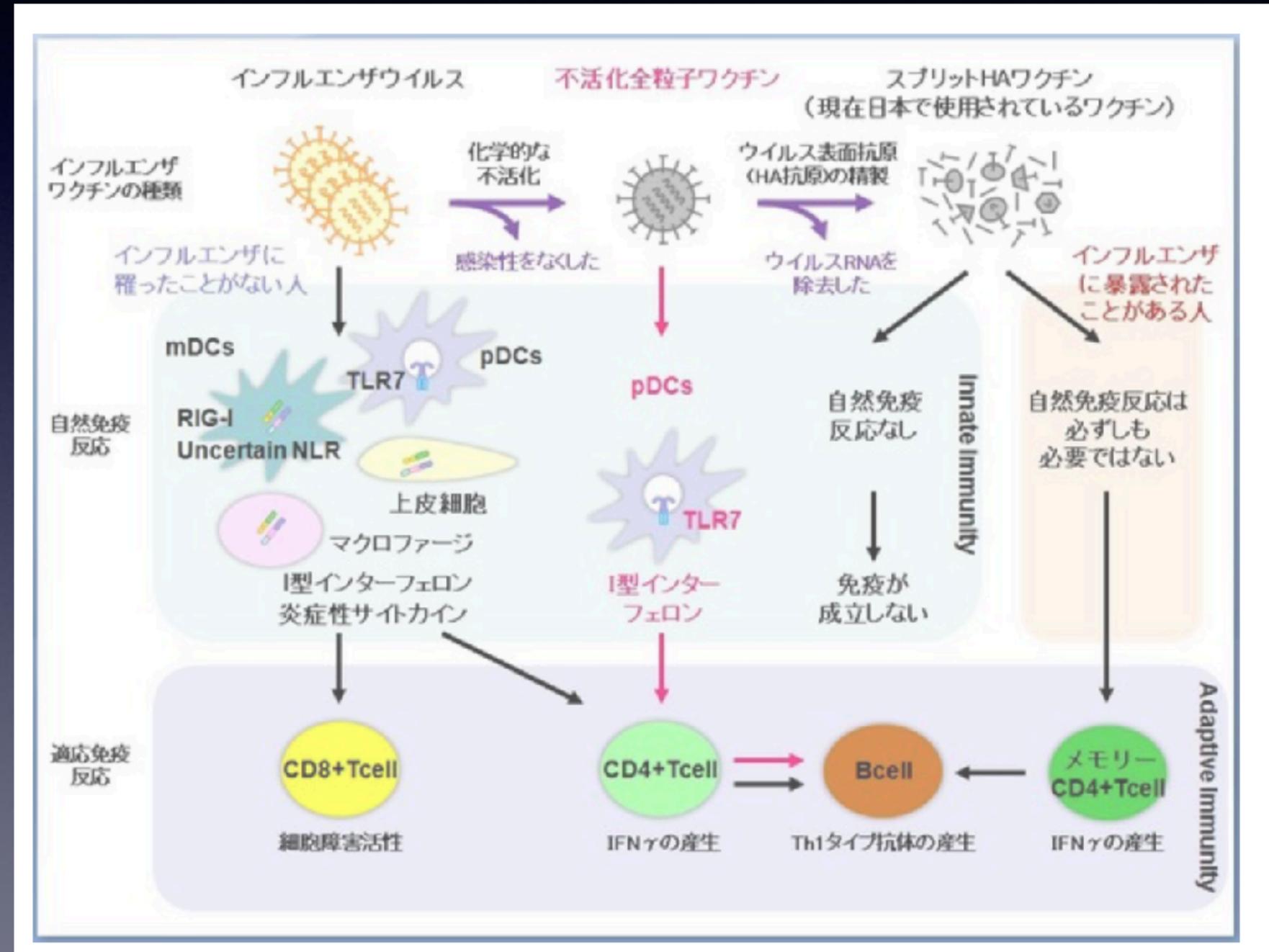
行う大きな試みが行われたばかり！

Covid-19治療用抗体の最近のデベロップ
San FranciscoのDr.Jacob Glanvilleのグループ
Covid19の遺伝子領域で変異しない領域でかつ効果的に不活化できる
部位を発見 複数の抗体作成 **つまりウイルスの変異に強い！**
レトロウイルスの変異しない部位がある事は
以前からわかっている！何故不変なのかは、
”神の領域”しかしながら理由があります。
何故かは、長くなるので割愛します。
なので”おまけ4”で解説！
youtubeリンク付き！



一般的なワクチンの仕組み

不活性全粒子、スプリット抗原ワクチン、遺伝子ベクターを使用したワクチンなどの種類があるがどれも長所欠点があり一概にどれが良いとは言えない。



アデノウイルスをベクターに遺伝子組み替えしす武漢型スパイク糖タンパクの
みCovid19を組み替え作成した斬新なワクチン

THE LANCET May 2020

Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial

Feng-Cai Zhu, Yu-Hua Li*, Xu-Hua Guan, Li-Hua Hou, Wen-Juan Wang, Jing-Xin Li, Shi-Po Wu, Bu-Sen Wang, Zhao Wang, Lei Wang, Si-Yue Jia, Hu-Dachuan Jiang, Ling Wang, Tao Jiang, Yi Hu, Jin-Bo Gou, Sha-Bei Xu, Jun-Jie Xu, Xue-Wen Wang, Wei Wang, Wei Chen*

Summary

Background A vaccine to protect against COVID-19 is urgently needed. We aimed to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 (Ad5) vectored COVID-19 vaccine expressing the spike glycoprotein of a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) strain.

Methods We did a dose-escalation, single-centre, open-label, non-randomised, phase 1 trial of an Ad5 vectored

Interpretation The Ad5 vectored COVID-19 vaccine is tolerable and immunogenic at 28 days post-vaccination. Humoral responses against SARS-CoV-2 peaked at day 28 post-vaccination in healthy adults, and rapid specific T-cell responses were noted from day 14 post-vaccination. Our findings suggest that the Ad5 vectored COVID-19 vaccine warrants further investigation.

2020年5月末現在、世界で開発中のワクチンは、100にのぼるうち、以ののものが、5-7月中旬にヒトの治験に移行する

1. 米国Moderna社 mRNAベクター型ワクチン

2. 中国 北京生物技研AD5ベクター-遺伝子組み替えCovid19ワクチン
(カナダCansino社ベクター使用)

3. 米国Inviopharma社DNA組み替えワクチン

4. 中国Sinovac社 不活性型ワクチン

5. 英国OxfordチンパンジーAd5ベクター組み替えワクチン

6. ドイツBioNTech社 mRNAベクター型ワクチン

参考：日本TakaraBio（宝酒造の子会社）不活性型ワクチン

開発中ヒト治験の前段階まで到達している。現在100余種類の抗原で、開発を急いでいる。

武漢の一つの病院で行い18歳から60歳108人

(現病歴ある人7人)

36人ずつグループ分け

Low Middle High doseにわけ

28日間

TCellの指標にIFN γ

抗体価(抗RDB抗原と抗スパイクタンパク抗原) 4倍値になった人の割合調査

RDB:Receptor Binding Domein : 受容体結合ドメイン

スパイクタンパク : コロナ状

接種後28日後の抗体獲得は90%以上とかなり良い成績！
 一方接種後7日以内の不快症状は、かぜ様症状、頭痛、関節痛
 吐き気、食欲不振など全体の80%の方に出現している。

	Low dose group (n=36)	Middle dose group (n=36)	High dose group (n=36)	Total (N=108)
All adverse reactions within 0-7 days				
Any	30 (83%)	30 (83%)	27 (75%)	87 (81%)
Grade 3	2 (6%)	2 (6%)	6 (17%)	10 (9%)
Injection site adverse reactions within 0-7 days				
Pain	17 (47%)	20 (56%)	21 (58%)	58 (54%)
Induration	2 (6%)	1 (3%)	1 (3%)	4 (4%)
Redness	2 (6%)	1 (3%)	1 (3%)	4 (4%)
Swelling	4 (11%)	4 (11%)	0	8 (7%)
Itch	2 (6%)	3 (8%)	0	5 (5%)
Muscular weakness	0	0	1 (3%)	1 (1%)
Systemic adverse reactions within 0-7 days				
Fever	15 (42%)	15 (42%)	20 (56%)	50 (46%)
Grade 3 fever	2 (6%)	2 (6%)	5 (14%)	9 (8%)
Headache	14 (39%)	11 (31%)	17 (47%)	42 (39%)
Fatigue	17 (47%)	14 (39%)	16 (44%)	47 (44%)
Grade 3 fatigue	0	0	2 (6%)	2 (2%)
Vomiting	1 (3%)	0	1 (3%)	2 (2%)
Diarrhoea	3 (8%)	4 (11%)	5 (14%)	12 (11%)
Muscle pain	7 (19%)	3 (8%)	8 (22%)	18 (17%)
Grade 3 muscle pain	0	0	1 (3%)	1 (1%)
Joint pain	2 (6%)	2 (6%)	5 (14%)	9 (8%)
Grade 3 joint pain	0	0	1 (3%)	1 (1%)
Throat pain	1 (3%)	3 (8%)	4 (11%)	8 (7%)
Cough	1 (3%)	2 (6%)	3 (8%)	6 (6%)
Nausea	2 (6%)	1 (3%)	3 (8%)	6 (6%)
Functional GI disorder	1 (3%)	0	0	1 (1%)
Dyspnoea	0	0	2 (6%)	2 (2%)
Grade 3 dyspnoea	0	0	1 (3%)	1 (1%)
Appetite impaired	6 (17%)	5 (14%)	6 (17%)	17 (16%)
Dizziness	1 (3%)	0	1 (3%)	2 (2%)
Mucosal abnormality	0	0	1 (3%)	1 (1%)
Pruritus	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (3%)
Overall adverse events within 0-28 days				
Any	31 (86%)	30 (83%)	27 (75%)	88 (81%)
Grade 3	2 (6%)	2 (6%)	6 (17%)	10 (9%)

Data are n (%). Any refers to all the participants with any grade adverse reactions or events. Adverse reactions and events were graded according to the scale issued by the China State Food and Drug Administration. Grade 3=severe (ie, prevented activity). GI=gastrointestinal.

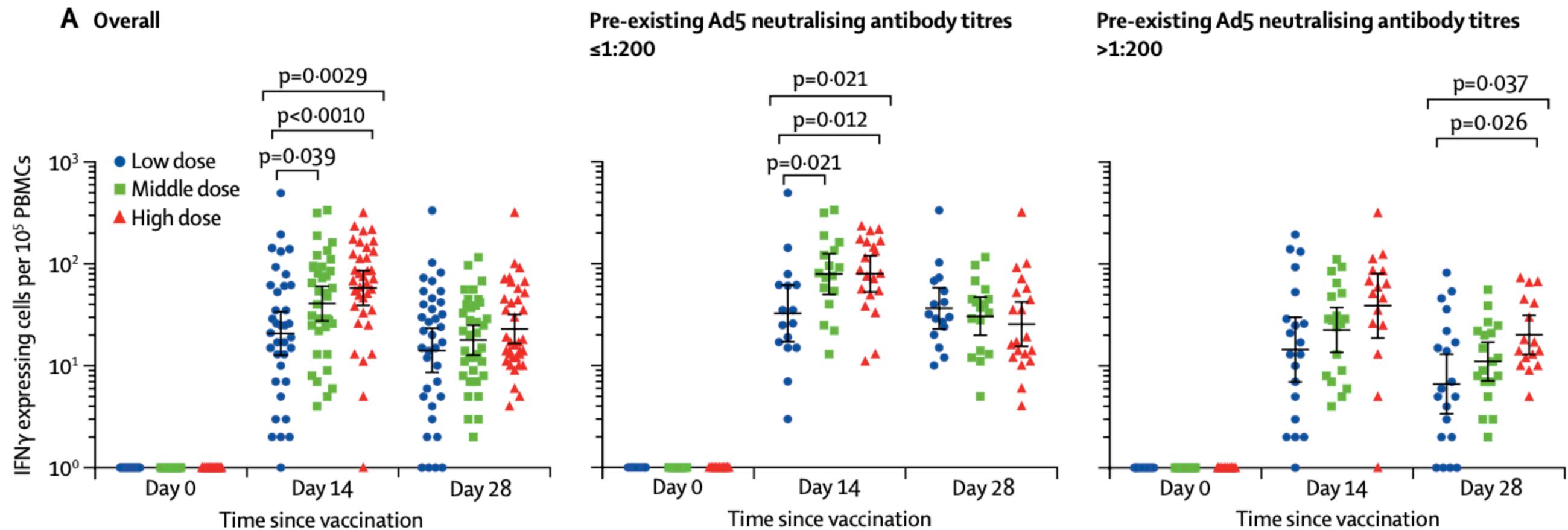
Table 2: Adverse reactions within 7 days and overall adverse events within 28 days after vaccination

	Day 14				Day 28			
	Low dose group (n=36)	Middle dose group (n=36)	High dose group (n=36)	p value	Low dose group (n=36)	Middle dose group (n=36)	High dose group (n=36)	p value
ELISA antibodies to the receptor binding domain								
GMT	76.5 (44.3-132.0)	91.2 (55.9-148.7)	132.6 (80.7-218.0)	0.29	615.8 (405.4-935.5)	806.0 (528.2-1229.9)	1445.8 (935.5-2234.5)	0.016
≥4-fold increase	16 (44%)	18 (50%)	22 (61%)	0.35	35 (97%)	34 (94%)	36 (100%)	0.77
Neutralising antibodies to live SARS-CoV-2								
GMT	8.2 (5.8-11.5)	9.6 (6.6-14.1)	12.7 (8.5-19.0)	0.24	14.5 (9.6-21.8)	16.2 (10.4-25.2)	34.0 (22.6-50.1)	0.0082
≥4-fold increase	10 (28%)	11 (31%)	15 (42%)	0.42	18 (50%)	18 (50%)	27 (75%)	0.046

Data are mean (95% CI) or n (%). The p values are the result of comparison across the three dose groups. If the difference was significant across the three groups, the differences between groups were estimated with 95% CIs. SARS-CoV-2=severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. GMT=geometric mean titre.

Table 3: Specific antibody responses to the receptor binding domain, and neutralising antibodies to live SARS-CoV-2

Tcell由来のIFN γ の上昇も顕著である。



結論

ICTは**感染初期を見逃しやすい**一方その検体の感染ステージは、分かりやすく有用であり、呼吸器Xrayやパルスオキシメータ、PCRや発展著しいNATなどの増幅法と共に複合して使えば診断の確度が上がるでしょう。

また抗体が陽性でも、必ずしも罹患しないとは限らない。理由は”おまけ2”で解説！

現在開発中のワクチンは、ウイルスの変異などの根本的な解決には程遠いものの、一方で、治療用の抗体開発は変異しない領域でかつ不活性化できる部位の発見でウイルスの変異にも対応できるものが期待できると思われる。

おまけ 1 ♪各種リンク♪

FDA Full list of unvetted (FDA未承認リスト)

<https://abc7chicago.com/covid-19-antibody-tests-faulty-test-fda-list-of/6202583/>

Dr.Jacob Granville 治療用免疫抗体の開発

<https://www.youtube.com/watch?v=CDBVwqNOBXY&feature=youtu.be>

THE LANCET アデノウイルス遺伝子を用いた組み替えベクターワクチン

THE LANCET(United Kingdom)は、世界で最も高いIFを誇る5大医学誌の一つ

なんと3月にすでに武漢で始めたHumantrial 北京の研究グループ

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)31208-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31208-3/fulltext)

おまけ2

Q IgMやIgG抗体が陽性でも、、、肺炎起こす可能性あるの？

A.免疫とウイルスのバランスの問題と、IgM抗体の反応なのかIgG抗体による反応なのかで意味は異なるでしょう。

例えば感染初期でIgM抗体が抗原認識したところでターゲット臓器にそもそもIgMは少ないわけで（Mは血液リンパ系の抗体）役に立たないだろうと思われれます。まして抗体の絶対数も少なく、劇的なコピーをして増えるウイルスには対等に戦えません。無論、IgG頼みになりますが、これも相手の絶対数が優っていたり協調作動する細胞性免疫の力が劣っていれば（胸腺由来※Tcell.などから見れば、**それが衰える加齢**が最も大きな原因）例えIgGが効果的に抗原認識したとしても、増悪の方向に向かいます。（現にcovid19感染死者の血液からもIgG抗体は陽性の方がいる。）

※胸腺は、13歳くらいまでTcell作る、その後分泌が急激に止まり生涯に亘り13歳までに作られた免疫細胞を使う。が加齢と共にその数は減少し、その減少は65歳を境に顕著になる。**しかし一定の割合で稀に20歳ごろまで分泌が続く人もいてその個体は相対的に細胞性免疫が生涯に亘り比較的強いということになる。**

おまけ3 ICT イムノクロマト法

この検査法(ICT)は、その検査の特性上概してどのメーカーも感度が高いんですが、問題はそこではなく、PCRやNATとは大きく異なり少ない検体量を増幅してすることが出来ない点であります。感染初期に抗原認識するであろう、IgMは抗体が五量体ですから、分子量は大きいですが、体の中での比率が圧倒的に少ないのでそれを検出するのが、**どうしても遅くなりがちという点です。**（ある程度増えてからでないとはDetect出来ない、windowperiodが長い、感染後約22日と言われている）苦手なわけです！

それに比し、IgGは単量体で存在していますから分子量がIgMに比べると、小さいが我々の体の中で圧倒的な数を誇るわけで、当然Detectしやすいわけです。つまりイムノクロマトアッセイ概して感度は良いもの、IgM検出の鈍さを、了解した上で使用することが肝要と思われれます。感度や特異度は、クロマトのカラムの精度（分離をかけるフィルター）と抗体のpurify(精製度)に大きく左右されます！カラムや抗体の精度が低いと疑陽性が大きくなってしまいます。またその特性上、感度云々よりも、感染初期を見つけにくいという特性に留意が必要と思われるわけです。

下記論文にヒントあります。（埼玉医科大）

http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_casereport_200414_2.pdf

おまけ 4

Q. どうしてレトロウイルスは変異しやすいのに変異しにくい領域があるのか？

A. 変異しにくい遺伝子領域は、ウイルスの活性を維持する上で重要な基幹コードであり、もし変異しようものなら、ウイルス活性がなくなり、その時点で存在が出来ないであろうから。（藤田私見）

当然その不変領域でかつ不活性化が見込める領域は世界中のデベロッパーが必死になって探している。それを見事に見抜き探し当てた Dr.Jacob のチームは、現在一歩抜きんできていると言える。

おまけ5 CIMIC社のICTのセールスポイント

<https://www.alfascientific.com/technologycenter/driven-flow-technology/>
ポンプ？シリンジか何かで検体を急激に噴射することによって非特異的反応を抑えてかつ反応のスピードを上げるシステムである。

このメーカーのキットのシステムは所謂イムノクロマトアッセイ(ICT)です。ターゲットの分子量でふるいにかけて、さらに抗IgM 抗IgG抗体が、検体のIgM,IgGを捕捉する仕組みです。理論的には、二重にふるいにかけるシステムです。ただこのメーカー、検体抗体の認識抗原がNなのかSなのかそれともいずれか片方なのか未公表のようです。知的所有権が絡んでいるのかも知れません。

下記サイト、現在の抗体検査の比較表があります。（日本語）

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/column/16/100400036/051500009/>

ICTはELISAなど比色が必要で大きな機器が要る検査に比し機器が不要で検査手順が容易である。

おまけ6 IgMの5量体におけるJ鎖(Joining Chain)の存在とその機能の謎

IgAの2量体を結ぶコンポーネントであったり、IgMの5量体にはペンタゴン状に5つのIgMが配列し中央に円形にJoining Chain(J鎖)がある。長きに亘りJ鎖がその2量体や5量体を結ぶものと考えられてきたが、栃木県鹿沼市のオオミミズからなんとJ鎖が発見され、それを見事に否定する事となり、その機能は現在も謎に包まれている。この発見をした Prof.Itaru Moro 1996(茂呂周教授)はその発見に対し歯科医では、世界で初めてメンデル賞(チェコ)を受賞した。

(Awarded The Gregor Johann Mendel Honorary Medals for Merit in the Biological Sciences Czech Academy of Sciences)

おまけ7

NAT法のPCR法に対する優位性について
NAT法の場合、リボゾームでタンパク合成を始める
mRNAを標的にしておりすでにコピーが多いものを
さらに増幅できる利点がある。そのためWindowperiodが
短い同じ増幅検査のPCRに比べてもさらに、短縮され
より初期感染においての検出が可能になっている。



Mahalo!!