

■ Original article

RT-PCR 検査と比較した SARS-CoV-2 抗原定性検査の性能評価

鶴留えりか¹、溝口美祐紀¹、日暮芳己¹、堤武也¹¹ 東京大学医学部附属病院感染制御部

Performance evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen test compared to RT-PCR test

Erika Tsurudome¹, Miyuki Mizoguchi¹, Yoshimi Higurashi¹, Takeya Tsutsumi¹¹ Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital

背景：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）病原体検出検査は感染拡大防止のために非常に重要であり、なかでも抗原定性検査は簡便で迅速な検査として積極的な活用が考慮されている。しかし感度は他の検査法に比べ低く、検査性能について理解して使用することが重要である。

目的：抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率および cycle threshold (Ct) 値を比較し、抗原定性検査の感度について検証した。

方法：当院にて RT-PCR で SARS-CoV-2 陽性が確認された症例のうち、同日もしくは前日に SARS-CoV-2 抗原定性検査が行われた 25 症例を対象とした。抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率、そして抗原定性検査の結果と RT-PCR にて測定した Ct 値を比較した。抗原定性検査陰性症例については、RT-PCR で使用した検体懸濁液を用いて抗原定性検査の再評価を行った。次に、RT-PCR にて SARS-CoV-2 陽性が確認された 10 検体のプール懸濁液より希釈系列を作成した。それぞれ抗原定性検査と RT-PCR を行い、抗原定性検査の最小検出感度を調べた。

結果：抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率は 72% (18/25 検体)、抗原定性陽性となった症例の Ct 値の平均値は 23.9cycle、抗原定性陰性となった症例の Ct 値の平均値は 31.5cycle、カットオフ値は 28.1cycle であった。抗原定性検査陰性 7 症例の RT-PCR の検体懸濁液を用いた再評価は、1 症例が陽性となり、6 症例は陰性であった。希釈系列を用いた抗原定性検査の最小検出感度は 26.0cycle であった。

結語：Ct 値から抗原定性検査の感度を推定することができた。抗原定性検査の使用により SARS-CoV-2 感染拡大防止のための早期発見が期待できる。

Key words : SARS-CoV-2、抗原定性検査、POCT

1. はじめに

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を病原体とする新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が 2020 年に感染拡大し、パンデミックが発生した。2020 年 12 月には国内で初めて変異株が報告¹⁾された。以来様々な変異株が流行したが、現在は従来型やデルタ型に比べ病原性が低いとされている²⁾オミクロン株が主流となっている。2023 年 5 月には感染状況を鑑み、本国では 2 類相当から 5 類感染症に引き下げられた³⁾。しかしながら流行は継続しているため、現在においても病原体の早期発見は感染拡大防止のために非常に重要である。ウイルス

の感染性を評価するにはウイルス分離培養が必要であるが、操作が難しいことや検査時間がかかることから一般的な検査室では通常行われていない。臨床現場において、診断のための病原体検出には核酸検出検査と抗原検査が行われている。核酸検出検査は Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を原理とし、ウイルス RNA を鋳型として逆転写反応によって合成された DNA (cDNA) を用い標的とする核酸を特異的に増幅する反応を行う。また、陽性と判定するまでに要した核酸の増幅回数である Cycle Threshold (Ct) 値からウイルス量を推定することが可能である⁴⁾。感度は抗原検査に比べて高く、確定診断だけでなく無症状の濃厚接触者への

検査にも幅広く活用されている。しかし、非感染性の状態でも陽性が持続すること⁵⁾、さらに専用の機器や熟練した技術が必要とし検査に数時間を要するといった問題点がある。一方抗原検査は、標的とする蛋白質を特異的な抗体を用いて検出する。化学発光酵素免疫測定法を原理とする定量検査と、イムノクロマトグラフィー法や ELISA 法を原理とする定性検査がある。定性検査は検査のための専用の機器や特別な訓練・技術を必要とせず、簡便・迅速なポイント・オブ・ケア・テストング (POCT) として使用可能な検査法である。感度は核酸検出検査や抗原定量検査に比べ劣る。このため抗原定性検査は、発症から 9 日目以内のみ確定診断に用いることができる⁴⁾が、有症状時の手軽で迅速な病原体検出ツールとして医療機関だけでなく自宅でのセルフチェックといった使用が考慮されている。以上より抗原定性検査の特性を活かした積極的な活用は早期診断による感染拡大防止が期待できるが、その感度について理解することが重要である。今回、抗原定性検査と RT-PCR 検査結果を比較することで抗原定性検査の検査性能について検証した。

2. 方 法

2.1 抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率と Ct 値の比較

2023 年 4 月～9 月の間に当院にて RT-PCR が行われ、Ct 値が 40cycle 以下を示し SARS-CoV-2 陽性と診断された症例のうち、同日もしくは前日に SARS-CoV-2 抗原定性検査が行われた 25 症例を対象とした。検体材料はいずれも鼻咽頭拭い液で抗原定性検査、RT-PCR のためにそれぞれ採取された。抗原定性検査はイムノクロマトグラフィー法を原理とするクイックチェイサー Flu/CoV (ミズホメディー) を使用した。添付文書に従って操作を行い⁶⁾、測定後は自動読み取り装置であるスマート QC リーダー (ミズホメディー) にて判定を行った。RT-PCR は、鼻咽頭擦過綿棒を BD ユニバーサルトランスポート検体輸送培地 (BD) に懸濁したもの (検体懸濁液) を検体とした。試薬は逆転写 DNA (cDNA) 合成反応と PCR 反応を 1 つのチューブ内で行う 1 ステップ RT-PCR を原理とした⁷⁾ Ampdirect 2019 n-CoV 検出キット (島津製作所) を使用した。添付文書に従い検体と試薬の調整を行った後、Cobas z480 (ロシュ・ダイアグノティクス社) にて測定を行った。また、抗原定性検査陽性となる Ct

値について、ROC 解析を行い、Youden Index (感度+特異度-1) が最大となる値を最適カットオフ値として算出した。さらに陰性症例に関しては、RT-PCR で使用した検体懸濁液を用いて抗原定性検査の再評価を行った。再評価に用いた検体懸濁液は、マイナス 80℃にて保存していたものを自然解凍後使用した。検体懸濁液に綿棒を 10 秒間静置したものを試料とし、以降添付文書に従った。また、発症日数と抗原定性検査の結果、Ct 値との関係性についても調査した。発症日がわかった症例のうち、抗原定性検査が確定診断として用いることのできる発症 9 日以内⁴⁾でかつ、Ct 値がカットオフ値以内であった症例を対象に、抗原定性検査の陽性検出率を調べた。

2.2 SARS-CoV-2 陽性プール懸濁液を用いた希釈系列による抗原定性検査と Ct 値の比較

RT-PCR にて SARS-CoV-2 陽性が確認された検体をランダムに 10 検体 (Ct 値 17.1cycle ~ 20.8cycle) 抽出した。マイナス 80℃にて保存していた検体懸濁液を自然解凍後、混合しプール懸濁液を作成した。プール検体から 2 ~ 2¹⁰ 倍希釈系列を作成し、それぞれ抗原定性検査と RT-PCR を行った。抗原定性検査に関しては、各希釈系列に付属綿棒を浸し、10 秒間静置後綿棒をキット付属の検体処理液に懸濁した。以降、添付文書に従って検査を行った。抗原定性検査の結果と RT-PCR で測定した Ct 値を比較した。二重測定を行い、抗原定性検査は二重測定中 1 回でも陽性となった場合を陽性とし、Ct 値は二重測定の平均値とした。

2.3 倫理的配慮

本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行っている (承認番号: 3538-(15))。

3. 結 果

3.1 抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率と Ct 値の比較

抗原定性陽性は 18 検体、陰性は 7 検体であり、抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率は 72% (18/25 検体) であった。抗原定性検査陽性となった症例の Ct 値の 23.9cycle (最小 17.6cycle、最大 34.5cycle)、中央値は 23.2cycle であった。抗原定性陰性となった症例の Ct 値の平均値は 31.5cycle (最小 21.4cycle、最大 39.3cycle)、

中央値は 32.6cycle であった。抗原定性検査について陽性および陰性症例のそれぞれの Ct 値に関して Wilcoxon 検定を行ったところ $p < 0.05$ となり、統計学的有意差が認められた (表 1、図 1)。抗原定性検査陽性となる Ct 値に関して ROC 曲線を作成したところ、AUC は 0.81、最適なカットオフ値は 28.1cycle、感度は 88.9% であった (図 2)。抗原定性検査が陰性であった 7 症例における抗原定性検査の再評価は 1 症例が陽性、6 症例は陰性

となった (表 2)。陽性となった症例 (No.1) の Ct 値は 21.4cycle、陰性となった 6 症例 (No.2 ~ No.7) の Ct 値の平均は 33.2cycle (23.7 ~ 39.3cycle)、中央値は 28.5cycle であった。発症日数と Ct 値および抗原定性検査結果の関係性を図 3 に示す。発症 9 日以内でかつ、Ct 値がカットオフ値 28.1cycle 以下であった対象は 16 症例で、抗原定性検査の陽性検出率は 87.5% (14/16 検体) であった。

表 1 RT-PCR と抗原定性の一致率および Ct 値の比較

	抗原定性	N	Ct 値 (cycle)			p*
			平均	最小	最大	
	陽性	18	23.9	17.6	34.5	< 0.05
	陰性	7	31.5	21.4	39.3	

* Wilcoxon 検定

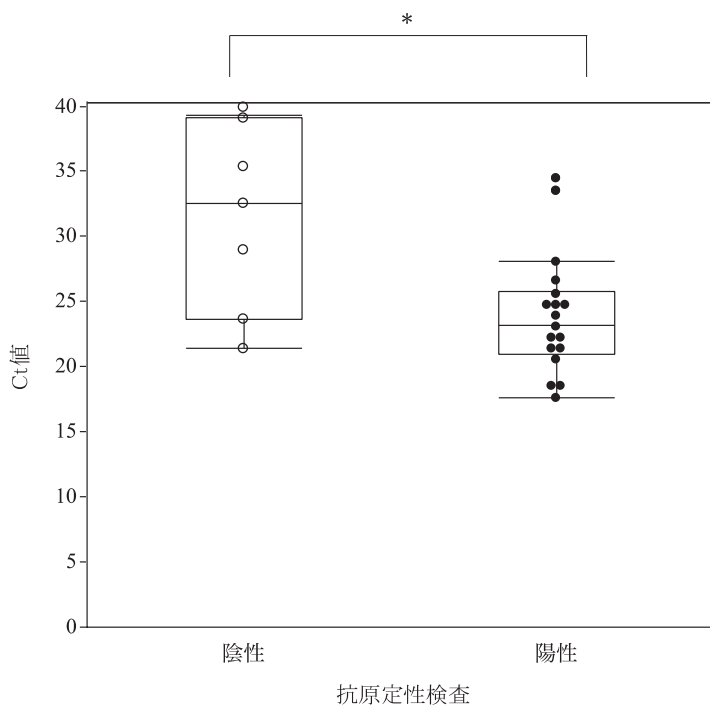


図 1 抗原定性検査と Ct 値の比較

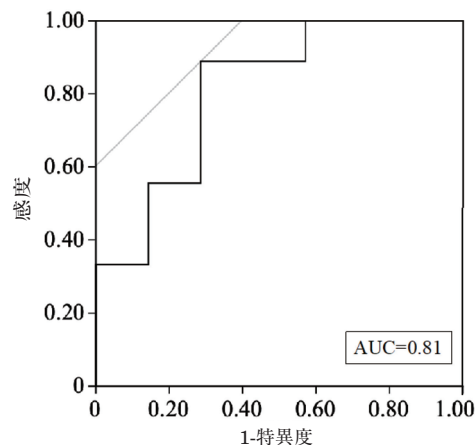


図 2 Ct 値に対する抗原定性の ROC 曲線

* $p < 0.05$
(Wilcoxon 検定)

表 2 抗原定性陰性例における凍結保存懸濁液を使用した抗原定性検査の再評価

No.	Ct 値 (cycle)	抗原定性	凍結保存懸濁液から抗原定性
1	21.4	-	+
2	23.7	-	-
3	29.0	-	-
4	32.6	-	-
5	35.4	-	-
6	39.1	-	-
7	39.3	-	-

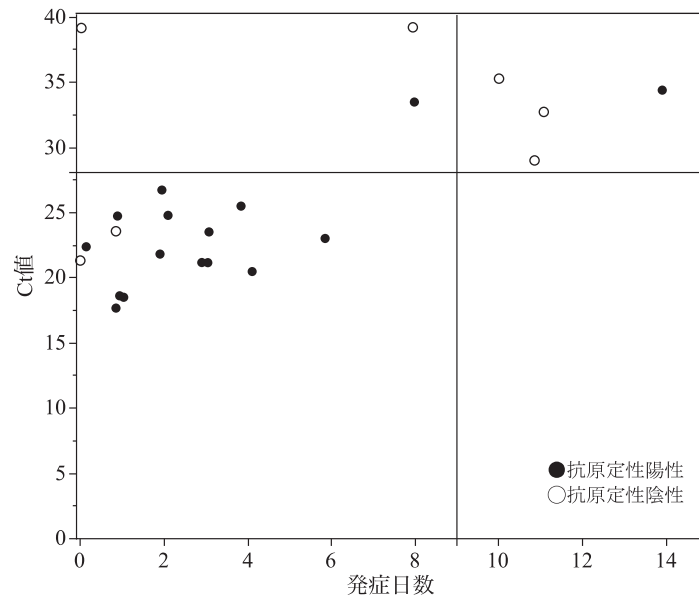


図3 発症日数と Ct 値および抗原定性検査の関係性

表3 SARS-CoV-2 陽性プール検体の希釈系列における抗原定性結果と Ct 値の比較

希釈倍率	2	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
Ct 値	19.9	20.9	21.8	22.9	23.9	25.1	26.0	27.0	28.1	29.5
抗原定性	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
抗原定性検査判定ライン*										

* 上部：コントロールライン、下部：判定ライン

3.2 SARS-CoV-2 陽性プール懸濁液を用いた希釈系列による抗原定性検査と Ct 値の比較

希釈系列の Ct 値と抗原定性検査結果を表3に示す。抗原定性検査は2⁷倍希釈 (Ct 値 26.0cycle) まで陽性を示した。ただし、2⁶倍 (Ct 値 25.1cycle) および2⁷倍 (Ct 値 26.0cycle) における抗原定性の判定ラインは読み取り装置による判定は陽性を示したものの、2倍希釈の判定ラインに比べ薄く目視では判別が困難であった。2⁸倍希釈 (Ct 値 27cycle) 以降は全て陰性を示した。

4. 考 察

抗原定性検査の性能について、RT-PCR と比較し検証した。抗原定性検査と RT-PCR の陽性一致率は72% (18/25 検体) であった。Ct 値で比較すると、抗原定性検査陽性症例の Ct 値は陰性症例に比べ有意に小さかった (p<0.05)。これより抗原定性検査が陽性となる症例

のウイルス量は陰性となる症例に比べて多いことが確認された。抗原定性検査が陰性となった7症例を対象とした、RT-PCR に用いた検体懸濁液を用いた抗原定性検査の再評価では1症例 (No.1) が陽性となった。この症例の Ct 値は21.4cycle と比較的ウイルス量が多い症例であった。この症例においては抗原定性検査と RT-PCR の検査日は同日であり、両検体中のウイルス量は同等であることが推測されるため、抗原定性検査は偽陰性が疑われる。原因としては検体採取法が適切でなかった可能性が第一に考えられる。陰性となった6症例 (No.2～7) の Ct 値の平均は33.2cycle (23.7～39.3cycle) とウイルス量が比較的少ない症例であった。25cycle 以上で抗原定性検査の感度が下がるという報告^{8,9)}もあり、抗原定性検査の検出感度の限界によって陰性となったことが考えられる。一方で、No.2においては Ct 値が23.7cycle と比較的小さいにも関わらず抗原定性検査の再評価でも陰性となった。原因として検体懸濁液はマイナス80℃

にて保存されていたものを自然解凍後に用いたためウイルスの抗原タンパクやRNAが分解されている可能性があること、検体懸濁液に綿棒を浸したものを試料としたためウイルス量が希釈された可能性などを考慮する必要がある。また抗原定性検査とRT-PCRの結果が不一致となった原因を精査するために、発症日数と抗原定性検査結果およびCt値を比較した。抗原定性検査が確定診断として用いることのできる発症9日以内の症例について、カットオフ値28.1cycle以下における抗原定性検査の陽性検出率は87.5% (14/16検体) となり、感度が高くなることがわかった。発症日とCt値の推移について、Takahashiらの報告では発症9日以内ではCt値が30cycle以下とウイルス量が多く感染性のウイルスが検出されたのに対し、10日以降はCt値が30cycleより大きい、すなわちウイルス量が少なくウイルスが分離されない結果が示唆されていた¹⁰⁾。このためウイルス量が多く感染力の高い時期において抗原定性検査を使用することにより、病原体の早期発見と感染拡大防止が期待できる。さらに、検体間の性状や保存期間などの偏りの考慮なしに感度比較を行うために、陽性プール懸濁液から希釈系列を作成し抗原定性検査とCt値の比較を行った。抗原定性検査の最小検出感度は26.0cycleであった。先の検討で推定されたカットオフ値と大きな差はなく、抗原定性検査の感度を裏付ける結果となった。今回RT-PCRに使用したAmpdirect 2019 n-CoV検出キットは体外診断薬として承認されている試薬であるが、試薬や測定機器の種類によってCt値にばらつきがみられることもあり¹¹⁾、国内で標準とされている感染症法のCt値と若干の乖離がある可能性は考慮する必要がある。

今回、抗原定性検査の判定には付属の自動読み取り装置を使用した。実際に目視では判定に苦慮するような薄い判定ラインの陽性例があった。国内で販売されているSARS-CoV-2抗原定性検査キットの中には、自動読み取り装置がなく目視のみで判定するものが多い。抗原定性検査はPOCTとして様々な場面での使用が想定されるため、自動読み取り装置を用いた判定は判定者による結果の差異を無くすためにも重要なツールであると考えられる。また、本検討では免疫クロマトグラフィー法を原理とした1社の抗原定性検査キットの感度を検証したが、複数のキットの性能を評価した報告もあり¹²⁾キッ

トの特性をよく考慮し、各施設の状況に応じて適切なキットを選定する必要がある。

5. 結 語

本検討では、臨床検体を用いてRT-PCRのCt値から抗原定性検査の感度を推定することができた。抗原定性検査の使用によりSARS-CoV-2感染拡大防止のための早期発見が期待できる。

■利益相反

本研究に関する利益相反はない。

■引用文献

- 1) 国立感染症・研究所日本国内で報告された新規変異株症例の疫学的分析 (第1報) : <https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/10279-covid19-40.html>. 2023年11月13日現在
- 2) Suzuki R, Yamasoba D, Kimura I, Wang L, Kishimoto M, Ito J, et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature*. 2022; 603: 700-705.
- 3) 厚生労働省. 新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行後の対応について : <https://www.mhlw.go.jp/stf/corona5rui.html>. 2023年10月27日現在
- 4) 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 第6版
- 5) Henderson D, Weber D, Babcock H, Babcock H, Hayde M, Malani A, et al. The perplexing problem of persistently PCR - positive personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2021; 42: 203-4.
- 6) SARS コロナウイルス抗原キット インフルエンザウイルスキットクイックチェイサー Flu/CoV 添付文書
- 7) SARS コロナウイルス核酸キット Ampdirect™ 2019-nCoV 検出キット 添付文書
- 8) Piek A, Knoester M, Gard L, Lokate M, Niesters H, van Leer-Buter C.L. SARS-CoV-2 antigen tests for screening of healthcare workers; experience with over 48,000 combined antigen tests and RT-PCR tests. *Journal of Clinical*. 2023; 105326
- 9) Jeewandara C, Guruge D, Pushpakumara P, Madhusanka D, Jayadas T, et al. Sensitivity and specificity of two WHO approved SARS-CoV2 antigen assays in detecting patients with SARS-CoV2 infection. *BMC Infectious Diseases*. 2022; 22: 276
- 10) Takahashi K, Ishikane M, Ujiie M, Iwamoto N, Okumura M, Sato T, et al. Duration of Infectious Virus Shedding by SARS-CoV-2 Omicron Variant-Infected Vaccinees. *Emerging Infectious Diseases*. 2022; 28(5): 998-1001.
- 11) Punchoo R, Bhoora S, Bangalee A. Laboratory considerations for reporting cycle threshold value in COVID-19. *EJIFCC*. 2022; 33(2): 80-93. *Virology*. 2023; 158: 105326
- 12) 石田秀和, 稲垣薫乃, 長谷川瞳, 土井洋輝, 和久田光毅, 東本祐紀, 他. 6種のSARS-CoV-2抗原検査キットにおける性能評価. 医療検査と自動化. 2023; 48: 75-80.

Performance evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen test compared to RT-PCR test

Erika Tsurudome¹, Miyuki Mizoguchi¹, Yoshimi Higurashi¹, Takeya Tsutsumi¹

¹ Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital

Background: Tests for the detection of novel coronavirus, SARS-CoV-2, pathogens are extremely important for preventing the spread of infection, and rapid antigen test (RAT) is being actively considered for use as a simple and rapid test. However, it is important to understand the sensitivity of RAT, which is considered less sensitive than other tests.

Objective: We compared the positive concordance rate and cycle threshold (Ct) value between RT-PCR and RAT, and verified the sensitivity of RAT.

Methods: Of the cases that were positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR at our hospital, 25 cases that had a RAT performed on the same day or the day before were included. First, we compared the positive concordance rate between RAT and RT-PCR, and the Ct value measured by RT-PCR with the result of RAT. For the negative RAT cases, we reevaluated RAT using the specimen suspensions of RT-PCR. Second, a dilution series was prepared from 10 pooled suspensions that were

confirmed positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR, and RAT and RT-PCR were performed respectively to determine the minimum detection sensitivity for RAT.

Results: The positive agreement rate between RAT and RT-PCR was 72% (18/25 samples), the mean Ct value of antigen qualitative positive cases was 23.9 cycles, the mean Ct value of antigen qualitative negative cases was 31.5 cycles, and the cut-off value was 28.1 cycles. Reevaluation of the seven negative RAT cases using the specimen suspension of RT-PCR resulted in one case being positive and six being negative. The minimum detection sensitivity for antigen identification using the dilution series was 26.0 cycles.

Conclusion: The sensitivity of RAT can be estimated from the Ct value, and the use of RAT is expected to provide early detection to prevent the spread of infection for SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2, Rapid antigen test, POCT