

ノロウイルス抗原キット“クイック Ex-ノロウイルス®”の 行政検査における有用性の検討

佐藤寛子 柴田ちひろ 斎藤博之 安部真理子 山脇徳美*¹

ノロウイルス (NV) は、冬季に流行する感染性胃腸炎の代表的な原因ウイルスである。また、感染力が強いことから毎年多くの集団感染を引き起こしている。今回、我々は NV の簡便な検査法として 2007 年 11 月に発売されたイムノクロマト法を利用した NV 抗原検出キット“クイック Ex-ノロウイルス®” (Ex-NV) について、集団感染発生時の行政検査での有用性を調べるために現行法であるリアルタイム PCR 法と比較検討を行った。その結果、糞便 50 検体を用いたリアルタイム PCR 法との一致率は 94.1% (48/51)、感度は 88.9% (24/27)、特異度は 100% (24/24) であり、リアルタイム PCR 法と一致しなかった糞便 3 検体はすべて genogroup I に属するものであった。また、直腸スワブ 32 検体を用いた検査では、リアルタイム PCR 法との一致率は 56.3% (18/32)、感度 22.2% (4/18)、特異度は 100% (14/14) であった。また、Ex-NV 法の検出感度は糞便 1 g 当たり 10^6 コピーであった。Ex-NV 法は高価な専用機器を必要とせず、操作が簡便で検体搬入から判定までの所要時間は約 30 分であった。今回の比較検討結果から感染性胃腸炎の集団発生時において Ex-NV 法は有用であると考えられた。ただし、検体全てが Ex-NV 法で陰性の場合や、ウイルス量が少なく見込まれる無症状者の検査を行う場合は、PCR で対応に当たるなど Ex-NV 法の運用には工夫が必要であろう。

1. はじめに

ノロウイルス (NV) は毎年冬季に流行する感染性胃腸炎の代表的な原因ウイルスであり、近年になって NV が原因とされた患者報告数と施設等における集団感染事例報告数が増大している^{1,2)}。その増加の要因として、少ないウイルス量で感染し得ること、患者の糞便や吐物中に NV が多量に排出されることが挙げられる。さらに、NV の感染様式は経口感染であるが、体内に取り込まれる経路としては食品、水、汚染された手指、空気中を漂う塵埃³⁾など多様であることも一因であろう。

このような背景から、事例発生時には感染症情報を的確かつ迅速に把握し、感染拡大防止策をとらなくてはならない。現状では、原因究明のために保健所が採取した検体は各都道府県及び政令市ごとに設置された地方衛生研究所に搬送され、リアルタイム PCR 法等による遺伝子検査を行ない、成績を保健所へ報告する体制をとっている自治体がほとんどである。しかしながら、流行期においては限られた人員で短時間に作業を実施することは困難であり、感染防止対策も遅れがちになる危険がある。そのため、検

体運搬の必要のない、各保健所で簡単に実施できる検査法の導入が望まれる。

現在 NV の検査法として原理の異なる 5 種類 (ELISA 法、RT-PCR 法、NASBA 法、RT-LAMP 法、TRC 法) のキットが市販されているが、保健所の検査室によっては新たな機器整備が必要である。そこで、イムノクロマト法を原理とした NV 抗原検査キット“クイック Ex-ノロウイルス®” (Ex-NV) の迅速性と特殊な機器を必要としない簡便な操作性に着目し、行政検査における有用性を検証すべく、胃腸炎集団感染事例の検体を用い、現行のリアルタイム PCR 法と比較検討した。

2. 対象及び方法

2.1 対象

2007 年 12 月～2008 年 5 月の間に、秋田県内の保健所から当センターに NV 検査依頼のあった 69 事例 494 検体のうち、83 検体 (14 事例) を無作為に抽出し対象とした。

2.2 材料

検査材料は、糞便 51 検体、直腸スワブ 32 検体を用いた。糞便は自然排便されたものを用い、

*¹: 前健康環境センター

ウイルス検査用滅菌容器に採取した。直腸スワブは各患者に1本滅菌綿棒を配布し、綿球が隠れる程度まで患者肛門へ挿入し、検体を採取した。なお、検体は患者本人または施設従業員が家庭や施設において採取するという特殊な事情があるため、挿入時の痛みを軽減したい場合は水道水で湿らせるように指導している。採取した検体は冷蔵保存して当センターに搬送され、採取から1日以内に検査を行った。

2.3 試薬と方法

2.3.1 Ex-NV 法

Ex-NV 法は添付の文書に準拠して以下の通り実施した。

前処理用チューブに糞便検体(固形便は小豆大で約 0.1 g, 液状便は約 0.1 ml)と検体浮遊液を、1:9の割合になるように入れ、混和し試料とした。その試料を 6,000×g で5分間遠心した後、上清を 300 μl 採取し、検体浮遊チューブに移した。チューブに試料濾過フィルターを装着し、試料全量を反応容器に滴下した後、テストストリップを反応容器に挿入し、反応容器キャップを装着した。15~30℃で15分静置後、目視判定を行った。判定部にコントロールライン(青色)とテストライン(青色)が現れた場合、陽性とし、コントロールラインのみが現れた場合は陰性、コントロールラインが現れない場合は試験無効とし、再測定を行うこととした。

2.3.2 リアルタイム PCR

糞便は約 0.01 g, 直腸スワブは綿球部分を蒸留水 1ml に攪拌混合して乳剤とした後、UltraClean15 を用いたグラスミルク法⁴⁾により RNA を抽出した。抽出した RNA は総量 50 μl となるように蒸留水で溶解した。NV の検出とコピー数の測定は Kageyama ら⁵⁾のリアルタイム PCR 法に準じて行った。使用試薬は LightCycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes(ロシュ・ダイアグノスティクス), 機器は LightCycler 320S(ロシュ・ダイアグノスティクス)で、反応容量は 20 μl である。

2.4 検討方法

2.4.1 リアルタイム PCR 法と Ex-NV 法の相関

糞便と直腸スワブ検体について、リアルタイム PCR 法と Ex-NV 法を同時に実施した。結果の基準はリアルタイム PCR 法とし、Ex-NV 法との一致率、感度、特異度を求めた。

2.4.2 検出感度

Ex-NV 法の検出感度の検討には、本法で陽性と判定された genogroup II (G II)/4 を含む糞便 3 検体と genogroup I (G I)/6, G I /8 を含む 2 検体を用いた(No.1,2,3,4,5)。検体はそれぞれ別事例由来である。前述の操作により作成した試料を原液とし、検体浮遊液で 10 倍段階希釈を行い、 10^4 までの各希釈液について Ex-NV 法による検査を実施した。

3. 結果

3.1 リアルタイム PCR 法と Ex-NV 法の相関

3.1.1 糞便検体について

糞便検体における PCR 法と Ex-NV 法の相関を表 1 に示した。

51 検体中リアルタイム PCR 法陽性は 26 検体であり、genogroup の内訳 G I :G II は 4:22 であった。このうち、Ex-NV 法で陽性と判定されたのは 24 検体であり、NV 量は糞便 1g 当たり $5.80 \times 10^6 \sim 7.25 \times 10^9$ コピー(copies/g)であった。なお、Ex-NV 法で陰性となった不一致例 3 検体はいずれも G I に属するものであり、NV 量は $3.69 \times 10^8 \sim 2.23 \times 10^9$ copies/g であった。PCR 法で陰性であった 24 検体は全て Ex-NV 法でも陰性と判定され、疑陽性例は認められなかった。以上から、リアルタイム PCR 法に対する Ex-NV 法の一致率は 94.1%であり、感度は 88.9%、特異度は 100%であった。

3.1.2 直腸スワブ検体について

直腸スワブ検体における PCR 法と Ex-NV 法の相関を表 2 に示した。

32 検体中リアルタイム PCR 法陽性は 18 検体であり、genogroup は全て G II であった。このうち、Ex-NV 法で陽性と判定されたのは 4 検体であった。リアルタイム PCR 法で陰性であった 14 検体は全て Ex-NV 法でも陰性と判定され、疑陽性例は認められなかった。以上から、リアルタイム PCR 法に対する Ex-NV 法の一致率は 56.3%であり、感度は 22.2%、特異度は 100%であった。

3.2 Ex-NV 法の検出感度

Ex-NV の検出感度に関する検討結果を表 3 に示した。検体 No.1(G II /4: 1.15×10^9 copies/g), No.2(G II /4: 4.88×10^8 copies/g)および No.5 (G I /8: 3.69×10^8 copies/g) は、いずれも原液から 10^2

表 1 糞便検体を用いたリアルタイム PCR 法と Ex-NV 法の相関

		リアルタイム PCR			
		陽性		陰性	合計
		G I	G II		
Ex-NV	陽性	2	22	0	24
	陰性	3	0	24	27
	合計	27		24	51

リアルタイム PCR 法との一致率：94.1%
 感度：88.9%
 特異度：100%

表 2 直腸スワブ検体を用いたリアルタイム PCR 法と Ex-NV 法の相関

		リアルタイム PCR			
		陽性		陰性	合計
		G I	G II		
Ex-NV	陽性	0	4	0	4
	陰性	0	14	14	28
	合計	18		14	32

リアルタイム PCR 法との一致率：56.3%
 感度：22.2%
 特異度：100%

表 3 Ex-NV 法の検出感度

No.	genogroup	糞便 1g 中の NV 量(copies)	希釈系列					
			原液	×10	×10 ²	×10 ³	×10 ⁴	×10 ⁵
1	G II /4	1.15×10 ⁹	+	+	+	-	-	-
2	G II /4	4.88×10 ⁸	+	+	+	-	-	NT
3	G II /4	2.39×10 ⁷	+	-	-	-	NT	NT
4	G I /6	5.05×10 ⁶	+	-	-	NT	NT	NT
5	G I /8	3.69×10 ⁸	+	+	+	-	-	-

NT : not tested

倍希釈まで Ex-NV で陽性を示したが、10³倍以上の希釈では検出できなかった。検体 No.3(G II /4:2.39×10⁷ copies/g)及び No.4(G I /6:5.05×10⁶ copies/g)は、原液のみ陽性であり、希釈検体では検出できなかった。

4. 考察

全国的に NV 感染患者が増加する冬期は集団感染発生が多く、就業制限等による業務の停滞や公的機関の閉鎖、検査や感染防御に関する資金の投入など、一般社会においても混乱を招く事が予想される。これらのことから、被害を最小限に食い止めるための行政対応においては早期の原因究明が必須である。そのためには、NV 検査は第一線である保健所(状況によっては事例発生地)で行うのが望ましい。

行政における NV 検査の現状は国立感染症研究所の指導⁶⁾に基づいて遺伝子増幅法、ELISA

法、電子顕微鏡によるウイルス粒子の直接検出、の3法が実施されている。遺伝子増幅法は検出感度が 10 copies/μl と良好であるものの、サーマルサイクラーなどの特殊機器を必要とする。ELISA 法及び電子顕微鏡法も一般の保健所では常備されていない機器が必要であり、さらに感度が 10⁶~⁷ copies/g と高くない^{6~7)}。このような検査法の特徴を理解した上で、各機関の実情にあった方法が選択されている。

新たに開発された Ex-NV 法は、簡便性(特殊機器を用いない)と迅速性(検査時間短縮)の点で従来法の問題点を解決した方法と言える。

本検討では、Ex-NV 法の行政検査における有用性を集団感染事例の検体を用いリアルタイム PCR 法と比較することで実施した。

糞便検体のリアルタイム PCR 法との比較検討では、これまで ELISA 法で報告⁷⁾されている一致率、感度以上の結果が得られた。しかし、Ex-NV

法で陰性と判定され、結果が不一致であった検体が3検体認められた。それぞれについてシーケンスを行い、遺伝子型を調べたところ、GI/4, GI/8, GI/11の3タイプであった。Ex-NVにはGIグループで6遺伝子型(GI/1~4, GI/6, GI/11), GIIグループで13遺伝子型(GII/1~8, GII/12~15, GII/17)の抗体が混用されている⁸⁾。このことから、GI/8の検体に関してはEx-NVの使用抗体が対応していなかったことが、結果不一致の直接的な原因と考えられた。また、使用抗体に含まれているにもかかわらずGI/4, GI/11が検出できなかった要因として、Ex-NVは開発時に流行していたNVを認識するモノクローナル抗体を使用しているが、その抗原性は現在流行している実際のNVと一致しない場合があることが考えられた。

一方、直腸スワブは糞便検体と比較し、一致率と感度が大幅に低い結果であったことから、Ex-NV使用時は十分量の糞便を確実に採取することが重要であることが認められた。糞便中NV量は、患者病日に大きく依存するという報告⁹⁾があるが、本検討では、綿棒の先が黄色い程度の微量検体が多い上に採便のタイミングを統一できなかったことも一致率、感度低下の一因と考えられた。よって、直腸スワブを用いてEx-NVを使用する場合は、病日の浅い患者便を綿棒全体に付着するように採取することが望ましいと思われる。

検体の希釈検討の結果から、今回使用の遺伝子型に関してEx-NV法の検出感度は 10^6 copies/g以上であることが示唆された。集団感染事例の初期(12日以内)検体のNV量は平均 10^8 copies/gという報告⁹⁾があり、本検討においてもNV陽性糞便検体は全て 10^6 copies/g以上であった。なお、ELISA法で報告¹⁰⁾されているようにNVの抗原型によっては反応性や検出感度が異なることがある。しかし、本検討では近年の流行において集団感染事例の9割以上を占めているGII/4¹¹⁾を使用している。よって、現在のところ集団発生事例においてEx-NVは対応可能であるが、今後も国内NV流行株に関して常に監視し、情報を得る必要があると思われた。

我々は今後、Ex-NV法が保健・衛生行政の最前線である保健所で使用され、行政検査の効率化と迅速性に寄与することを期待する。検出感度が

PCRに及ばないことは事実であるが、行政検査の初期の目的は患者個々の診断ではなく、原因の究明である。Ex-NV法による結果がすべて陰性であった場合や、より高感度が必要とされる無症状者の検査には精密検査として遺伝子検査を用いるなど、Ex-NVは活用の場面と運用法を工夫することで、行政対応に有用であると考えられた。

5. 結語

NVの集団感染において、早急に原因究明をし、感染拡大を防止するには、地域保健の最前線である保健所で検査が迅速に実施できることが望まれる。Ex-NV法は、新たな専用機器導入の必要がない迅速で簡便な手法であることから、PCR等に併せて利用することで、行政検査において有用であると考えられた。

参考文献

- 1) 斎藤博之：高齢者ノーウォークウイルス胃腸炎の疫学，日臨 2002；60：1148-1153
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：ノロウイルスの流行 2006/2007 シーズン，病原微生物検出情報 2007;28:No.10:1-2
- 3) 武田直和：ノロウイルスの大流行：特徴と原因，臨とウイルス 2008;36:264-265
- 4) 斎藤博之 ほか：ノーウォーク様ウイルス(NLV)の検査における一本鎖高次構造多型(SSCP)解析の応用，臨とウイルス 2002;30:163-171
- 5) Kageyama ほか：Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, J Clin Microbiol, 2003; 41: 1548~1557
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：ノロウイルス集団発生事例に対して感染症及び食品部局が共同で実施する初期実施疫学調査および微生物学検査のポイント(第1版：平成19年11月30日付け) 2007;14-15
- 7) 大瀬戸光昭ほか：ELISA法によるNorovirus抗原検出キットの性能評価，医と薬学 2003;50:721-726
- 8) 田中智之ほか：ノロウイルス迅速抗原検査，検と技 2008;36:235-239

- 9) 三好龍也ほか：ノロウイルス感染におけるウイルス排出期間と排出量，食品衛生研究 2006;56:12-13
- 10) Jonathan A.Burton-Macleod ほか：Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples, J Clin Microbiol 2004;42:2587～2595
- 11) 国立感染症研究所感染症情報センター：06/07 シーズン流行のノロウイルス遺伝子型調査中間報告,病原微生物検出情報 2007; 28:No.10:4-5