



医学検査のあゆみ－32

ノロウイルスの新しい検査法 －生物発光酵素免疫測定法(BLEIA)

さか まき のぞみ
酒 巻 望
Nozomi SAKAMAKI

はじめに

ノロウイルスは冬季に流行する感染性胃腸炎の原因ウイルスであり、大規模な食中毒事件を引き起こす。近年のノロウイルスによる食中毒は、カキなどの二枚貝が関与する事例は減少傾向にあり、その代わりにノロウイルスに感染した調理従事者を介した食品の二次汚染が原因と疑われる事例が増加している。ノロウイルスによる食中毒を防ぐためには、調理従事者等のノロウイルス感染の有無を把握することが重要であり、高感度な遺伝子検査法による検便検査が推奨されている。しかしながら、ノロウイルスの遺伝子検査法は高コストで煩雑な操作を要することから十分には普及していない。

そこで、栄研化学株式会社では、安価で簡便な免疫測定法でありながら、高感度という特徴も兼ね備えた生物発光酵素免疫測定法(BLEIA)に着目し、ノロウイルスの検便検査に適した多検体処理システムを構築した。本稿では、はじめにノロウイルスの特徴などについて解説し、次にBLEIAによるノロウイルス検便検査システムについて紹介する。

I. ノロウイルスの特徴

ノロウイルスは、非細菌性胃腸炎を引き起こすウイルスであり、一般的には冬場の食中毒の原因ウイルスとして知られている。厚生労働省の食中毒統計において、ノロウイルスを原因とする食中毒は、事件数、患者数ともに常に上位を占めている。過去

10年間のノロウイルスによる食中毒は、年間約300～600件発生しており、総患者数は少ない年で1万人程度、多い年では3万人以上に上る。さらに、ノロウイルス感染事例は、1件当たりの患者数が100人以上に及ぶ大規模なものになりやすい。その背景として、ノロウイルスに特徴的な性質がいくつか挙げられる。

1. 遺伝的多様性に富んでいる

ノロウイルスは遺伝子群I(GI)～遺伝子群V(GV)の5つの遺伝子群に分けられる。このうち、主にヒトに感染するのはGI、GIIである。さらに、GIおよびGIIは30種類以上の遺伝子型に分類される¹⁾。2006-2007年シーズン以降、GII.4が流行株の主流を占め¹⁾、GII.4の亜型による周期的な流行が世界的に繰り返されてきたが¹⁾、近年、GII.4以外の遺伝子型の流行も確認され²⁾、2016-2017年シーズンではGII.2が流行の主流となった³⁾。

2. ノロウイルスに感染すると、大量のウイルスが糞便中に排泄される

ノロウイルスはヒトの小腸で増殖し、糞便中に排出される。感染者の糞便中には、1グラムあたり1億個以上のウイルス粒子が排泄される。下痢などの症状が治まっても2～4週間はウイルス粒子を排出し続けるため、二次感染に注意を払う必要がある。

介護福祉施設や保育所において、職員が感染者の排泄物を処理する際にノロウイルスに感染する事例や、ノロウイルスに感染した職員が媒介者となってさらに感染が拡大するケースが多数報告さ

れている（ヒト－ヒト感染）。

3. 物理化学的抵抗性が強い。さらに僅かなウイルス粒子で感染が成立する

ノロウイルスはアルコールや逆性石鹼などの薬剤にも抵抗力があり、他のウイルスと比べて環境中での安定性が高い。また、わずか 100 ～ 1000 個のウイルス粒子で感染が成立すると報告されている⁴⁾。それゆえ、一人の調理従事者がノロウイルスに感染すると、糞便を介して他の調理従事者にも感染が拡大し、同時に食品や調理器具が汚染される。

近年増加傾向にある飲食店や仕出し弁当によるノロウイルス食中毒は、調理従事者による食品の二次汚染が原因である場合が多い。

4. 不顕性感染を起こす

不顕性感染とは、下痢や腹痛などの症状を伴わない感染状態のことであり、ノロウイルス感染ではしばしば起こる。不顕性感染でも便に排出されるウイルス量は有症者と変わらず⁵⁾、感染源となって無意識のうちに感染を広げてしまう恐れがある。したがって、ノロウイルス感染の有無を検便検査などによって把握することは、衛生管理の観点から非常に重要である。

Ⅱ. ノロウイルスの検査法

ノロウイルスの検査法には、遺伝子検査法と免疫測定法がある。遺伝子検査法はウイルスゲノムを増幅する方法であり、公定法としてリアルタイム RT-PCR (rRT-PCR) 法や RT-PCR 法が厚生労働省より通知されている⁶⁾。一般的に遺伝子検査法は検出感度が高く、特異性に優れているが、試薬コストが高く、操作が煩雑で結果が得られるまでに時間を要するという欠点がある。一方、免疫測定法はノロウイルスに対する特異的な抗体を用いてウイルスを検出する手法である。ノロウイルスは組織培養によりウイルスを調製することができないが、代わりに感染性ウイルス粒子と同様の抗原性を持つ、ウイルス様中空粒子 (Virus like particle : VLP) を昆虫細胞発現系で作製することができる。この VLP に対する特異的抗体を用いて、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA 法) やイムノクロマト (IC 法)^{7,8)} を原

理とする試薬が開発され、体外診断用医薬品としても利用されている。免疫測定法は遺伝子検査法に比べて低コストで、操作が簡便である。しかし、調理従事者の検便検査に用いるには、検出感度が十分ではないことや⁹⁾、遺伝子型別の反応性に違いがあるなどの問題点が指摘されている。したがって、遺伝子検査法と免疫測定法の長所を兼ね備えた検査法が開発されれば、ノロウイルスの検便検査が普及し公衆衛生の向上につながることを期待されてきた。

Ⅲ. 生物発光と BLEIA の構築

生物発光はホタルの発光反応を代表とする化学発光の一種である。ホタルの生物発光は、図 1 に示すように D-ルシフェリンがルシフェラーゼによって励起状態のオキシルシフェリンに変換され、これが基底状態に戻る際に光を発する反応である (図 1)。

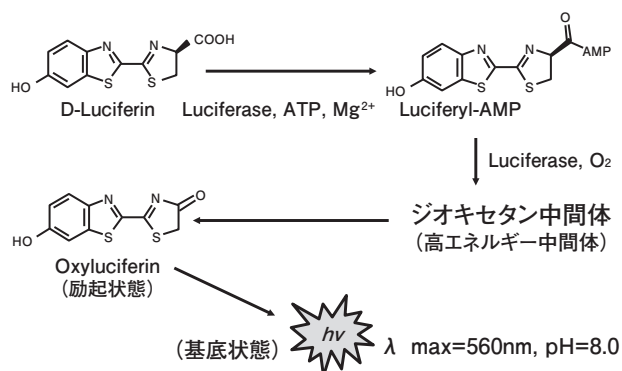


図 1 ルシフェリン－ルシフェラーゼ系の発光原理

この反応は、ペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ等の他の化学発光に比べて量子収率が極めて高いことが特徴であり、高感度な検出系の構築に適している。栄研化学株式会社では、この原理を利用して、前立腺特異抗原¹⁰⁾や甲状腺刺激ホルモン¹¹⁾に対する高感度免疫検査法を構築してきた。これらの技術と経験を生かして、今回新たに糞便中のノロウイルスを検出対象とした検査法を開発した¹²⁾。

Ⅳ. BLEIA によるノロウイルス検査法

BLEIA によるノロウイルス検査法の概要を図 2 に示す。この方法は、大きく分けて、第一反応、第二反応、発光検出の 3 つのステップに分けられる。まず、第一反応では、免疫反応液 1、免疫反応液 2、

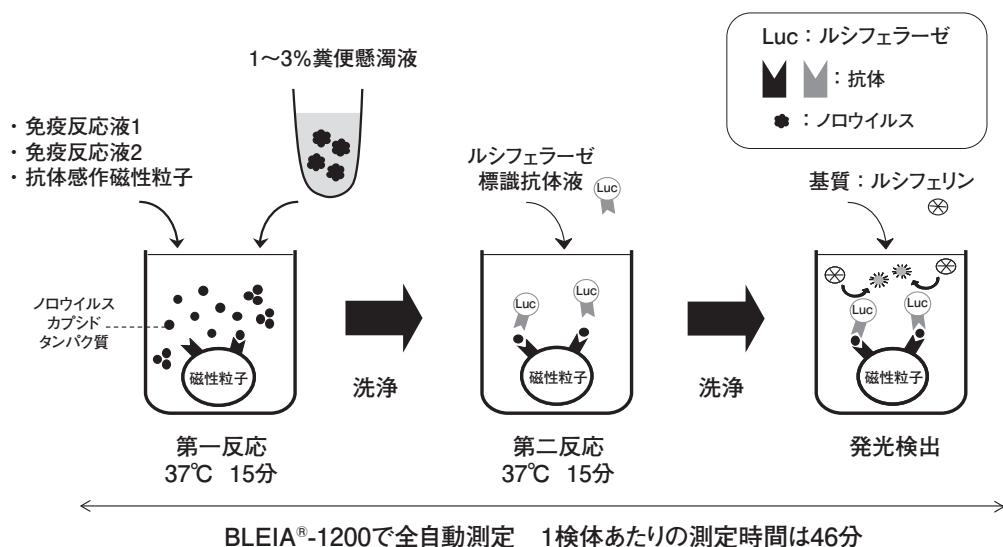


図2 BLEIAの反応模式図

抗体感作磁性粒子、1～3%の糞便懸濁液の遠心上清（またはろ液）を混合し、37℃で15分間反応させる。この第一反応でウイルスが破壊され、ウイルスの骨格であるカプシドタンパク質が磁性粒子上の抗体にトラップされる。次に、磁石を用いて磁性粒子を捕集し、上清液を取り換えることで余分な検体成分を除去し洗浄する。洗浄が終わったら、第二反応として、ルシフェラーゼ標識抗体と標識抗体希釈液を添加し、さらに37℃15分間反応させる。この第二反応で固相抗体、抗原、標識抗体からなる免疫複合体を形成させる。第二反応終了後、同様に磁石を使って未反応の標識抗体を洗浄する。最後に発光試薬を加え、ルシフェラーゼの発光を検出する。ルシフェラーゼの発光は、磁性粒子上に捕獲されたノロウイルス抗原の量に応じて大きくなるため、この発光量を計測することでノロウイルスを検出することが可能になる。実際に検体を測定する際には、同じ条件で測定した標準物質の発光値からカットオフ値を算出し、各検体の発光値をカットオフ値で除した値をカットオフインデックス(COI)として算出する。そして、1.0 COI以上の検体を陽性、1.0 COI未満の検体を陰性と判定する。

V. 全自動生物化学発光免疫測定装置 BLEIA-1200 (図3)

BLEIAは、全自動生物化学発光免疫測定装置BLEIA-1200を用いて測定を行う。本装置は、検体



図3 BLEIA-1200の外観

の分注から結果の出力までを全自動で行うことができるBLEIAの専用装置である。ノロウイルス検出試薬の場合、1検体あたりの反応時間は46分であり、1時間あたり120検体を処理することができる。ノロウイルスの他にも、C型肝炎ウイルスコアタンパク質¹³⁾、C型肝炎ウイルス抗体¹⁴⁾、B型肝炎ウイルス表面抗原¹⁵⁾の測定試薬がラインアップされている。

VI. BLEIAによるノロウイルス検査試薬の 基本性能

1. ノロウイルス抗原に対する反応性

遺伝子型GII.4のノロウイルス抗原(VLP)をBLEIAで測定すると、抗原の濃度に応じて発光強度が増加する。抗原濃度として、およそ5桁の範囲

で直線的な発光強度の上昇がみられる。このように測定ダイナミックレンジが広いことも BLEIA の大きな特徴である。点線で示した 1 pg/mL の発光強度がカットオフ値に相当する (図 4)。

2. 同時再現性

精度管理用の検体(A=9.7 COI、B=92.8 COI、C=933.9 COI) を用いた測定内再現性および測定間再現性を表 2 に示す。測定内の変動係数は 1.4 ~ 2.8%、測定間の変動係数は 1.9 ~ 3.7% であり、良好な再現性を有している (表 1)。

3. 各種遺伝子型に対する反応性

遺伝子型 GII.4 以外にも 13 種類 (GI 6 種類、GII 7 種類) の遺伝子型ノロウイルス抗原 (VLP) を用いて、各遺伝子型に対する反応性を確認した。図 5 に示すように、BLEIA は 14 種類全てにほぼ同程度に

反応し、多様な遺伝子型のノロウイルスを検出できる (図 5)。

4. 糞便検体を用いた rRT-PCR との相関性

実検体に対する反応性を検証するため、rRT-PCR でノロウイルス陽性となった小児の下痢便 61 例を対象に BLEIA を実施した (図 6)。61 例すべてが BLEIA で陽性となり、測定値は 5.1 ~ 91121.0 COI の範囲内であった。BLEIA の COI と rRT-PCR から求めた 1g 便あたりのコピー数には正の相関が認められた ($R=0.84$)。この 61 例の検体には 10 種類の遺伝子型のノロウイルスが含まれており、遺伝子型の違いをプロットの形で示している。各プロットが回帰直線に近いところに分布していることから BLEIA が各遺伝子型に対してほぼ同等に反応していることがわかる。

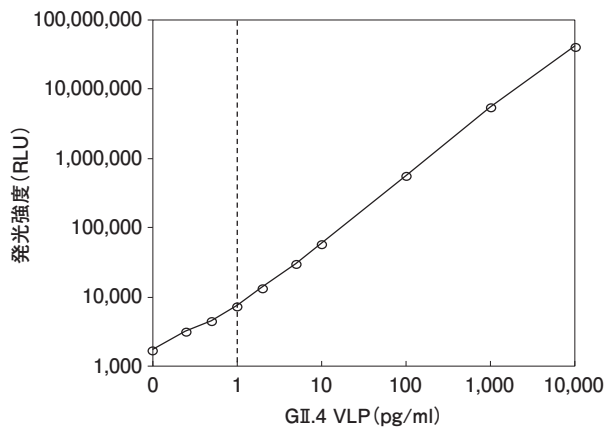


図 4 GII.4_VLP に対する反応曲線

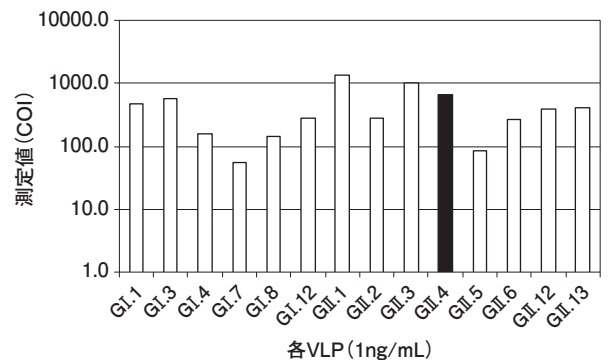


図 5 各種 VLP に対する反応性

管理検体	平均 ± SD VLP濃度 (pg/ml)	変動係数 CV (%)
測定内再現性		
(n=10)		
A	9.8 ± 0.3	2.8
B	94.9 ± 1.4	1.5
C	957.4 ± 13.0	1.4
測定間再現性		
(n=5)		
A	9.7 ± 0.2	1.9
B	91.6 ± 3.4	3.7
C	925.7 ± 23.2	2.5

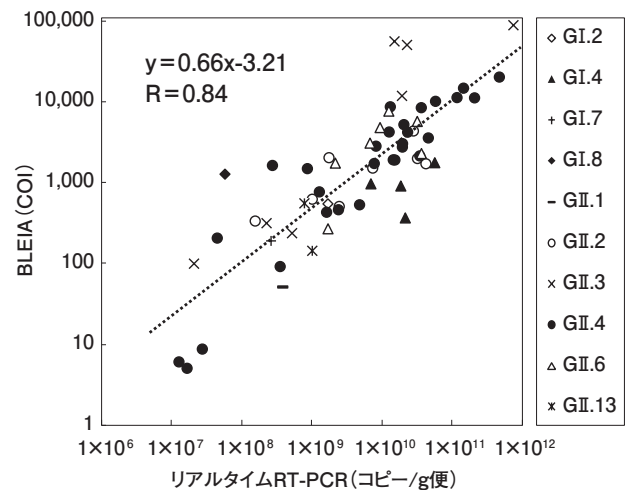


図 6 BLEIA とリアルタイム RT-PCR の相関性

表2 検体の希釈試験による感度の推定

検体	遺伝子型	検体中のウイルス量 (コピー/g便)	希釈倍率							希釈倍率から計算される カットオフのウイルス量 (コピー/g便)
			1	1/10	1/10 ²	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ⁶	
A	GII.2	7.5×10^7	355.8	37.1	4.1	<1.0	<1.0	—	—	7.5×10^5
B	GII.3	7.0×10^9	OR	5339.1	694.2	73.0	8.0	1.3	<1.0	7.0×10^4
C	GII.3	1.0×10^7	67.7	8.4	1.3	<1.0	—	—	—	1.0×10^5
D	GII.4	2.2×10^7	145.0	16.6	2.0	<1.0	—	—	—	2.2×10^5
E	GII.4	4.3×10^8	1739.3	219.4	24.2	2.7	<1.0	—	—	4.3×10^5
F	GII.4	1.4×10^8	1319.6	162.4	16.1	1.9	<1.0	—	—	1.4×10^5
G	GII.6	3.3×10^9	5392.5	644.1	68.4	7.1	<1.0	<1.0	—	3.3×10^6
H	GII.6	6.0×10^9	9000.1	1156.2	114.4	11.7	1.4	<1.0	<1.0	6.0×10^5

OR: over range, —: not tested

5. 検体の希釈試験による検出感度の推定

BLEIA の検出感度を推定するため、rRT-PCR でウイルス量を定量した検体の希釈試験を行った。その結果、 $1.4 \times 10^5 \sim 6.6 \times 10^6$ コピー/g 便以上で陽性となり、BLEIA の検出感度は約 $10^5 \sim 10^6$ コピー/g 便であると推定された(表2)。この検出感度は、市販の遺伝子検査法とほぼ同等である¹⁶⁾。

VII. 調理従事者等の糞便を用いたスクリーニング性能の評価

株式会社 BML フード・サイエンスとの共同研究により、調理従事者等の糞便を用いて BLEIA のスクリーニング性能を評価した。2013 年 1 月～2 月の間に、ノロウイルスの市販遺伝子検査法による測定依頼があった 1963 例の糞便検体に対して、BLEIA によるノロウイルス検査を実施した。その結果、BLEIA では 103 例が陽性となり、陽性率は 5.2% (103/1963) となった。一方、遺伝子検査法での陽性率は 5.5% (108/1963) であり、BLEIA は遺伝子検査法とほぼ同等のスクリーニング性能であることが実証された。遺伝子検査法に対して、BLEIA は、感度 90.7% (98/108)、特異度 99.7% (1850/1855)、全体一致率 99.2% (1948/1963) となり、良好な相関性を示した(表3)¹⁷⁾。

なお、両者で判定が一致しなかった 15 例について、rRT-PCR による解析を行ったところ、ウイルス量が非常に少なく、両測定法の感度付近であることが確認された。ウイルス量が非常に少ないために便の採取場所の違いにより、判定が不一致になったと考えられる。

表3 調理従事者等の糞便検体による BLEIA と遺伝子検査法の相関性

		遺伝子検査法		
		陽性	陰性	合計
	陽性	98	5	103
BLEIA 法	陰性	10	1850	1860
		108	1855	1963

感度: 90.7% (98/108)

特異度: 99.7% (1850/1855)

全体一致率: 99.2% (1948/1963)

VIII. BL 採便容器によるノロウイルス検便検査の簡便化

1. BL 採便容器開発の経緯

ノロウイルスの検便検査は便を測定対象とするため、測定試料を調製する際には、採便、便懸濁液の調製、遠心分離による残渣の除去などの前処理が必要である。これは、一般に行われている遺伝子検査法でも、上述の BLEIA でも同じであり、この検体の前処理はノロウイルス検便検査が普及するうえで大きなボトルネックとなっている。そこで、検体の採取から糞便上清の調製までを簡便化するために、BLEIA 専用の採便容器 (BL 採便容器) を開発した。

BL 採便容器は、緩衝液が入った採便容器と採便棒がついたキャップからなる。被験者は排便後、キャップ側の採便棒で便を採取し、採便棒を緩衝液の入った採便容器に差し込みキャップを閉じる。BL 採便容器内では緩衝液によって便が懸濁され、被験者から検査室に輸送される間に便の懸濁が完了する。検査室では、BL 採便容器を遠心処理し、BLEIA-1200 に架設するだけで、非常に簡便かつ迅速にノロウイルスの検便検査が実施できる(図7)。

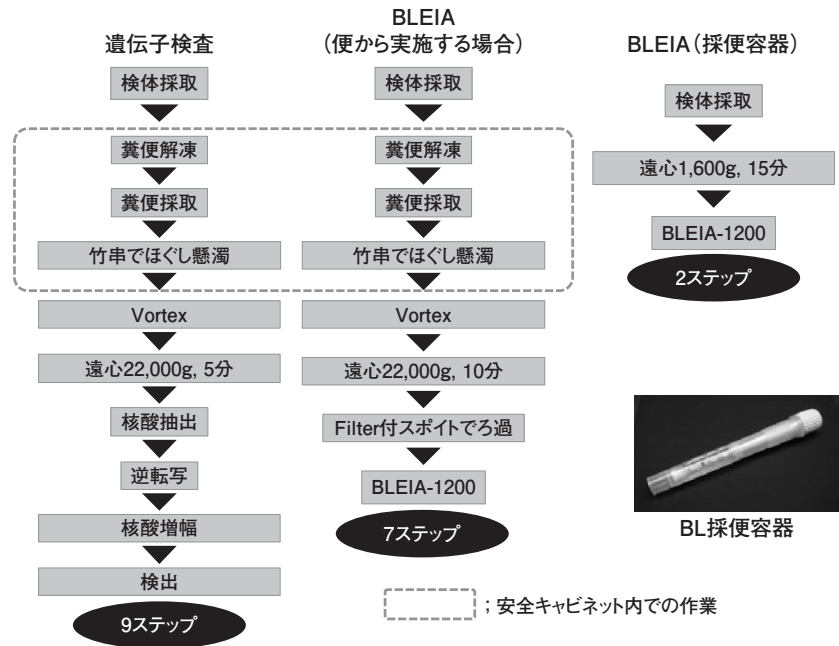


図 7 遺伝子検査と BLEIA のフロー比較

2. BL 採便容器の性能評価

群馬県衛生環境研究所との共同研究により、BL 採便容器を用いた BLEIA の性能を評価した。2014 年 12 月～2015 年 3 月の間に群馬県内で発生した食中毒事例の糞便検体 116 例に対して、rRT-PCR と BL 採便容器を用いた BLEIA を実施し、両者の判定一致率を解析した。rRT-PCR は群馬県衛生環境研究所にて実施した。

一方、BL 採便容器による検査は、群馬県衛生環境研究所にて BL 採便容器を用いて採便し、1 週間以内に栄研化学株式会社生物化学研究所に冷蔵輸送した後、BLEIA を実施した。その結果、BLEIA は、rRT-PCR に対して、感度 91.3 % (42/46)、特異度 100 % (70/70)、全体一致率 96.6 % (112/116) となり、両者には高い相関性が認められた (表 4)。

おわりに

BLEIA によるノロウイルス検便システムは、高感度と幅広い遺伝子型に対する反応性を有しながら、安価で簡便かつ迅速な検査が可能である。そのため、rRT-PCR と同様に調理従事者などを対象とした検便検査に広く利用されることが期待される。また、ヒトーヒト感染予防対策として、介護福祉施設や保育所等における職員の健康管理にも本システ

表 4 BLEIA (採便容器) と rRT-PCR との相関

		リアルタイム RT-PCR		
		陽性	陰性	合計
BL採便容器による BLEIA 法	陽性	42	0	42
	陰性	4	70	74
		46	70	116

感度：91.3 % (42/46)
特異度：100.0 % (70/70)
全体一致率：96.6 % (112/116)

ムを利用することで、施設の衛生環境整備に役立つと考える。

BLEIA によるノロウイルス検査試薬は、2012 年 8 月に産業用試薬として販売されたが、2015 年 8 月からは体外診断用医薬品として国内販売されている。近年の流行株への対応も可能であることから^{18～20)}、今後は、臨床検体におけるノロウイルス感染の診断補助にも利用され、さらなる応用が期待される。

謝 辞

データをご提供いただきました株式会社 BML フード・サイエンスの中川弘先生と群馬県衛生環境研究所に感謝いたします。

文 献

1) Hansman GS, et al. Genetic and antigenic diversity

- among noroviruses. *J Gen Virol.* 2006 ; **87** (4) : 909-919.
- 2) Matsushima Y1, et al. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill.* 2015 ; **20** (26) : pii=21173.
 - 3) ノロウイルス等検出状況 2016/17, 2015/16, 2014/15 シーズン (2017年5月14日現在報告数) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/norovirus-m/2082-idsc/iasr-noro/5701-iasr-noro-150529.html>
 - 4) Benabbes L, et al. Norovirus and other human enteric viruses in moroccan shellfish. *Food Environ Virol.* 2013 ; **5** (1) : 35-40.
 - 5) Ozawa K, et al. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food-handlers in Japan. *J. Clin Microbiol.* 2007 ; **45** (12) : 3996-4005.
 - 6) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課. ノロウイルスの検出法について. 食安監発第1105001号, 平成15年11月5日 (最終改正 : 食安監発第0514004号, 平成19年5月14日).
 - 7) 山崎 務. ほか. 金コロイドを用いた新規イムノクロマト法による便中ノロウイルス検出試薬の有用性. *感染症学雑誌.* 2013 ; **87** (1) : 27-32.
 - 8) Burton-MacLeod JA, et al. 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** (6) : 2587-2595.
 - 9) 東京都感染症情報センター「ノロウイルス対策緊急タスクフォース」 http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/diseases/gastro/noro_task/
 - 10) Seto Y, et al. Development of ultra-high sensitivity bioluminescent enzyme immunoassay for prostate-specific antigen (PSA) using firefly luciferase. *Luminescence.* 2001 ; **16** (4) : 285-290.
 - 11) Seto Y, et al. Development of highly sensitive bioluminescent enzyme immunoassay with ultra-wide measurable range for thyroid-stimulating hormone using firefly luciferase. *Anal. Chim. Acta.* 2001 ; **429** (1) : 19-26.
 - 12) Sakamaki N, et al. Bioluminescent enzyme immunoassay for the detection of norovirus capsid antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 ; **19** (12) : 1949-1954.
 - 13) 八橋弘, ほか. 全自動生物化学発光免疫検査装置「BLEIA-1200」専用試薬「BLEIA「栄研」HCV抗原」の臨床性能評価. *医学と薬学.* 2012 ; **68** (1) : 157-167.
 - 14) 八橋弘, ほか. 全自動生物化学発光免疫測定装置「BLEIA-1200」専用試薬「BLEIA「栄研」HCV抗体」の性能評価. *医学と薬学.* 2013 ; **69** (4) : 643-653.
 - 15) 八橋弘, ほか. 生物発光を用いた高感度免疫測定装置 BLEIA®-1200 による HBs 抗原測定の有用性. *肝臓.* 2014 ; **55** (9) : 521-529.
 - 16) Nishimura N, et al. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J Virol Methods.* 2010 ; **163** (2) : 282-286.
 - 17) 武田正嗣, ほか. ノロウイルス検便検査における BL-NV「栄研」のスクリーニング性能評価. *日本食品微生物学会学術総会講演要旨集.* 2013 ; **34** : 65.
 - 18) 重本直樹, ほか. 2014-15 シーズンに広島県で検出したノロウイルス GII.17 と BLEIA 法による検出状況. *日本食品微生物学会学術総会講演要旨集.* 2015 ; **36** : 66.
 - 19) 藤田雅弘, ほか. 便からのノロウイルス検査における BL 採便容器の有用性評価. *日本食品微生物学会学術総会講演要旨集.* 2015 ; **36** : 36.
 - 20) 鈴木渉, ほか. 医療機関でのノロウイルス検査における BLEIA® 法の有用性評価. 平成28年度衛生環境研究所・食品安全検査センター業績発表会. 群馬県衛生環境研究所, 2017年3月.