



ONE POINT MEMO No.199

臨床検査ひとくちメモ

Q

迅速診断が可能なノロウイルスの
新しいキットが開発されたそうですが、
どのように利用したらよいでしょうか？

A

藍野学院短期大学

沖 津 祥 子

このキットは院内感染や施設内感染による急性胃腸炎の拡大を防ぐために開発されました。つまり医療・介護の場など患者のそばですぐ結果が出るのが目的です。

ノロウイルス感染症の診断はこのウイルス感染の潜伏期が1～2日と短いため、患者検体からウイルスを検出することによって確定されます。その方法として従来使われてきた方法はウイルス核酸を同定するPCR法です。しかし、この方法ですと結果が出るまでに半日ほどかかってしまい、迅速に診断結果を得ることはできません。そこで、この方法に替わって免疫学的手段による方法の開発が進められてきました。ここでは私たちの研究室で進めているイムノクロマトグラフィー・キット(IC)について説明します。

ノロウイルスは散発性乳幼児急性胃腸炎の原因ウイルスとして知られ、小児科外来で受診した患者について検査をするとロタウイルスに次いで検出頻度の高いことが知られています。疫学的には初冬(10～12月)に多く、この乳幼児胃腸炎での感染発端者の感染経路はわかっていません。一方、近年の

爆発的な大流行では年齢層を問わず感染者が出ていますが、特に問題視されているのは院内、施設内での集団感染です。感染経路は経口感染、接触感染、飛沫感染です。食物にウイルスが含まれていてそれを摂食した場合、ウイルスに汚染した手や物に食物が接触した場合、汚染した手で口唇にふれた場合などです。ノロウイルスでは特に少量のウイルス量で感染が成立することから、ウイルスを含む吐物をふき取ったつもりでいても残った少量の吐物が乾燥して空気中に舞い上がり、人の口に入って感染した例が知られています。以前は汚染された二枚貝を摂食することによる食中毒が注目されましたが、現在では特定の原因食品よりも上記のようなヒト→ヒト感染が多く、施設内感染ではいったん感染が起るとなかなか制圧することが難しい状況です。一方、食中毒としても、一件あたりの患者数が他の微生物原因の場合に比べ、多いことが知られています。

ノロウイルスはカリシウイルス科に属するウイルスで、この科の中でヒトに感染するウイルスとしては他にサボウイルスがあり、これも同じように急性胃腸炎を引き起こします。

ノロウイルスのゲノムは1本鎖RNAでその構造は3つの open reading frame (ORF) から構成されています。ORF1は非構造蛋白を、ORF2、ORF3はVP1、VP2という構造蛋白をそれぞれコードしています。エンベロープを持たない直径30～38nmほどの小さい粒子です。ノロウイルスの遺伝子型(genogroup)は5つに分けられています。そのうちヒトに感染するノロウイルスは主としてgenogroup I (GI) と II (GII) で、さらにそれぞれのgenogroupは多数のgenotypeに分けられており、30種以上が報告されています¹⁾。私たちが日本における乳幼児急性胃腸炎での疫学調査を10年間にわたり行った結果、5種類のGI、13種類のGIIが検出されましたが、最も多く検出されるgenotypeはGII/4で、その次に多いGII/3と合わせると、80～90%を占めることがわかりました^{2,3)}。一方、近年組換えウイルスが数多く報告されています。この多くはORF1とORF2の間で組換えが起こるものです。また、2006～2007年におけるノロウイルスの全世界的な流行ではこれまでのGII/4とは異なる変異型が検出されました。ノロウイルスの病原性に関する研究は後述するように試験管内培養が確立していない現在、困難を伴っています。ノロウイルスに対する細胞の受容体については、ABH血液型抗原などの糖抗原が関与することが知られており、genotypeにより結合する糖抗原が異なることが報告されていますが、細胞への侵入にかかわる真の受容体は別に存在すると考えられています。

現在まで一般的に使用されている検出法であるreverse transcription (RT)-PCR法は検体からウイルスゲノムであるRNAを抽出して、RT反応によりcDNAを作製し、PCR反応により増幅したDNAを検出するものです。使用するprimerは研究者によりさまざまですが、日本ではORF1からORF2領域にかかる比較的保存された領域を増幅するprimerが多く使用されています。PCR後、産物の配列決定を行い、標準株と比較することによりgenotypeの同定が行われます。

ウイルスゲノムの遺伝子型の違いは抗原性の相違となると考えられており、この免疫学的多様性は免疫学的検出試薬を作製するための障害となっています。また、ヒトに感染するノロウイルスは現在のところ実験室内で培養することができません。これは

大量にウイルス抗原を得ることができないということを含み、そのために抗体作製ができませんでした。そこで現在ではORF2にコードされるウイルスの表面蛋白(カプシド蛋白)の遺伝子をバキュロウイルスに組み込み、これを感染させた昆虫細胞から組換えカプシド蛋白(ウイルス様中空粒子：VLP)を大量に作製し、免疫抗原として利用するようになりました。一方、上記のようにノロウイルス感染に必要なウイルス量は非常に少なく、10～100個のウイルスがあれば感染は成立すると考えられています。このため感染拡大を防ぐために感度の高い検出法が求められるということになります。

私たちの研究室では検出頻度の高いGII/4とGII/3を検出するICの作製を試みました。GII/4の株を用いてVLPを作製し、これを免疫原としてモノクローナル抗体(Mab)を作製しました。GII/4以外にGIおよびGII合わせて15種類のgenotypeのVLPも作り、作製したMabの反応性を調べました。最も多くのVLPに対して反応したMabはGIで5種類中4種、GIIでは11種類すべてに反応しました⁵⁾。このMabとGII/3、GII/4をそれぞれ免疫原として作製した2種類のウサギポリクローナル抗体を用いて、ICを組み立てました(図1)。着色ラテックスビーズへの結合にはMabを、試験紙への結合にはポリクローナル抗体を用いています。この方法では臨床検体を付属の検体希釈液で希釈し、上清を規定量サンプルパッドに添加し、ラインを観察するまで30分以内で結果を得ることができます。コントロールラインの出現で検体が流れていることを確認します。すなわちコントロールラインとテストラインの両者が出現した場合を陽性と判定します(図2)。

臨床検体を用いてこのIC(アイピーノロ(IP-NoV)：イムノプローブ社より購入可)の評価を行いました。現在のところ、ノロウイルス検出法の標準法はRT-PCR法とされていますのでこの方法との比較を行いました。ただしRT-PCR法は前記のように検体中のノロウイルス核酸検出法で、ICはウイルス抗原を免疫学的に検出するもので原理は異なります。使用した検体は2004～2005年の日本各地の乳幼児急性胃腸炎の患者から得た503検体と、2006年のベトナムの乳幼児急性胃腸炎患者の104検体です。RT-PCR法との比較では感度79%と74%、特異度96%と100%、一致率92%と95%でした^{6,7)}。この

が期待されます。また、RNA ウイルスであるノロウイルスは変異を繰り返すことから、流行しているウイルスが検出できるか常にチェックする必要があると考えられます。

文 献

- 1) 片山和彦：ノロウイルスの遺伝子型
<http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>
- 2) Okame M, Akihara S, Hansman G, et al.: Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* **78** : 1318-1324, 2006.
- 3) Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children : Results from a one-year epidemiologic study. *Clin Lab*. **51** : 183-191, 2005.
- 4) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. Coexistence of multiple genotype, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* **42** : 2988-2995, 2004.
- 5) Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagyu F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II : Recognition of a novel conformational epitope. *J Virol*, **81** (22) : 12298-12306, 2007.
- 6) Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Hoang PL, Pham LD, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography test for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr*. **53** (4) : 264-269, 2007.
- 7) Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods*, **147** : 360-363, 2008.
- 8) Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* **45** : 3996-4005, 2007.