

新規に保険収載された検査法 ノロウイルス抗原迅速定性検査

Norovirus antigen detection Immunochromatography (IC) kit

た なか とも ゆき
田 中 智 之
Tomoyuki TANAKA

ノロウイルス体外診断薬「クイックナビ-ノロ」が平成24年4月1日、本邦で初めて保険収載された。Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法の構築からイムノクロマト法 (Immunochromatography, IC法) への開発に至るまでの経緯とキットの測定原理、感度・特異性、有用性とそれに伴う対医療費効果について解説する。

I. 背 景

ノロウイルスの臨床症状は下痢、嘔吐、腹痛を主症状とする急性胃腸炎症状である。しかし、急性胃腸炎の原因は広範囲で感染性微生物のみならず貝毒、キノコ毒 (毒成分) 等の自然毒そして化学物質に大別される。魚介類に原因があるものを動物性自然毒、キノコや高等植物に原因があるものを植物性自然毒という。化学物質による食中毒としてはメタミドフォス混入中国産餃子などの事例がある。

感染性微生物が原因であるものには、厚生労働省の食中毒事例統計によると、細菌性食中毒事例数が最も多い。病原性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラなどを主として多数の病原細菌が関与している。一方、ウイルス性食中毒ではノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス等が関与しているが、ノロウイルス感染事例が圧倒的に多い。またノロウイルス感染事例の特徴は、有症患者数が細菌性食中毒事例の2.5～4倍と高く、大規模感染の原因となっていることである。ノロウイルスは厚生労働省により平成9年5月31日、食中毒原因ウイルスとして食品衛生法に制定された。これは如何にノロウイルスの食の安全・安心への脅威、食品産業界へのインパクトが大きかったかが推測される。

これらの原因物質の特定は、自然毒分野では有毒

動植物喫食の有無を徹底的に疫学調査し、GC/MS/MSやLC/MS/MSの機器を用いて毒素 (毒素成分) を解析し判明できる。また、細菌では検体から細菌の分離培養・同定作業で原因菌が判明される。しかし、ノロウイルスはウイルス分離がいまだ不可能であるため他の原因物質の同定ほど簡単ではない。頻用されている確定診断はノロウイルス遺伝子検出であるが、長所は多くあるものの一般的な診断方法としては課題が残されている。ノロウイルスの感染力は強く多数の患者発生がみられ、健康危機管理対策上から迅速かつ簡便な診断方法の開発が早くから囑望されていた。

ノロウイルス診断方法の構築を解説する前に、ノロウイルス発見から診断法の開発までの歴史的背景について少し触れてみる。

感染性胃腸炎の原因としてウイルスが関与していることは古くから推測されていた。そして、ウイルスの関与の証明は電子顕微鏡を活用することによって1970年代後半から1980年代前半にかけて盛んに報告された。Montgomery county agent, Hawaii agent, Snow Mountain agent, Taunton virus, W agent, Toronto virusや本邦では音更 (おとふけ) 因子などがその例である。急性胃腸炎の原因ウイルスとして登場した決定的な事例は1968年米国Ohio州、Norwalk市の小学校で発生した集団急性胃腸炎事例であった。2日間で小学生232名の内50%が発病した。患児との家族内接触感染も32%にも及んだ。疫学的調査からその潜伏期は約48時間と推定された。この事例は1972年にNorwalk virusとして報告された¹⁾。疫学調査および原因ウイルスの感染実態の解明のために、ウイルスの検出とともに患者血清抗体価の上昇の証明を免疫電子顕微鏡法で行った。即ち患者糞便検体に含まれたウイルスを患者ペア血清で

それぞれ反応させ、ウイルスの抗原抗体凝集塊を電子顕微鏡で観察しその反応性をスコア化して診断するものであった。上述の他の因子に先駆け Norwalk virus だけがひのき舞台上に登場したのは、このように滞ることなく行われた科学的解析の賜物であったと言えよう。付随的に同様の原則を用いて当時開発された Radioimmunoassay (RIA) 法や初期の ELISA 法は、使用する回復期患者抗体に多くの課題があり、再現性も含めて汎用されるには至らなかった。

1990年、Xi Jiang, Estesらによってノロウイルス遺伝子のクローニングがなされた²⁾。このウイルスの持つ3個のORFの内ORF 2, ORF 3がノロウイルス capsid 蛋白の発現を担うことが判明し、Baculovirus 発現系でノロウイルスと同様のウイルス様粒子 (Virus-like particles ; VLPs) が発現された³⁾。このVLPsは野生のノロウイルスと形態学的、抗原的に同様のものであることが判明し、診断面への応用のみならずウイルス形態学研究が劇的に進展した。

われわれはこのVLPsを用いてノロウイルス特異抗体を作製し抗原検出法の開発を行った。

検査法の評価を理解していただくためにノロウイルスについて簡単に述べることにする。

II. ノロウイルスの特徴

ノロウイルスはカリシウイルス科に分類されている。38nmの小型球形ウイルスで一本鎖RNAを持つ。エンベロープを持たないため環境中では安定して生物活性を保持している⁴⁾。遺伝子学的にはノロウイルスは5つの遺伝子群, Genogroup I~Genogroup Vに分類されている⁵⁾。人に感染するノロウイルスはGenogroup I, Genogroup II, Genogroup IVであるが、Genogroup I, Genogroup IIがほとんどである。Genogroupはさらに遺伝子型, Genotype, に分類される。最近の情報では、Genogroup IにはGenotype 1~19 (GI.1~GI.19), Genogroup IIにはGenotype 1~22 (GII.1~GII.22)が存在している⁶⁾。それぞれのGenotypeは分子系統樹ではクラスターを形成している。人への感染動態ではGII.4が流行の主流となっている。GII.4は遺伝子変異を繰り返すことが特徴である。すなわちウイルス遺伝子のポリメラーゼと capsid 領域の組み換えによるキメラウイルスの出現、そしてウイルス粒子の最外殻に存在するカ

プシド蛋白の変異である。この巧妙な抗原変化はウイルスが人の免疫淘汰圧から逃避するための手段で大きな流行を通じて存続する要因と考えられている^{7~9)}。

III. ノロウイルス抗原検出キットの測定原理・特徴

抗原検出に不可欠な抗体はVLPsを用いて作製されたモノクローナル抗体を使用した。ノロウイルスのPrototypeであるNorwalk virus, GI.1, から作製したVLPsを免疫源としてマウスモノクローナル抗体を作製した。作製された抗体から上記の二つのGenogroupを含めて多数のGenotypeと広範囲に交差反応する抗体が得られた^{10~12)}。ELISA法では、精製された抗体を96穴プレートに抗原捕捉抗体として固相した。検体と反応後、検出抗体にはHRPO標識抗体を用い、洗浄過程を経てわれわれはABTS + H₂O₂で発色、分光光度計にて測定した。検出感度と特異性向上のためにいくつかのモノクローナル抗体をカクテル化して捕捉・検出抗体とした。

一方、IC法の測定原理はELISA法と同様であるが、差異は96穴プレートの代わりにセルロース膜を使用していることである。呈色にはABTS + H₂O₂の代わりにLatex粒子標識検出抗体を用いた。測定方法と目視による診断の実例を示す(図1, 写真1)。

両者の測定過程の長短を比べると、ELISA法は測定時間が約2時間半必要だが90検体以上を同時に測定できる。これに対しIC法は約15分と迅速性に判定できるが、多検体処理には不適である。これまでRT-PCR法、ELISA法や報告されているいくつかのIC法には検体前処理として10%糞便ホモジネートの作製が不可欠である^{13,14)}。しかし、改良されたわれわれのIC法では10%糞便ホモジネートは不要で、直接綿棒に付着させた糞便をチューブ内で緩衝液と混和しデバイスに滴下して検査できる。遠心機が不要なため、医療機関の外来診療等の医療現場、老人介護施設等でのベットサイドで、また学校・保育園などの事例発生現地において検査可能となった。15分後の判定結果により感染拡大防止に迅速な対応がとれるようになった。

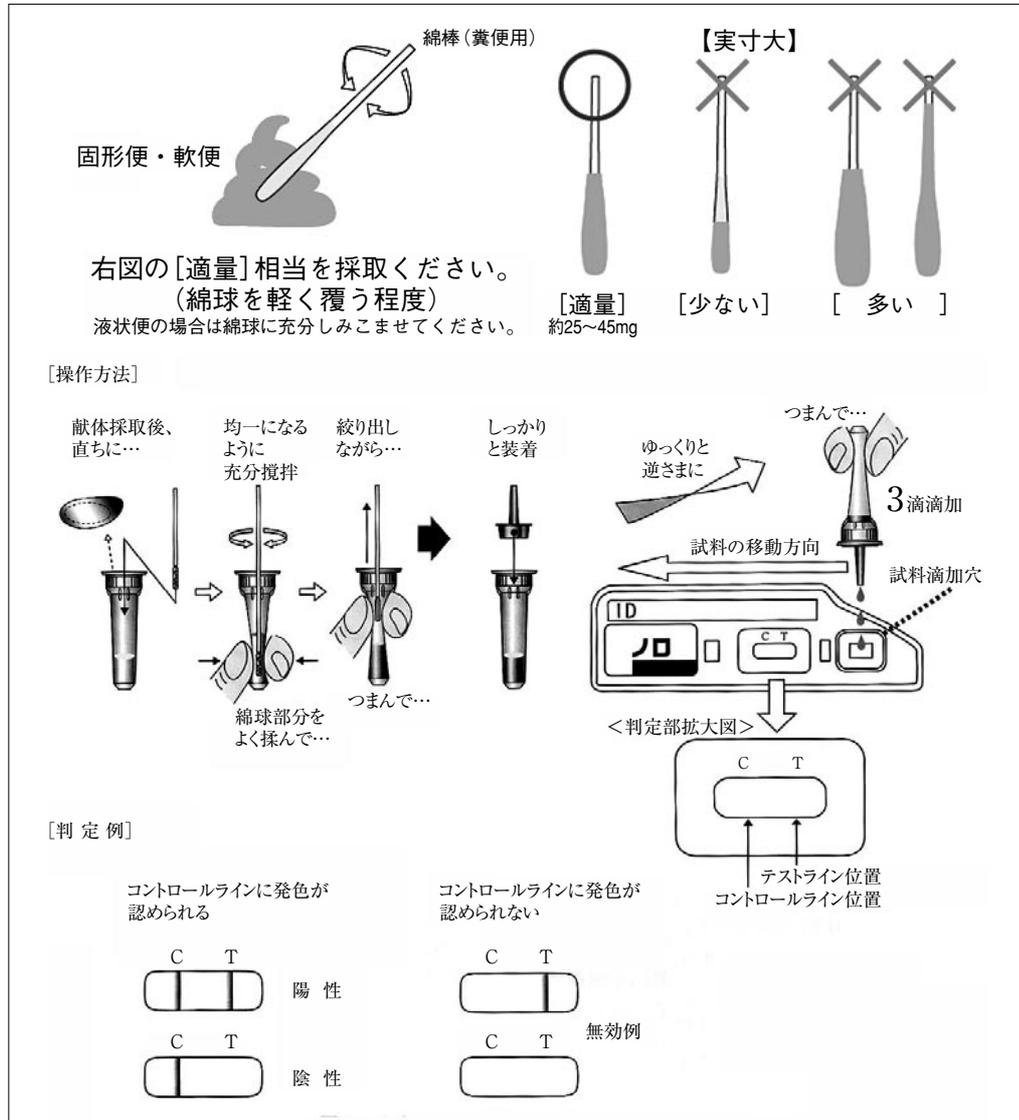


図1 IC法によるノロウイルス測定方法

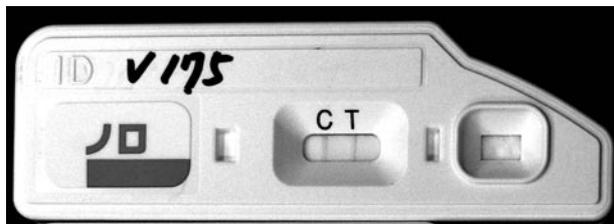


写真1 ICキットの反応様式

C：コントロールライン、T：検体との反応ライン
最右側は検体挿入窓

IV. 感度と特異性

RT-PCR法をノロウイルス検出ゴールド・スタンダードとして、IC法と比較すると、感度は81.6%、特異性は96.6%であった¹⁵⁾。このキットはGenotype別

を認識する測定キットではなく、2つの Genogroup に属するノロウイルス抗原を検出するキットである。実際、検出する遺伝子型を見ると、GIでは、GI.1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11の8遺伝子型、GIIでは、GII.1, 2, 3, 4 (2002, 2003, 2004, 2006a, 2006b), 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17の15遺伝子型を検出している。また、VLPsを用いて検出下限抗原量をみると、Genogroup Iでは6.25ng/mL、Genogroup IIでは0.78ng/mLであった¹⁵⁾。

一方、検体中のウイルス抗原量の検出限界は $10^5 \sim 10^6$ コピー/糞便gであった。また、ICキットは便中の *E.coli* (O6, O126, O114, O157), *Salmonella* 属、*Campylobacter* 属を含めた19種の細菌や、ロタウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス等との交差反応は認められていない¹⁵⁾。検出感度、特異

度は他のIC法と大きな差は見られない^{13,14)}。

なお、RT-PCR法を対照としたELISA法の感度、特異性はそれぞれ、85.2%、100%である¹⁶⁾。

V. キットの課題

ノロウイルス抗原検出キットでは、その種類にかかわらず偽陰性、偽陽性対策を含めた感度向上、特異性向上は永遠的に続く課題である。本ICキットでは、偽陰性の原因として検体中のウイルス濃度が大きく左右している。すなわち、検体中には $10^5 \sim 10^6$ コピー/ml以上のウイルス量が必要であることが判明した。このウイルス量(コピー数)は、われわれの長期間に亘る追跡患者症例では、発症後5~7日以内の便中に含まれていることが確認された¹⁷⁾。したがって検体採取を早期に実施すること、あるいは複数検体を採取することによって陽性率が高くなる可能性が高くなることが分かった。

一方、偽陽性例では、浣腸便を使用した場合、嚥下補助食品を摂取した便である場合、それに生後間もない新生児便の場合、その確率が高くなることが分かった¹⁸⁾。多分、排便時に排泄される腸管内上皮細胞成分の影響によるものと考えられたが、真の要因は確認されていない。

現在、ICキットは特に偽陽性対応に向けた解決方法が検討され、ほぼ原因解消に達している。

VI. キットによる対医療費効果

食中毒を含めた感染性胃腸炎患者には、冒頭でも述べたように、細菌性胃腸炎、ウイルス性胃腸炎、その他の胃腸炎との鑑別が重要である。発症頻度は前二者が圧倒的に高いが、実際の識別は困難である。しかし、細菌性胃腸炎とウイルス性胃腸炎との鑑別診断は、その後の治療内容が大きく左右される点で重要である。他のIC法では、ノロウイルス遺伝子型識別が可能とされているが、感染症発生初期の対応において遺伝子型の識別は不要である。最も迅速に求められているのは、ノロウイルスに起因するものか、あるいは細菌由来かの鑑別である。

図2に急性胃腸患者におけるノロウイルス検査のフローチャートの一例を示すが、外来受診時におけるこれだけの検出操作の差で多額の対医療費効果が試算されている。

おわりに

2005年にELISA法がノロウイルス体外診断試薬として厚生労働省に初めて認可された。その後、より迅速性を持つ診断キットとしてIC法が開発され、2012年4月に保険収載、ノロウイルス体外診断試薬となった。しかし、すべての胃腸炎患者対象では

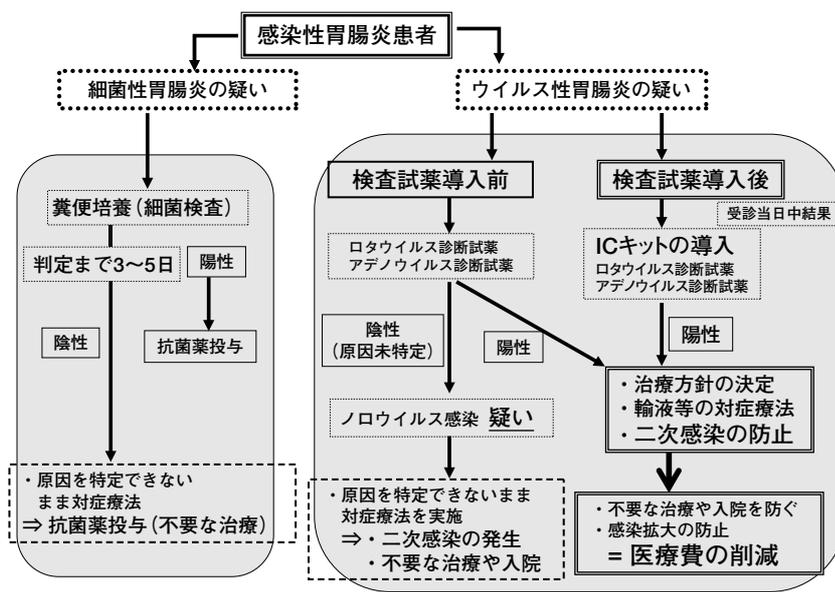


図2 ノロウイルス検査フローチャート

なく3歳未満の乳幼児、65歳以上の高齢者を対象としている。これらの年齢は、いわゆるノロウイルスハイリスクグループであり、病状の重症化が懸念されるため保険適応のもと健康の安全・安心に貢献するという意図の判断と推察される。

IC法のメリットは15分で迅速に鑑別診断を含めた診断が下され、患者の早期治療や感染の発端者対応を迅速に行うことができ、感染力の強いノロウイルスの二次感染防止を有効的に遂行できるものと思われる。

このIC法はRT-PCR法に比し、感度、特異度に数パーセントの隔たりがあり、この差を縮めるべく、今後も絶え間ない工夫を重ね改良すべき課題であるが、最近改良されたノロウイルス測定キットは高い検出感度と特異性を有し、且つ直腸便の測定が可能になった点は医療現場への大きな貢献が期待される。

補追：

本稿の校正時に改良中のノロウイルスICキット(クイックナビ™-ノロ2)が完成したので結果を追加する。

改良キットは、RT-PCR法との比較では、一致率94.2%、感度92.0%、特異性98.3%と検出効果の向上が達成された。また、便検体においてもこれまでの患者排泄便に加えて綿棒による直腸便も検出可能となった。その感度は90.2%、特異性は100%である。

文 献

- 1) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al : Visualization by immuno electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10** : 1075-1081, 1972.
- 2) Jiang X, Graham DY, Wang K et al : Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* **250** : 1580-1583, 1990.
- 3) Jiang X, Wang M, Graham DY et al : Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid. *J Virol.* **66** (11) : 6527-6532, 1992.
- 4) Glass RI et al : Current concept : Norovirus gastroenteritis. *N Eng J Med.* **361** : 1776-1785, 2009.
- 5) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al : Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **15** : **346** (2) : 312-328, 2006.
- 6) Personal communication (国立感染症研究所ウイルス2部 片山和彦)
- 7) 本村和嗣, 横山 勝, 岡 智一郎 他 : ノロウイルスゲノム解析と流行発生のおくみ. *感染症学雑誌* **86** (5) : 563-568, 2012.
- 8) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hiroataka Ode et al : Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol.* **84** (16) : 8085-8097, 2010.
- 9) Bull RA, Tu ETV, McIver CJ et al : Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* **44** : 327-333, 2006.
- 10) Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, et al : Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol.* **40** (7) : 2459-2465, 2002.
- 11) Tanaka T, Kitamoto N, Jiang X, et al : High efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant norwalk virus-like particles. *Microbiol Immunol.* **50** (11) : 883-888, 2006.
- 12) Parker TD, Kitamoto N, Tanaka T et al : Identification of Genogroup I and Genogroup II Broadly Reactive Epitopes on the Norovirus Capsid. *J.Virol.* **79** (12) , 7402-7409, 2005.
- 13) Geginar G, Kaiser D, Schrempf S.: Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatography assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **31** (5) : 733-737, 2012.
- 14) Khamrin P, Nguyen TA Phan TG et al : Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Method.* **147** (2) : 360-363, 2008.
- 15) 田中智之、田尻 仁、奥田真珠美 他 : ノロウイルス抗原迅速診断薬クイックナビ™-ノロの評価. *医学と薬学.* **61** (5) : 779-785, 2009.
- 16) 田中智之 : 改良ノロウイルス抗原検出EIAキットの評価. *医学と薬学.* **61** (1) : 93-98, 2009.
- 17) 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥 他 : 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.* **56** : 9-15, 2006.
- 18) Wieehers C, Bissinger AL, Hamprecht K, et al : PERINATAL/NEONATAL CASE PRESENTATION Apparently non-specific results found using a norovirus antigen immunoassay for fecal specimens from neonates : *J Perinatology.* **28** : 79-81, 2008.