

糞便検体におけるノロウイルス迅速検出法の研究

Pattara Khamrin^{1,2)}, Aksara Thongprachum²⁾, Niwat Maneekarn¹⁾,
沖津祥子²⁾, 牛島廣治²⁾, 早川 智²⁾

Study on the rapid detection for Norovirus genome in stool samples

Pattara Khamrin^{1,2)}, Aksara Thongprachum²⁾, Niwat Maneekarn¹⁾,
Shoko OKITSU²⁾, Hiroshi USHIJIMA²⁾, Satoshi HAYAKAWA²⁾

要旨

ノロウイルス感染は小児あるいは成人における急性下痢症の原因として極めて重要である。本症自体は予後良好の疾患であるが、感染力が強く迅速な確定診断にも基づく適切な衛生管理が要求される。本研究ではヒト糞便検体を用いRT-PCRダイレクトシークエンス法とイムノクロマトグラフィ法と比較を行い、後者が十分な感度と特異性を有することを明らかにした¹⁾。

1. はじめに

ノロウイルスはエンベロープを持たない直径30-38 nmの正二十面体ウイルス粒子に7,500塩基対のプラス鎖の一本鎖RNAゲノムを有する一群のウイルスである。近縁に同じくカリシウイルス科のサポウイルスがあり、ともに経口感染によって小児・成人に嘔吐、下痢などの急性胃腸炎症状を起こす。ノロウイルス感染は全世界的に分布し、年間2億人以上が罹患する²⁻⁴⁾。多くは数日の経過で自然に回復するが時に重篤化し、感染力が強いことから秋口から春先に集団発生することも多い。感染者の糞便・吐瀉物およびこれらに汚染された物品類、汚染された食品（特に加熱不十分な場合）が感染源の代表的なものであるが、稀に飛沫感染の報告もある。老人施設や医療機関などでの集団発生も多く、迅速な診断と衛生管理が要求される。ノロウイルスは培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないため、診断にはウイルス遺伝子やウイルスタンパクの検出が必須である。我々は本研究において、現時点でベッドサイドでの応用が可能な三つのイムノクロマトグラフィとRT-PCR法の感度と特異性を比較検討した。

2. 対象と方法

本人と採取医療機関、日本大学医学部倫理委員会、バイオリスク管理委員会の許諾を得て、2011年から2012年に日本国内の7箇所の医療機関で採取された50例のウイルス腸炎の糞便検体を対象とした。（ノロウイルス30例非ノロウイルス20例）対象は全て急性下痢症の他には大きな合併症や既往歴のない患者である。検体は採取後に不活化し既に報告した方法に従って日本大学でRNAの簡易抽出、逆転写とPCR増幅を行った⁵⁾⁶⁾。ノロウイルスの遺伝子解析はWeb-based NoV genotyping toolを用いた。さらにウイルスの混合感染を検討するため、我々の開発したMultiplexPCR法によってgroup A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, enterovirus, bocavirus, and human parechovirusの検出を行った。ノロウイルスタンパクの検出は国内で市販される3つのイムノクロマトキット（GEテスト イムノクロマトーノロ（ニックスイ）、イムノキャッチ®ーノロ（栄研）、クイックナビ™ーノロ（デンカ生研））を使用した。

1) チェンマイ大学医学部微生物学講座

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

表 3 つのイムノクロマト法によるノロウイルス検出結果

NoV IC	ImmunoCatch-Noro	Quick Navi-Noro 2	GE test Noro Nissui
Sensitivity (%)	96.7	96.7	93.3
Specificity (%)	100	100	100
Positive predictive value (%)	100	100	100
	Positive/Negative	Positive/Negative	Positive/Negative
NoV GII.3 (<i>n</i> = 2)	2/0	2/0	1/1
NoV GII.4 (<i>n</i> = 24)	23/1	23/1	23/1
NoV GII.4 + HBoV (<i>n</i> = 1)	1/0	1/0	1/0
NoV GII.14 (<i>n</i> = 2)	2/0	2/0	2/0
NoV GII.14 + HBoV (<i>n</i> = 1)	1/0	1/0	1/0
Non-NoV (<i>n</i> = 20)	0/20	0/20	0/20
Total (<i>n</i> = 50)	29/21	29/21	28/22

3. 結果

ノロウイルス感染がPCRで確認できた30検体において、GEテスト イムノクロマトーノロ、イムノキャッチ®ーノロ、クイックナビ™ーノロは各々29,28,29例が陽性であり、感度は96.7, 96.7,93.3%であった。非ノロウイルス腸炎では全てが陰性であり、特異性はいずれも100%であった。ノロウイルス陽性例では3つの遺伝子型すなわちGII.3, GII.4, GII.14のいずれかを検出したが、2例はボカウイルス(HBoV)とGII.4あるいはGII.14の混合感染であった。

4. 考察

ノロウイルスの培養が現時点では不可能なことから、RT-PCRとダイレクトシークエンスが確定診断の決め手であるが、核酸抽出とPCR増幅、シークエンスは第一線の市中病院では容易になし得るものではない。固相化した抗体の発色反応を利用したイムノクロマト法は近年、インフルエンザやB型肝炎など多くのウイルス感染症のベッドサイド診断に応用されているが、本研究より市販されているキット全てが高い感度と特異性を有することが判明した。各々1-2例の偽陰性例が存在したが陰性例ではウイルスコピー数が少なく、検出感度に達しなかった可能性がある。この点を考慮すると、臨床的にノロウイルス感染が疑われる場合は複数回の検査を繰り返すことが重要と考えられた。

5. 結語

糞便を用いたノロウイルスの迅速診断にはイムノクロマト法が有用であるが、感度の点でRT-PCRに及ばない事がある。臨床的に強くこれを疑う場合は複数回の解析を行うことが推奨できる。

文献

- 1) Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Comparison of three rapid tests for detection of norovirus in stool samples of acute gastroenteritis pediatric patients. *J Trop Pediatr*. 2014 Dec; **60**(6): 481-3. doi: 10.1093/tropej/fmu046.
- 2) Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW, et al. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect* 2013; **141**: 1563-71.
- 3) Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 2008; **225**: 190-211.
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センターノロウイルス <http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/>
- 5) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, et al. A novel RT-multiplexPCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2010; **169**: 193-7.
- 6) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, et al. Detection of norovirus(GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *Journal of Tropical Pediatrics* Vol. 60, No. 6 *J Virol Methods* 2003; **114**: 37-44.