

胃腸炎ウイルスの研究

—ノロウイルス迅速検査キットの評価と食中毒原因究明調査における利用の可能性—

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司 (ウイルス科)

【調査研究】

胃腸炎ウイルスの研究

—ノロウイルス迅速検査キットの評価と食中毒原因究明調査における利用の可能性—

Studies on Viruses Causing Non-bacterial Gastroenteritis in Okayama

—Estimation of Immunochromatography for Detection of Norovirus on Foodpoisoning research—

濱野雅子, 藤井理津志, 葛谷光隆, 木田浩司 (ウイルス科)
Masako Hamano, Ritsushi Fujii, Mitsutaka Kuzuya, Kouji Kida

要 旨

2008年4月～2010年3月に発生した集団胃腸炎16事例の糞便63検体を用いて、採取病日と便性状の観点から解析すると同時にリアルタイムRT-PCR法によりノロウイルス(NoV)検出を実施した。採取病日は第1～8病日で、83.0%が第4病日以内であった。便性状は、軟便、水様便、泥状便のほか、正常便もみられた。NoVは、90.5%から検出され、すべてGenogroup IIであった。検出率は、第4病日以降はやや低下傾向、便性状別でも便性状の改善とともに低下傾向が見られた。PCR陽性検体40件により、イムノクロマト(IC)法を用いたNoV市販迅速検査キットの評価を行ったところ、PCR陽性検体の42.5%を捕捉可能であった。PCRとの陽性一致率は、便性状の改善とともに低下傾向が見られた。IC法は、リアルタイムPCR法との検出感度差はあるものの、被害拡大防止が重要な食中毒事例等の調査においては、その迅速性を生かして有用な検査補助手段となりうると考えられた。

[キーワード：ノロウイルス, リアルタイムRT-PCR法, イムノクロマト法, 食中毒]

[Key words : Norovirus, Real-time RT-PCR, Immunochromatography, Foodpoisoning]

1 はじめに

ウイルス性胃腸炎の主要な原因の1つである小型球形ウイルス(SRSV)のうち、感染症対策と食品衛生対策の両面で最も行政ニーズの高いノロウイルス(NoV)の検出は、通常、リアルタイム法を含む逆転写PCR(RT-PCR)法¹⁾で実施される。この方法は、高感度ではあるが手技が複雑で、結果判明までに最短でも数時間を要する。一方、近年、NoVの体外診断用薬品として、イムノクロマト(IC)法を用いたキットが市販されるようになった。このキットは、感度はRT-PCRに劣るものの、手技が簡便で機器を必要とせず、30分程度で結果が得られるのが利点である。

2009年度は、新型インフルエンザの流行により食中毒発生時のノロウイルス検査対応の困難が危惧されたため、検出補助手段として市販迅速キットの評価を行い、食中毒原因究明調査における利用の可能性をさぐった。

2 材料と方法

(1) 対象

2008年4月～2010年3月に県内で発生した集団胃腸炎16事例(食中毒9, 有症苦情6, 感染症1)の糞便63検体を使用した。

(2) 方法

まず、集団事例においてどのような検体が搬入されているかを、検体採取病日と便性状の観点から解析した。ついでRT-PCRによりNoV検出を行い、検出状況と検体採取病日・便性状との関係を調べた。さらに、NoV陽性検体についてIC法を実施し、その検出状況と病日・便性状との関係を調べた。

糞便は、発症日と検体採取日の情報から病日を算定し、また、その性状により、正常便、軟便、泥状便、水様便の4つのカテゴリーに分類した。

NoVの検出RT-PCRは、既報と同様に平成15年(2003年)11月5日付け食安監第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知²⁾に準拠して

リアルタイム法¹⁾で実施した。すなわち、糞便を前処理し、核酸自動抽出装置(QIACube, QIAGEN社)でRNA抽出を行った。抽出されたRNAは、oligo-dT primer (Invitrogen社)とpd(N)6 random hexamer (Takara Bio社)により逆転写を行い、c-DNAを合成した。PCRは、2008年4月～2009年4月はLightCyclerシステム3302(ロシュ・ダイアグノスティックス社)とQuantiTect Probe PCR(キアゲン社)を、それ以降は、StepOnePlusとGene Expression Master Mix(いずれもライフ・テクノロジーズ ジャパン社)を用いて実施した。

また、NoVのIC法による検出は、クイックナビTMノロ(デンカ生研社)を用いてキット添付文書³⁾に準拠して実施したが、検査条件を一定にするため、検体量および滴下濾液量は同一量とした。すなわち、糞便0.03gをキットの検体浮遊液に浮遊させてフィルター濾過後、濾液100 μlをテストデバイスの試料滴下穴に滴下し、15分後に判定した。

3 結果

(1) 集団事例における搬入検体とNoVの検出状況

糞便検体61件中病日不明の2件を除く59件の検体採取病日は、第1～8病日で、各病日の検体数はそれぞれ、1, 9, 22, 20, 3, 3, 0, 1件で、第3病日採取が最も多く37.3%、次いで第4病日が33.9%であった。全体の83.0%に当たる49件が第4病日以内の採取検体であった(図1)。便性状は、軟便が最も多く25件(39.7%)、次いで水様便15件(23.8%)、泥状便12件

(19.0%)、正常便11件(17.5%)の順であった(図2)。

NoVは、63件中57件(90.5%)から検出され、すべてGenogroup IIであった。検体採取病日別では、66.7～100.0%の検出率であったが、第1～3病日採取の検体では検出率100.0%であるのに対して、第4病日では85.0%とやや低下した。最もおそい病日でNoV陽性となったのは、第8病日採取の1検体であった(図1)。便性状別のNoV検出率は、72.7%～100.0%であった。このうち、水様便と泥状便では100.0%であったのに対して、軟便では、88.0%、正常便では72.7%と、便性状が改善するにつれて検出率が低下する傾向が見られた(図2)。検出されたNoVのうち、49件についてはGenotypeが決定され、G II/4が37件で最も多く、次いでG II/2が6件、G II/6が5件、G II/12が1件であった。

(2) PCR陽性検体におけるIC法によるNoV検出状況

PCRでNoV陽性となった検体40件を用いて、IC法市販キットによるNoV検出を実施した。使用検体の一覧を表1に示す。

40件中17件(42.5%)がPCR法と一致して陽性であったが、2件(5.0%)はキットの判定基準を満たさず、「判定不能」であった。検体採取病日別では、16.7～100.0%の陽性一致率であったが、採取病日による陽性一致率の傾向は認められなかった。最もおそい病日でNoV陽性となったのは、第6病日採取の1検体であった(図3)。便性状別の陽性一致率は、20.0%～55.6%であった。このうち、水様便と泥状便ではそれぞれ50.0%、55.6%であったのに対して、軟便では、35.3%

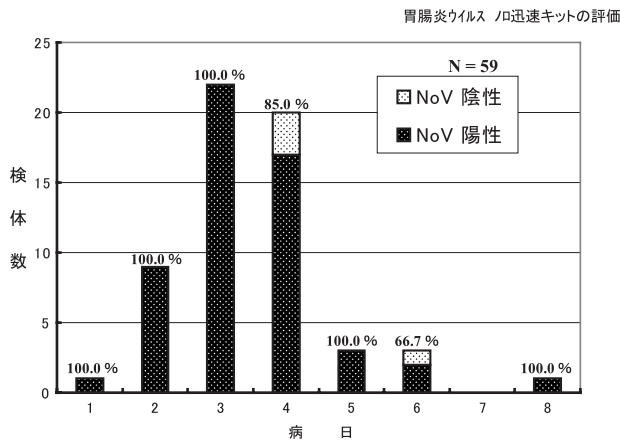


図1 PCR法による病日別NoV検出状況
(各カラム上に陽性率を表示)

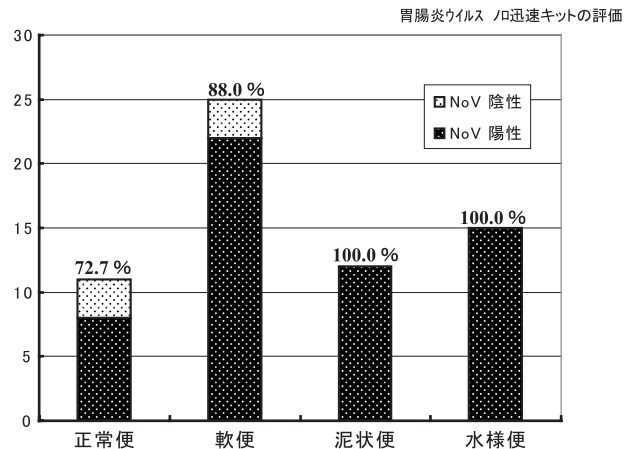


図2 PCR法による便性状別NoV検出状況
(各カラム上に陽性率を表示)

正常便では20.0%と、便性状が改善するにつれて一致率が低下する傾向が見られた(図4)。「判定不能」となった2件の採取病日は第3病日と第6病日で、便性状はいずれも軟便であった。IC法によるGenotype別の検

出状況では、G II/4で14/22(63.6%)と高率に検出された以外はG II/2が1/6(16.7%)検出されたのみで、G II/6の4件、G II/12の1件はいずれも陰性と判定された。

表1 IC法によるNoV検出に供試したPCR陽性検体

No.	事例	病日	便性状	NoV 遺伝子型	IC法
1	K	2	泥状便	G II/4	+
2	K	4	軟便	G II/4	+
3	K	3	水様便	G II/4	+
4	K	3	水様便	G II/4	-
5	K	4	泥状便	G II/4	-
6	J	4	泥状便	G II/4	-
7	J	5	水様便	G II/4	+
8	H	4	軟便	G II/6	-
9	H	5	軟便	G II/6	-
10	G	6	軟便	G II/4	判定不能
11	G	4	泥状便	G II/4	-
12	G	4	軟便	G II/4	+
13	F	5	軟便	G II/4	+
14	F	4	泥状便	G II/4	+
15	F	6	泥状便	G II/4	+
16	E	3	泥状便	G II/4	+
17	E	2	軟便	G II/4	-
18	D	8	軟便	G II/12	-
19	C	2	泥状便	G II/6	-
20	C	2	軟便	G II/6	-
21	B	4	軟便	不明	-
22	B	4	水様便	不明	-
23	A	3	軟便	不明	判定不能
24	M	3	泥状便	不明	+
25	M	3	水様便	不明	+
26	M	3	軟便	G II/4	+
27	M	3	水様便	G II/4	-
28	N	3	正常便	G II/2	-
29	N	3	軟便	G II/2	+
30	N	3	正常便	G II/2	-
31	O	1	軟便	G II/4	+
32	O	2	水様便	不明	-
33	P	4	軟便	G II/2	-
34	P	3	軟便	G II/2	-
35	P	3	軟便	不明	-
36	P	2	正常便	G II/2	-
37	Q	4	正常便	G II/4	+
38	Q	3	水様便	G II/4	+
39	Q	3	水様便	G II/4	+
40	Q	3	水様便	G II/4	-

4 考察

食中毒発生時には、被害拡大防止の観点から行政措置を可及的速やかに行うことが必要で、患者検体から迅速に病原因子を検出することが求められる。迅速な検出のためには、検体中に少なくとも検出限界以上の病原因子が存在することが不可欠であり、適切な検体の採取搬入が重要となる。食中毒を含む集団胃腸炎事例発生時に搬入された患者等の糞便検体について、採取時期と性状を調べたところ、80%以上が発症後4日以内に採取されたものであり、便性状も80%以上が、程度の差はあるが正常とは言いがたい性状を呈するものであった。これらの検体のPCRによるNoV検出状況を見ると、検出率は90%を超えており、現在PCRによるNoV検出に供されている検体の採取方法には、特に問題はないと考えられる。

一方、NoV陽性検体を用いてIC法による検出を行ったところ、リアルタイムRT-PCR陽性検体の42.5%を捕捉可能であった。キット添付文書³⁾の記載によれば、RT-PCR法との陽性一致率は81.6%とされており、今回の結果はそれよりかなり低かった。これは、今回比較対象としたリアルタイムRT-PCR法の感度が通常のRT-PCR法よりも高く、後者では陰性となる検体も前者では陽性となるため、相対的にIC法の陽性一致率が低下したのと考えられる。IC法によるNoV検出状況と検

胃腸炎ウイルス / 迅速キットの評価

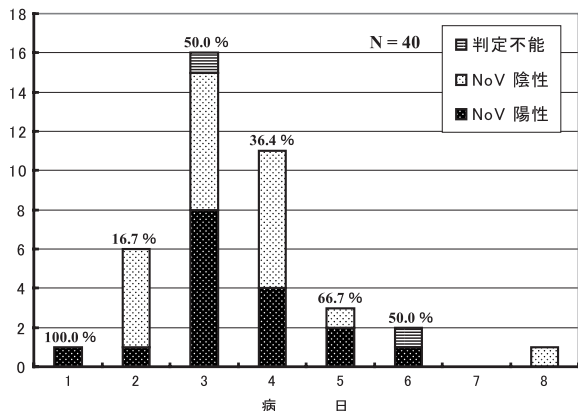


図3 PCR法陽性検体におけるIC法による病日別NoV検出状況 (各カラム上に陽性率を表示)

胃腸炎ウイルス / 迅速キットの評価

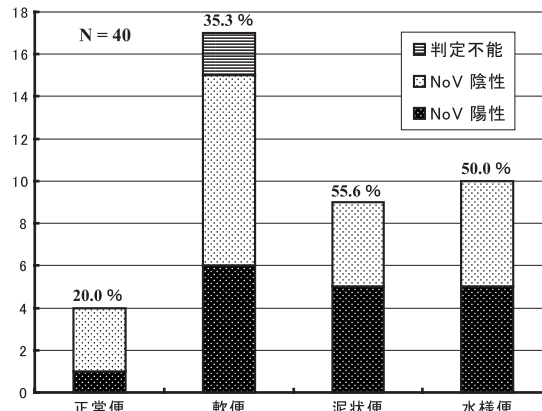


図4 PCR法陽性検体におけるIC法による便性状別NoV検出状況 (各カラム上に陽性率を表示)

体の採取時期および便性状の関係では、採取病日と陽性一致率との間に明瞭な関連性は見られなかったのに対し、便性状とでは、便性状の改善に伴って一致率が低下する傾向が見られた。これは、正常便では患者糞便中のウイルス量自体が少ない可能性が高いこと、正常便などの含水量のより少ない検体では、抗原抗体反応等を阻害する物質の濃度が相対的に高い可能性があり、単純化されたIC法の前処理工程では除去しきれないこと等が考えられた。

今回の結果より、リアルタイムPCR法での陽性検体の4割を捕捉できたこと、PCR陰性検体を陽性と判定する率は5%以下である³⁾とされることから、実際の食中毒の調査においてIC法の結果を利用する場合、陰性の場合には参考にはならないものの、ある程度以上の率(患者検体5~6件中少なくとも複数検体)で陽性となれば、NoVの関与を考慮できると考える。また、便性状と陽性一致率に関連性が見られたことから、便性状により検査対象を選択すれば、NoV検出率がさらに上昇する可能性がある。IC法は、感度が低い、遺伝子群別ができない等PCR法

より劣る点もあるが、30分以内に判定可能というその迅速性から、一定量以上のウイルス含有が予想される患者糞便においては、一定の条件の下に有用な検査補助手段となりうるものと考えられた。

文 献

- 1) Kageyama,T., Kojima,S., Shinohara,M., Uchida,K., Fukushi,S., Hoshino,F.B., Takeda,N., Katayama,K. : Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：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
- 3) デンカ生研株式会社体外診断用医薬品添付文書：ノロウイルス抗原キット「クイックナビTM—ノロ」，2010年1月改訂(第4版)