

[原 著]

ノロウイルス感染症におけるイムノクロマト法と PCR 法についての検討

久田綾子¹⁾・永春圭規²⁾・山本秀二³⁾・楠原 一⁴⁾
根来麻奈美⁵⁾・谷口清州⁵⁾・星野賢一郎³⁾・中村紀代美¹⁾

¹⁾ 医療法人社団主体会小山田記念温泉病院臨床検査部

²⁾ 三重大学医学部附属病院血液内科

³⁾ 医療法人社団主体会小山田記念温泉病院内科

⁴⁾ 三重県保健環境研究所衛生研究室微生物研究課

⁵⁾ 国立病院機構三重病院臨床研究部

(令和 4 年 3 月 31 日受付, 令和 4 年 5 月 16 日受理)

ノロウイルス感染症の診断におけるイムノクロマト法 (IC 法) の感度はウイルス量や genotype によって変化することが報告されているが, データは十分ではない。我々はノロウイルスに対する IC 法の検出感度に与える影響について前方視的に解析を行った。2016 年-2018 年の間, 臨床症状からノロウイルス感染症が疑われる患者 263 名を対象に IC 法と real time PCR (以下 PCR) 検査の一致率ならびにウイルス量・genotype・発症から検査までの時間経過が IC 法の結果へ与える影響について検討した。IC 法と PCR 法の陽性・陰性一致率は 58.1%, 100% であった。PCR 陽性患者のうち IC 法陽性は陰性と比較して有意に Ct 値 (Threshold Cycle) が低く, Ct 値が高くなるにつれ IC 法の偽陰性率が増加した。GII.4 Sydney2012 (n=82), GII.2 (n=19) の genotype 毎の IC 法と PCR 法の陽性一致率は 61.0%, 52.6% であった。また発症から検査実施までの日数別に解析した結果, 2 日目以降の IC 法では陽性率が高く, 発症当日の Ct 値は高い傾向であった。症状別における IC 法の陽性率に差はなかった。実臨床においてノロウイルス量が少ない症例や流行している genotype によっては IC 法の検出感度が低下する可能性があり, PCR 法による評価が必要かもしれない。

Key words: norovirus, immunochromatography, real-time polymerase chain reaction, genotype, sensitivity

序 文

ノロウイルスは手指や食品などを介して経口で感染し, ヒトの腸管で増殖し, 嘔吐・下痢・腹痛などの急性胃腸炎を引き起こす 1 本鎖 RNA ウイルスである¹⁾。ノロウイルス感染症は乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層でみられ, 感染力が強く 10~100 個/g のウイルスでも感染・発症する¹⁾。このためノロウイルス感染症の早期発見はアウトブレイク発生の予防・阻止に重要である。

ノロウイルス感染症の検査として日常診療ではイムノクロマト法 (IC 法) を利用した抗原キットが広く用いられているが, real-time PCR 法 (以下 PCR 法) などの遺伝子学的検査と比較して感度が低くなる傾向が報告されている²⁾。遺伝子検査における検出感度が $1.0 \times 10^{2.6}$ /ml であるのに対して IC 法の検出には 1.0×10^6 程度必要と報告されている³⁾。さらに, 近年 IC 法の検出率が genotype の違いによって低下する症例が報告されている²⁾。ノロウイルス感染症は毎年本邦で流行しているが, 2015 年~2016 年にはそれまで検出頻度

の高かった genotype である GII.4 (約 28%) だけでなく, 新型である GII.17 (約 8%) が国内で流行した⁴⁾⁵⁾。IC 法を利用した抗原検査では試薬の特性上 GII.17 の検出感度が低く, 偽陰性になる可能性が指摘されている⁶⁾。これらの genotype の違いのみならずウイルス抗原量は IC 法の検出感度に影響することが報告されているが, 実臨床における検体中のノロウイルス量や genotype の種類が IC 法に与える影響については評価が十分になされていない。

対象および方法

1. 対象

2016 年 1 月から 2018 年 3 月の間に当院を受診した患者のうち, 下痢・嘔吐・37.5℃ 以上の発熱のいずれかを認め, 医師がノロウイルス感染症を疑い, IC 法によるノロウイルス抗原検査を実施した患者のうち, 本人または代諾者による文書同意が得られた患者を対象とした。対象患者の年齢は 1~100 歳, 年齢中央値は 76 歳であり, 小児 (0 歳~5 歳) の割合は 4.9% であった。内訳は当院および施設職員 87 名, 入院患者および施設入所者 116 名, 一般外来患者 60 名であった (Table 1)。また, 研究機関内に集団感染は 4 回確認 (2016 年 2 月, 2018 年 1 月, 2 月, 3 月) され, 集団感染に関する検体数は 98 検体であった。同集団感染はいずれも GII.4 Sydney_2012 による感染であった。

著者連絡先: (〒512-1111) 三重県四日市市山田町 5538-1
医療法人社団主体会小山田記念温泉病院臨床検査部
久田綾子
TEL: 059-328-1260
E-mail: ict_oya@syutaikai.jp

Table 1. Classification by age or affiliation by gender

		Male (n = 75)	Female (n = 188)	total
Age	0 ~ 5	5	8	13
	6 ~ 30	12	21	33
	31 ~ 50	11	26	37
	51 ~ 70	10	30	40
	71 ~ 100	37	103	140
affiliation	General patient	42	18	60
	Inpatient and nursing home resident	81	35	116
	Hospital staff and Facility staff	65	22	87

Table 2. Comparison of detection sensitivity of IC method and real time PCR method

		RT-PCR method		
		Positive	Negative	Total
IC method	Positive	61	0	61
	Negative	44	158	201
	total	105	158	263

本研究は主体会倫理委員会（研究名：ノロウイルスの健康被害に関する研究）の承認を得て行った。また共同研究である国立病院機構三重病院においても倫理審査委員会の審査を得て行われた（承認番号 27-23）。

2. 方法

対象患者の便検体を用いて、IC 法によるノロウイルス抗原の検出を添付文書に従って行い（デンカ生研株式会社 クイックナビ TM-ノロ 2 を使用）同便検体を -20℃ に凍結保存し、後日 PCR 検査を実施した。

PCR 法は国立感染症研究所病原体検出マニュアル⁷⁾に準拠した手順で行った。便量の調整として一定量の PBS の入ったチューブに便を入れ 10% の懸濁液に調整し冷却遠心後、さらに上清を冷却遠心その上清 140 μl を使用し、RNA 抽出し逆転写を行った。その後ノロウイルスの capsid 領域の一部を標的として PCR（Applied Biosystems 社 7500 型を使用）を実施し Ct 値（Threshold Cycle）を算出した。PCR は Premix Ex Taq (TaKaRa Cat#RR039A) を使用し、プライマーは GI においては COGIF (5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3')/COGIR (5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3') を用い、GII においては COG2F (5'-CARGARBCNATGTTYAGRTG GRTGGATGAG-3')/ALPF (5'-TTTGAGTCCATGTACAA GTGGATGCG-3')/COG2R (5'-TCGACGCCATCTTCATTC ACA-3') を使用し、プローブは GI は RING1-TP (a) (5'-FAM-AGATYGCATCYCCTGTCCA-TMRA-3'), RING1-TP (b) (5'-FAM-AGATCGCGGTCTCTGTCCA-TMRA-3'), GII は RING2AL-TP (5'-VIC-TGGGAGGGSGATCGCRATCT-TMRA-3') を使用した。

遺伝子型の決定については前項と同様に国立感染症研究所のマニュアルに準拠し、capsid 領域について増幅を行い、その後塩基配列の解析を実施し、最終的に遺伝子型の判定を行った。

Conventional PCR は Ex Taq (TaKaRa Cat#RR001) を

使用し、GI については COGIF (5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'), G1-SKR (5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3'), GII については COG2F (5'-CARGARBCNATGTTYAGRTG GATGAG-3'), G2-SKR (5'-CCRCNGCATRHCCRTTTRTACAT-3') を使用した。PCR 産物を適宜精製した後にシーケンス反応を行い、DNA シークエンサー（Applied Biosystems 社 3130 Genetic Analyzer）にて解析し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) などを用いて遺伝子型を判定した。統計処理においては p 値 0.05 を閾値とし、2 群間の Ct 値についての有意差検定は統計ソフトの R (R version 4.0.1) を用いて t 検定で評価した。

結 果

1. PCR 法と IC 法の一致率

IC 法の検出感度を PCR 法の結果と比較して示した (Table 2)。PCR 法陽性 105 例中 IC 法陽性は 61 例となり陽性一致率は 58.1% であった。陰性一致率は 100% であり、全体の一致率は 83.3% であった。PCR 法に対する IC 法の陽性一致率は 60~92% とされている^{8)~10)}本研究における一致率は既存の報告と比較して低い傾向にあった。

2. IC 法の結果とウイルス量の関連性

PCR 法で陽性を示した検体のうち IC 陽性・陰性両群における Ct 値を比較した。PCR 陽性 105 検体において、IC 法陽性 61 検体の Ct 値は陰性 44 検体の Ct 値と比較して有意に低く ($P < 0.002$) (Fig. 1A), PCR 法陽性/IC 法陰性検体はウイルス含有量が少ないことが示唆された。

また PCR 陽性検体 105 例について Ct 値ごとの IC 法の結果を示した (Fig. 1B)。Ct 値を 10~19, 20~29, 30~39 に分けた RT-PCR 陽性検体 28 例, 59 例, 18 例において、IC 法の検出感度を再評価すると、陽性一致率は 78.6%, 54.2%, 38.9% となった。IC 法の偽陰性は Ct 値が高い（ウイルス量が少ない）検体ほど多く、Ct 値が 30 以上では IC 法が偽陰性になりやすいという既報と一致した¹¹⁾。

3. Genotype 別の IC 法陽性一致率およびウイルス量の関係

次に、各 genotype における IC 法と PCR 法の陽性一致率を検討した (Table 3)。PCR 陽性検体 105 例の genotype の結果は GII.4 Sydney_2012 (n=82), GII.2 (n=19), GII.17 (n=3), GI.2 (n=1) であり、GII.4 Sydney_2012 および GII.2 の IC 法との陽性一致率は 61.0%, 52.6% であった。Genotype によって陽性一致率が異なる結果であった。

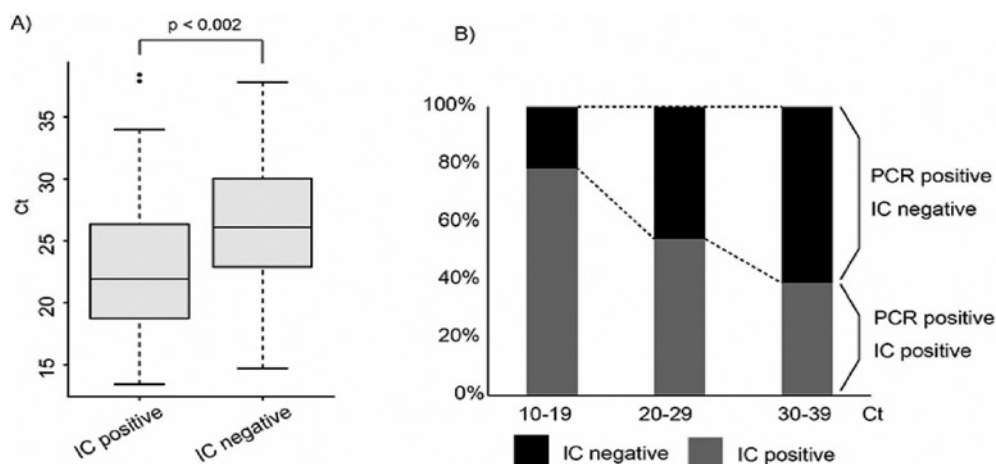


Figure 1. CT values in IC negative and positive (A), IC method results per CT values (B)

Table 3. Positive match rate of IC method and real time PCR method in each genotype

Genotype	number (PCR positives)	number (IC positive)	Positive match rate
GII.4 Sydney_2012	82	50	61.0%
GII.2	19	10	52.6%
GII.17	3	1	33.3%
GI.2	1	0	0.0%

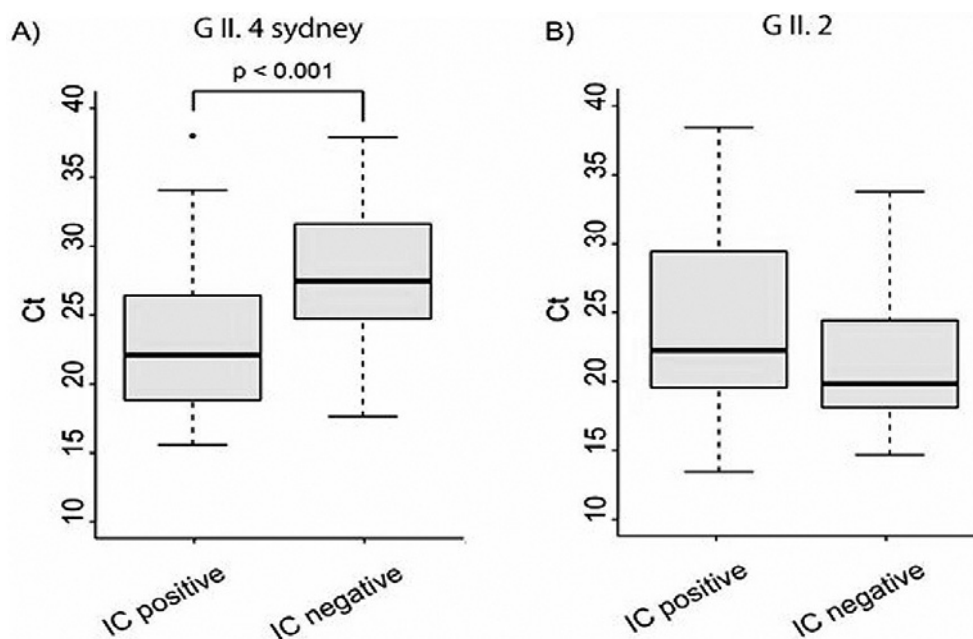


Figure 2. Comparison of IC positive and negative CT values by genotype

Genotype 別の IC 法陽性と陰性の Ct 値の比較を行った (Fig. 2)。GII.4 Sydney_2012 では IC 法陽性 (n=50) の Ct 値は陰性検体 (n=32) の Ct 値と比較して有意に低い結果となった ($P < 0.001$)。一方で、今回 GII.2 においては IC 法の陽性検体の Ct 値は陰性検体と比較し有意差はないものの高値となる傾向を認めた。GII.17 においては IC 法陽性の Ct 値は IC 法陰性の Ct 値と比較して低い傾向ではあったが、検

体数が少ないため十分な評価はできなかった。

4. 検査のタイミングおよび臨床症状と陽性一致率の関連性

PCR 陽性 105 例のうち、発症から当院受診までの日数が明確である 95 症例において、検査のタイミング及び臨床症状が PCR 法と IC 法の陽性一致率に及ぼす影響について比較・検討した。

Table 4. Positive agreement rate and Ct value of PCR method and IC method by timing from onset

	IC positive (Ct value; median)	Positive match rate
Day 0 (n=26)	15 (16.05-30.63; 25.8)	58%
Day 1 (n=48)	22 (16.94-30.51; 23.4)	46%
Day 2 ~ (n21)	15 (13.43-38.41; 23.9)	71%

対象症例の下痢・嘔吐・発熱等の症状発症より検査までの時間を day0, day1, day2~に分け、IC 法の陽性率を比較した結果、各々 58%, 46%, 71% となり、day2~群における IC 法陽性率が高い傾向であった。また発症からの経過日数ごとの Ct 値の比較を行った結果、有意差は認めないものの、その中央値は day0 (25.8) と比較して day1 (23.4) および day 2~ (23.9) では低値であり、ウイルス量が増加していることによる影響が示唆された (Table 4)。

また、主な症状として下痢のみ・嘔吐のみ・発熱のみ・下痢及び嘔吐の 4 群に分け、PCR 法と IC 法の陽性一致率を解析した結果、症状の内容による陽性一致率に差は認めなかった。

考 察

今回の検討での PCR 法と IC 法の陽性一致率は 58.1% であり、既存の報告よりやや低値であった。この理由として以下の点が考えられる①発症から検査までの日数②genotype 型の検査キットの感度の差③検査手技の影響が考慮された。これらの点について下記に考察する。

今回の研究では PCR 陽性者における IC 法の陽性率は、発症から 2 日目以降が高くなる傾向を示していた。Ct 値の変化から時間経過とともにウイルス量が増加し IC 法の陽性率が高くなったと考えられた。実際に PCR 法において発症より 2 日目以後にウイルス量が増加している報告もあり¹²⁾、我々の結果と一致する。ノロウイルス発症早期と思われる症例ではウイルス量が十分でない可能性を踏まえ偽陰性を考慮すべきと考えられる。

本研究ではノロウイルス genotype によって IC 法の感度が異なる結果であった。

ノロウイルス抗原検査は人工的に製造されたウイルス様粒子に対する抗体反応を応用して流行している genotype を中心に製造されている²⁾¹³⁾。このため genotype の違いによるエピトープ部位の変化から陽性率が変化し得る¹⁴⁾。実際に他のウイルスを対象とした IC 法も genotype の違いによる検出感度の差が指摘されている^{15)~18)}。今回 GII.2 において IC 法の陽性・陰性検体でウイルス量に差がないという結果であった。GII.2 における PCR 法と IC 法の一致率は低く、本研究では明らかにできていないが、ウイルス量以外に検出率に影響する因子があるものと推定された。

次に検体の採取方法については、排泄便と比較して直腸スワブを用いて採取された検体は IC 法で偽陰性になりえることが報告されている⁸⁾。残念ながら、本研究ではこれらの検体採取法による差について言及しえなかったが、少数ながら本研究も直腸スワブを用いて採取された検体が含まれており、

結果に影響を与えた可能性がある。

本邦における過去 5 年間のノロウイルス流行株を genotype 別でみると GII.2, GII.4, GII.17 が大半を占めているが、2019 年には GII.6 や GII.3 といった genotype への変遷が見られる¹⁹⁾。今後、さらに新しい genotype が流行する可能性も否定できず、IC 法で陰性であっても臨床的にノロウイルス感染症が強く疑われる場合には流行株を常に参考にし、検査のタイミングも含め偽陰性の可能性を考慮する必要がある。

結 語

IC 法による抗原検査は検体中に含まれるノロウイルス量が少ない場合は偽陰性になる可能性があり、genotype の種類もまた結果に大きく影響する。

謝辞: 本研究の研究主導機関である国立感染症研究所実地疫学研究センター センター長砂川富正様に深く感謝申し上げます。

利益相反: 申告すべきものなし

文 献

- 1) 本村和嗣. 2021. 高齢者のウイルス感染症の現状と対策—ノロウイルス感染症. 日本老年学会雑誌 58 (1): 60-64.
- 2) 牛島廣治, T. Aksara, 沖津祥子. 2017. ノロウイルスの迅速簡易検出法 (イムノクロマト法). IASR1 (38): 11-12.
- 3) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 他. 2005. ノロウイルスによる食中毒について. 食品衛生学雑誌 46 (6): 235-245.
- 4) 病原微生物検出状況. 国立感染症研究所厚生労働省健康局結核感染症課. (胃腸炎ウイルス 2011-2018). <http://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/archive/virus-a/va-year/v4y2018pdf.pdf>.
- 5) 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 他. 2015. 新規遺伝子型ノロウイルス GII.17-GII.17 の流行. IASR36: 175-178.
- 6) 楠原 一, 赤池重宏, 小林隆司, 他. 2015. ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴について—三重県. IASR5 (36): 91-92.
- 7) 2019. 病原体検出マニュアル ノロウイルス (第 1 版). 国立感染症研究所. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf> 2019 年 6 月現在.
- 8) 斎藤祐司, 加藤大介, 稲野浩一. 2014. ノロウイルス抗原迅速診断キット「クイックナビ™ ノロ 2」の開発. JARMAM 24 (2): 45-50.
- 9) 佐藤勇樹, 品川雅明, 高橋祐輔, 他. 2018. ノロウイルス抗原キットの性能評価およびキット間差の検討. 感染症学会誌 92: 120-125.
- 10) 三好正浩, 吉澄志磨, 佐藤千秋, 他. 2006. 遺伝子検査法との比較によるノロウイルス抗原検出キット SRSV (II)-AD 「生研」の有用性評価. 北海道立衛生研究所 (所報) 56: 83-85.
- 11) Kim, HS, J Hyun, J-S Kim, et al. 2012. Evaluation of the SD Bioline Norovirus rapid immunochromatography test using fecal specimens from Korean gastroenteritis patients. Journal of Virological Methods 186: 94-98.
- 12) Lee, N, M C. W. Chan, B Wong, et al. 2007. Fecal Viral Concentration and Diarrhea in Norovirus Gastroenteritis. Emerging Infection Diseases 13 (9): 1399-1401.

- 13) ノロウイルス感染症とは. 国立感染症研究所. IDWR.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/452-norovirus-intro.html>.
- 14) Lindesmith, L C., V Constantini, J Swanstrom, et al. 2013. Emergence of a Norovirus GII.4 Strain Correlates with Changes in Evolving Blockade Epitopes. *Journal of Virology* 87 (5): 2803-2813.
- 15) 大宮 卓, 佐々木純一, 西村秀一. 2015. イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの, ウイルス検出感度の比較. *医学検査* 64 (3): 319-323.
- 16) 大宮 卓, 久保 亨, 西村秀一. 2016. イムノクロマト法を原理とする 12 種の RS ウイルス迅速抗原検出キット製品の, ウイルス検出の感度性能の比較. *感染症学雑誌* 90 (5): 633-638.
- 17) 武山 愛, 橋本浩一, 川崎幸彦, 他. 2010. RS ウイルス迅速診断の有用性と問題点—定量的リアルタイム PCR 法をスタンダードとした検討—. *小児感染免疫* 22 (4): 337-342.
- 18) 大宮 卓, 佐藤 光, 佐々木純一, 他. 2017. イムノクロマト法を原理とする種々のヒトメタニューモウイルス迅速抗原検出キットの, ウイルス検出感度の比較. *医学検査* 66 (3): 212-216.
- 19) ノロウイルス等検出状況. 国立感染症研究所. IASR.
<https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byougantai/Pdf/data64j.pdf>
2021 年 5 月現在.

Clinical evaluation of immunochromatography and PCR for Norovirus Utility of immunochromatography for Norovirus detection

Ayako Hisada¹⁾, Keiki Nagaharu²⁾, Syuji Yamamoto³⁾, Hajime Kusuhara⁴⁾,
Manami Negoro⁵⁾, Kiyoshi Taniguchi⁵⁾, Kenichiro Hoshino³⁾, Kiyomi Nakamura¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Medical Corporation Principal Association OYAMADA Memorial Hot Spring Hospital

²⁾Department of Hematology, Mie University Hospital

³⁾Department of Internal Medicine, Medical Corporation Principal Association OYAMADA Memorial Hot Spring Hospital

⁴⁾Department of Hygiene, Microbiology Course, Mie Institute of Health and Environment

⁵⁾Department of Clinical Research, National Hospital Organization Mie Hospital

The clinical utility of immunochromatography (IC) for norovirus detection has been established. However, the sensitivity and specificity of IC for norovirus depends on the viral load and/or the viral genotype. Herein, we prospectively validated the clinical application of IC for norovirus diagnosis and explore the factors affecting the accuracy of this method. After informed consent, we evaluated fecal samples by both IC and real-time polymerase chain reaction (PCR) for norovirus-suspected patients. The corresponding detection rates were compared between these two methods. Furthermore, we investigated the impact on the IC results of viral load, genotype, time from clinical onset and symptom. During January 2016 and March 2018, 263 patients were enrolled. The positive/negative predictive rates of the IC method compared with PCR were 58.1% and 100%, respectively. The estimated viral titer of IC-positive patients was significantly higher than that of IC-negative patients. The false negative rate of the IC method (PCR positive but IC negative) gradually increased as viral titer decreased. The positive predictive values of GII.4 Sydney2012 (n=82) and GII.2 (n=19) were 61.0% and 52.6%, respectively. The positive predictive value of IC increased along with time from the onset of clinical symptoms. By contrast, analysis by symptom revealed no difference in the positive predictive value of the IC method. The sensitivity of the IC method was negatively affected by low RNA levels of norovirus and was also influenced by the strain of virus. Clinicians should consider PCR-based evaluation even if IC indicates a negative sample.