

食水系感染症病原体の検査法 - 6

ノロウイルス

あき ば てつ や
秋 場 哲 哉
Tetsuya AKIBA

I. 病原体

1. 病原体

免疫電子顕微鏡法によりノロウイルス (Norovirus) が検出されたのは、1968年アメリカ合衆国オハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎の検体が最初である¹⁾。以来、本ウイルスはノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like virus)、あるいはその形態的特徴から小型球形ウイルス (small round structured virus ; SRSV) と呼ばれてきたが、2002年の国際ウイルス命名委員会により、ノロウイルスという正式名称が決定された。

ノロウイルスは、カリシウイルス科ノロウイルス属に分類される直径38nmの球形粒子で、約7,500塩基の1本鎖RNA (+) をゲノムとして有している (写真1)。ノロウイルスにはGI~GVの遺伝子群 (genogroup) が存在し、そのうちヒトに病原性を示すのは、主としてGI、GIIである。また、GIは14、GIIは17あるいはそれ以上の遺伝子型 (genotype) に細分されており、近年最も検出頻度の高い遺伝子型はGII/4である。

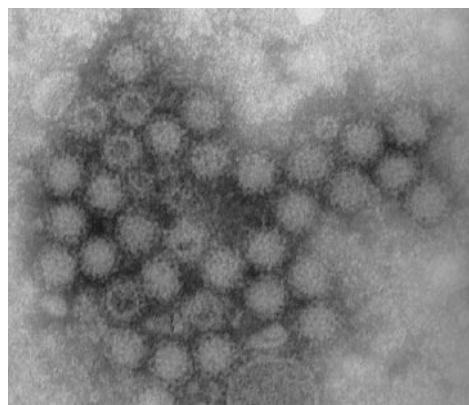
2. 疫学

ノロウイルスは世界各地に分布し、乳幼児から高齢者に至るあらゆる年齢層に感染する。冬季に発生する食中毒や、小児の感染性胃腸炎、病院や高齢者施設における集団感染症の主要原因物質であり、2006~2007年の冬季にはかつてない大流行を引き起こした。国内における食中毒事件では、ノロウイルスによる患者数が年間の食中毒患者総数の約半数、あるいはそれ以上を占める状況が続いている。

感染経路としては、ノロウイルスに汚染されたカキなどの二枚貝を生食または加熱不十分で喫食することによって感染する経路に加え、調理従事者の手指等に付着したノロウイルスから感染が広がる経路や、発症者の嘔吐物等によりヒトからヒトへ直接感染する経路があげられる。近年、調理従事者を介したと推定される食中毒事件の割合が増加していることから、公衆衛生上も重要なウイルスと考えられる。東京都健康安全研究センターで実施している食中毒関連検査のうち、ノロウイルスによる食中毒事件における推定原因施設の調理従事者からノロウイルスが検出される事例は、2006年以降50%前後を推移している。

3. 臨床症状

ノロウイルスによる感染は10~100個程度の少数でも成立し、潜伏期間は12~72時間 (多くは24~48時間) とされている。主症状は嘔気、嘔吐 (低年齢層に多く見られる)、下痢であり、発熱、腹痛、頭痛などを伴うこともある。一般に重症化する例は少なく、通常1~3日で症状は消失するが、抵抗力



(東京都健康安全研究センター)

写真1 ノロウイルス

食水系感染症病原体の検査法-6

の弱い乳幼児や高齢者等の脱水、嘔吐時の窒息には注意が必要である。症状消失後も数日間は糞便中にウイルスが排出され、中には約2カ月間糞便からノロウイルスが検出された例もある。また、感染していても症状が現れない場合もあるので、食品を取り扱う職場等では、症状の有無にかかわらず入念な手洗いや施設の衛生管理が求められる。

II. 検査法

ノロウイルスは、培養細胞や動物を用いた培養法が確立されていないため、その検査は電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、ウイルス粒子中の核酸の検出、ウイルス表面の抗原の検出、のいずれかの方法によって行われる。今日では、厚生労働省通知²⁾によるノロウイルスの検出法として、RT-PCR法やリアルタイムPCR法による核酸検出法が記載されているほか、核酸検出法や抗原検出法を用いたノロウイルス検査キットが多数市販されている。ここでは、電子顕微鏡に代わる検査法として現在広く用いられている、それらの検査法についての概要を以下に記述する。

1. 核酸検出法

(1) RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 法

検体から抽出したノロウイルス RNA を逆転写して鋳型 DNA (cDNA) とし、PCRにより増幅させる最もスタンダードな方法で、塩基配列の解析を行うためには必須の検査法である。ORF1-2 junction region と呼ばれる領域をターゲットに核酸増幅を行い、電気泳動で目的とするバンドの確認を行うが、食品などウイルス量が少ない検体の場合は、1st PCR の産物を用いて Nested PCR を行う。PCR 陽性と判定された場合には、ハイブリダイゼーションまたは塩基配列の決定による確認試験を行うため、検査所要時間は最短でも 10 時間以上となる。また Nested PCR を行う場合は、コンタミネーションの危険性が高まるので細心の注意が必要である。ノロウイルス検出用プライマーは多数報告されているので以下にその一例²⁾を示す。

- 1st PCR 用プライマーおよび増幅産物のサイズ
 - G I 検出用 COG1F : 5'-CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA-3'
 - G1-SKR : 5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3'
 - 増幅産物 : 381bp
 - G II 検出用 COG2F : 5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3'
 - G2-SKR : 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3'
 - 増幅産物 : 387bp
- Nested PCR 用プライマーおよび増幅産物のサイズ
 - G I 検出用 COG1F (上記) および COG1R : 5'-CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C-3'
 - 増幅産物 : 85bp
 - G II 検出用 COG2F (上記) および COG2R : 5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3'
 - 増幅産物 : 98bp

(2) リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法)

PCRによる核酸増幅が繰り返されるごとに発光量が増加するプローブ (reporter および quencher と呼ばれる色素でラベルされたオリゴヌクレオチド) を使用し、その発光量の増加を専用機器で測定する。RT-PCR法による cDNA の増幅と、プローブによるハイブリダイゼーションが同時に行われるため、電気泳動や確認試験を行う必要がなく、6 時間程度で結果が得られる。また、一定の増幅速度に達するまでに要する時間の違いから、試料中に存在したウイルスを定量することも可能である。RT-PCR 法で記載した COG プライマーの他に以下のプローブが必要となる。

- G I 検出用 RING1-TP (a) : 5'-FAM- AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TMRA-3'
 - RING1-TP (b) : 5'-FAM- AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TMRA-3'
 - G II 検出用 RING2-TP : 5'-FAM- TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TMRA-3'
- * FAM は reporter、TMRA は quencher

〔リアルタイム PCR法の概要〕

10%乳剤の作製および遠心分離によるウイルスの濃縮・精製

↓

核酸 (RNA) の抽出

↓

逆転写反応 (鋳型 DNA の作成)

↓

リアルタイム PCRによる核酸増幅および検出

(3) RT-LAMP (Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification) 法

栄研化学が開発した LAMP 法により DNA を増幅させ、その過程で生じる濁度の変化を測定することによってノロウイルスの検出を行う。核酸抽出後の逆転写反応から検出までの反応が1回の操作で終了し、一定温度で増幅反応が進行することから短時間で結果が得られ、コンタミネーションの可能性も低い。専用の機器 (Loopamp[®]リアルタイム濁度測定装置) を使用した検出法の他に目視による判定も可能である。G I、G II の検出にはそれぞれ別のキットを用いる。

- ・市販品：Loopamp[®]ノロウイルス G I、G II 検出試薬キット (栄研化学)

(4) Ampdirect 法

RT-PCR 法により DNA を増幅させるオーソドックスな検査法だが、Ampdirect 法の特徴は、独自の検体処理試薬を用いることにより検体処理から PCR による核酸増幅までを1本のチューブで行えることにある。このため検査途中でのコンタミネーションの可能性が一層低くなる。PCR 用の機器がすでにある施設では新たな専用機は不要だが、結果判定には電気泳動や融解温度解析を実施する必要がある。G I、G II を個別に検出するキットの他に、G I、G II 同時検出キットも発売されている。

- ・市販品：ノロウイルス G1、G2、G1 & G2 検出試薬キット (島津製作所)

(5) NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) 法

3種類の酵素を用いて RNA を増幅する核酸増幅法 (NASBA 法) と核酸クロマトグラフィーによりノロウイルスを検出する。NASBA 法による核酸増幅は一定温度 (41 °C) で実施し、核酸クロマトグラフィーによる結果判定は目視で行うことから、核酸検出法ではあるが特殊な機器を必要としない点が大きな特徴といえる。また、G I、G II を同時に検出でき識別も可能である。

- ・市販品：スイフトジーン ノロウイルス G I/G II 「カインス」(カインス)

(6) TRC (Transcription-Reverse transcription Concerted reaction) 法

一定の温度 (43 °C) 下で RNA を増幅させる TRC 反応と、標的 RNA に特異的に結合することで蛍光増感する INAF (Intercalation Activating Fluorescence) プローブを組み合わせた方法である。比較的短時間で結果が得られるが、専用の機器が必要である。G I、G II 用に別々のキットが市販されていたが、現在のキットは G I、G II とも検出可能であるが識別はできない。

- ・市販品：TRCRtest NV-W (東ソー)

2. 抗原検出法

(1) EIA (Enzyme Immunoassay) 法

ノロウイルスの表面蛋白 (抗原) に対し特異的に結合するモノクロナール抗体と、酵素標識抗体を用いて、試料中に含まれるノロウイルスを検出する。従来から一般に用いられている検査法で、G I、G II を別々に検出することはできないが、大量検体の同時検査に適しており体外診断用医薬品の承認を得ている。

- ・市販品：NV-AD (Ⅲ)「生研」(デンカ生研)

(2) ICA (Immunochromatographic Assay) 法

EIA 法同様、抗原抗体反応を利用した検査法で、ストリップ上に出現するラインの有無を目視で確認する。特殊な機器を必要としない簡易な検査法であり、非常に短時間で結果が得られる。POCT (Point

食水系感染症病原体の検査法－6

of care Testing) 等に適しており、クイックナビ™－ノロは体外診断用医薬品である。

- ・市販品：クイックナビ™－ノロ（大塚製薬、デンカ生研）
アイピーノロ（イムノ・プローブ）
イムノサーチ NV（森永乳業）

以上、現在国内で用いられているノロウイルス検査法を簡単に紹介した。原理や操作法についての詳細は、それぞれの取扱説明書等を御覧いただきたい。概して核酸検出法は検出感度に優れ、抗原検出法はコストや検査所要時間に利点があると考えられる。著者らは「ノロウイルス対策緊急タスクフォース³⁾」の中で、2008年4月時点で国内市販されていた7種

類のノロウイルス検査用キットについてリアルタイム PCR 法との比較、検討を行った。その後各メーカーによる改良等が進められているため、現在市販されているものと若干の違いはあるが、興味のある方は参照していただきたい。

文 献

- 1) Kapikian, A. Z., *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nmparticle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10** : 1075-1081, 1972.
- 2) 平成 19 年 5 月 14 日、厚生労働省医薬食品局食品安全部 監視安全課長通知、食安監発第 0514004 号
- 3) <http://www.tokyo-eiken.go.jp/>