

## 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

<sup>1)</sup> 札幌医科大学附属病院検査部, <sup>2)</sup> 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座佐藤 勇樹<sup>1)</sup> 品川 雅明<sup>1)</sup> 高橋 祐輔<sup>1)</sup>  
佐伯 理知<sup>1)</sup> 八湊 佑貴<sup>1)</sup> 高橋 聡<sup>1)2)</sup>

(平成 29 年 8 月 17 日受付)

(平成 29 年 11 月 14 日受理)

Key words: *norovirus*, real time RT-PCR, immunochromatography

## 要 旨

ノロウイルス感染疑い患者の便 69 検体を用いて Real time reversetranscriptase-PCR (Real Time RT-PCR 法) を比較対照とし, 4 社のノロウイルス抗原キットの性能評価およびキット間差を調べた. ノロウイルス抗原キットはイムノキャッチーノロ (A キット), クイックチェイサー-Noro (B キット), GE テスト イムノクロマトーノロ「ニッスイ」 (C キット) およびクイックナビーノロ 2 (D キット) を用いた. その結果, Real Time RT-PCR 法で Genogroup I (GI) が 6 例, Genogroup II (GII) が 22 例あり, そのうち GI と GII の混合感染が 1 例存在した. 陽性検体のウイルス量は  $1.54 \times 10^3 \sim 3.14 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L であった. Genotype は, GI が GI.1 (1 例), GI.2 (3 例), GI.3 (2 例), GII は GII.2 (1 例), GII.4 (7 例), GII.13 (2 例), GII.17 (12 例) であった. A, B, C, D キットと Real Time RT-PCR 法の一致率は, 陽性一致率で 59.3%, 51.9%, 51.9%, 48.1%, 陰性一致率で 97.6%, 100%, 100%, 97.6% であり,  $\kappa$  係数による評価では明らかなキット間差はみられなかったが, 今後, さらに臨床検体を用いて, 他の genotype による検討および評価が求められる. また GII.P17/GII.17/Kawasaki308 が 12 例同定され, ノロウイルス抗原キットは  $10^4 \sim 10^5$  copies/ $\mu$ L 以下のウイルス量で偽陰性になる傾向がみられた. 臨床現場で用いる場合, 使用するノロウイルス抗原キットの感度や特異性に限界があることに留意しておく必要がある.

〔感染症誌 92: 120~125, 2018〕

## 序 文

ノロウイルスは感染力が非常に強く,  $10 \sim 100$  個のウイルス粒子でも感染が成立するとされている<sup>1)</sup>. そのため, ノロウイルスの早期診断は, 感染者からの 2 次感染防止や不要な抗菌薬投与を防ぐなどの適切な治療のために重要である<sup>2)</sup>. ノロウイルスを検出する標準的な方法は, 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課より通知された「ノロウイルス検出法について」<sup>3)</sup>に示されている Real time reversetranscriptase-PCR (Real Time RT-PCR 法) であるが, 操作が煩雑であり, 時間がかかる問題点があげられる. 同等の検出感度を有する検査法として, Real Time RT-PCR 法を原理とする Xpert Norovirus (セフィエド合同会社), Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を原理とするノロウイルス GI/G2 検出試

薬キット (栄研化学), Transcription-reverse transcription concerted reaction (TRC) 法を原理とする TRC Ready ノロウイルスなどがあるが, いずれも専用機器を必要とする. 一方, 操作が簡便かつ短時間で結果判定が可能な方法として, イムノクロマト法を原理としたノロウイルス抗原キットがあり, 2012 年には, 3 歳未満の乳幼児と 65 歳以上の高齢者を対象に体外診断薬として使用可能になった. 現在, ノロウイルス抗原キットは臨床の現場でも広く普及しているが, Real Time RT-PCR 法と比べ感度が劣ることも指摘されている. また, 2015 年, 我が国においてノロウイルス抗原キットは 4 社から市販されていたが, キット間の検出感度の違いは明らかにされていない. そこで, 4 社のノロウイルス抗原キットの性能評価およびキット間差を調べた.

## 対象と方法

## 1. 対象

2015 年 1 月から 2016 年 4 月までに札幌医科大学附

別刷請求先: (〒060-8543) 北海道札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 291

札幌医科大学附属病院検査部 佐藤 勇樹

Table 1 Primers used in this study for norovirus sequencing

Target gene	Primer name	Primer sequence (5'to 3')
Capcid	GI Forward primer (G1FF)	5'-ATHGAACGYCAAATYTTCTGGAC-3'
		5'-ATHGAAAGACAAAATCTACTGGAC-3'
	Reverse primer (G1SKR)	5'-ATHGARAGRCARCTNTGGTGGAC-3'
		5'-TGCTTGACCACTTTTATCAGC-3'
GII Forward primers (G2FB)	5'-GGHCCMBMDTTYTACAGCAA-3'	
	5'-GGHCCMBMDTTYTACAAGAA-3'	
Reverse primer (G2SKR)	5'-GGHCCMBMDTTYTACARNAA-3'	
	5'-CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT-3'	
RdRp	1 Forward primer (JV12)	5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3'
		5'-TCATCATCACCATAGAAAGAG-3'
	2 Forward primer (NV32)	5'-ATGAATATGAATGAAGATGG-3'
		5'-ATTGGTCCTTCTGTTTGTGTC-3'
	Reverse primer (NV36)	5'-ATTGGTCCTTCTGTTTGTGTC-3'
		5'-TACCACTATGATGCAGATTA-3'

属病院において提出されたノロウイルス疑い外来患者 28 名、入院患者 41 名の自然排便された糞便（残存検体）69 検体を用いた。対象患者の年齢は 2 歳～88 歳、平均 42.8 歳、男性 33 例、女性 36 例であり、検討期間中に明らかな集団食中毒の事例はなかった。なお、本検討においては札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

## 2. ノロウイルス抗原キット

ノロウイルス抗原キットはイムノキャッチーノロ (A キット, 栄研化学), クイックチェイサー Noro (B キット, ミズホメディール), GE テスト イムノクロマトーノロ「ニッスイ」(C キット, 日本水薬), クイックナビーノロ 2 (D キット, デンカ生研) を用いた。操作は各キットの添付書に従った。

## 3. Real Time RT-PCR 法

比較対照法は、Real Time RT-PCR 法とした。厚生労働省が提示する公定法（食安監発第 1105001 号、平成 15 年 11 月 5 日、最終改正 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号「ノロウイルス検出法」）に準拠し、RNA 抽出は High Pure Viral RNA Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス), Real Time RT-PCR 法は TaKaRa qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit (タカラバイオ) を用い、LightCycler Nano (ロシュ・ダイアグノスティックス) で測定した。判定は、Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) それぞれ 10copies/μL 以上を陽性とし、ウイルス量(copies/μL) を算出した。

## 4. Genotyping

Real Time RT-PCR 法で陽性を示した検体については、合成された cDNA を用い、Kageyama ら<sup>4)</sup>の方法に従い capcid 領域の遺伝子を増幅した。また、GII.17 と同定された検体は Kim ら<sup>5)</sup>の方法に従い、RNA de-

pendent RNA polymerase (RdRp) 領域の遺伝子を増幅した。プライマー配列を Table 1 に示した。PCR 反応には *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ) を使用し、Applied Biosystems Veriti 96-Well サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) を用いた。遺伝子増幅後の PCR 産物はアガロースを用いて電気泳動し、遺伝子断片の増幅が認められた目的のバンドをゲルから切り出して Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) で、DNA の抽出および精製を行った。精製した DNA は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) でシーケンス反応を行った。Centri-Sep Spin Columns (Thermo Fisher Scientific) で夾雑物を除去後、ABI Prism 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) でシーケンス解析し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 で解析し Genotype を決定した。

## 5. 統計解析

統計解析には統計解析ソフト IBM SPSS Statistics バージョン 24 を使用し、Real Time RT-PCR 法とノロウイルス抗原キットの一致度およびキット間の比較は κ 係数で検証した。

## 成 績

### 1. Real Time RT-PCR 法と Genotype の結果

対象検体 69 例中、Real Time RT-PCR 法で 10copies/μL 以上の陽性は GI が 6 例、GII が 22 例あり、そのうち GI と GII の混合感染が 1 例あった。陽性検体のウイルス量は  $1.54 \times 10 \sim 3.14 \times 10^8$  copies/μL まであった。Genotype の結果は、GI は GI.1 (1 例), GI.2 (3 例), GI.3 (2 例), GII は GII.2 (1 例), GII.4 (7 例), GII.13 (2 例), GII.17 (12 例) であり、GII.17 が最も検出数が多い結果であった。

Table 2 Results from the norovirus antigen assay kits compared with RT-PCR findings

		A kit		B kit		C kit		D kit	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Real Time RT-PCR	+	16	11	14	13	14	13	13	14
	-	1	41	0	42	0	42	1	41
Concordance Rate									
	Positive	59.3%		51.9%		51.9%		48.1%	
	negative	97.6%		100.0%		100.0%		97.6%	
	Total	82.6%		81.2%		81.2%		78.3%	
κ coefficient									
		0.633		0.590		0.533		0.522	
95%CI									
		0.43-0.83		0.39-0.79		0.32-0.74		0.31-0.73	

## 2. ノロウイルス抗原キットと Real Time RT-PCR法の比較

ノロウイルス抗原キットの成績は、Real Time RT-PCR法との一致率で示した (Table 2)。A, B, C, Dキットと Real Time RT-PCR法の陽性一致率は59.3%, 51.9%, 51.9%, 48.1%であった。すなわち、Real Time RT-PCR法で陽性を示し、ノロウイルス抗原キットで陰性であった検体が、少ないものでも11例、多いものでは14例みられた。一方、陰性一致率は97.6%, 100%, 100%, 97.6%であり、Real Time RT-PCR法で陰性であったのに対し、抗原キットで陽性を示した検体が、AキットとDキットで1例ずつみられた。全体一致率は82.6%, 81.2%, 81.2%, 78.3%であった。また、ノロウイルス抗原キットの成績とReal Time RT-PCR法の一貫度についてはκ係数で評価したところ、4社の中でAキットが0.633で最も高く優れている結果であったが、今回の genotype における95% confidence interval (CI) の評価では明らかなキット間差はみられなかった。

## 3. Genotype とノロウイルス抗原キットの判定結果の比較

Real Time RT-PCR法で陽性を示した検体の genotype とウイルス量、およびノロウイルス抗原キットの判定結果を Table 3に示した。ウイルス量が $10^6$  copies/ $\mu$ L以上と十分なウイルス量があるにもかかわらずノロウイルス抗原キットで陽性を示さなかった検体が、GI.2の $5.31 \times 10^7$  copies/ $\mu$ LでBキット (No. 2)、GI.3の $2.51 \times 10^7$  copies/ $\mu$ LでB, Dキット (No. 5)、GII.4の $1.28 \times 10^6$  copies/ $\mu$ LでAキット (No. 11)にみられた。またGII.17については、その亜型の存在をRdRp領域のシーケンスによって調べたところ、12例全てがGII.P17\_GII.17/Kawasaki308と同一性が高いことが確認された。

## 考 察

ノロウイルスはカリシウイルス科に属し、以前まで

はノーワークウイルスと呼ばれていたが、2002年国際ウイルス学会でノロウイルスへと名称変更が承認された。ノロウイルスは1本鎖のRNAウイルスで、1990年に全遺伝子配列が決定された。その後、遺伝子増幅のためのプライマーが genotype 間で共通の配列部分に設定され、PCR法によって簡便にノロウイルスの遺伝子を増幅できるようになり genogroup や genotype の分類が可能になった。ノロウイルスは2015年の時点で genogroup がGI-GIIまであり、そのうち、ヒトへの感染はGI, GIIおよびGIVが知られているが、多くはGIまたはGIIである。さらにGIは9, GIIは22の genotype に分けられる<sup>6)</sup>。Genotypingは抗原性の違いを推定するために capsid の解析が行われてきたが、亜型の分別にも対応するため、2013年からはOpen Reading Frame 1のRdRp領域を含む遺伝子解析が推奨されている<sup>7)</sup>。

国内ではノロウイルス胃腸炎によるアウトブレイクの報告がみられる<sup>8)</sup>。そのためアウトブレイクを予防するためにもノロウイルスの検査は迅速性があり、かつ高感度な検査法が望まれる。日本におけるこれまでの流行としてはGII.4とGII.3が主流であったが、2014年より流行がみられたのがGII.17である。このGII.17は遺伝子解析の結果、新規遺伝子型でありGII.P17-GII.17<sup>9)</sup>と登録された。本検討でも同様の新規遺伝子型が12例確認された。本遺伝子型は、capsidの可変領域であるP2 domainにアミノ酸変異が確認されているため、抗原性が変異していることが示唆されている<sup>10)</sup>。またGII.P17-GII.17はGII.4に比べ、ノロウイルス抗原キットに対する反応性が低いことが報告されている<sup>11)</sup>。その理由として市販のノロウイルス抗原キットは流行株を標的として設計されているため、一部の genotype では十分な反応がみられないことが要因の一つである。

今回われわれの検討では、GII.17が最も多く、次にGII.4が多かった。GII.17とGII.4はいずれも $10^4 \sim 10^5$

Table 3 Genotype and virus titer, results of four norovirus antigen assay kits

No	Genogroup	Genotype	Virus titer (copies/ $\mu$ L)	A kit	B kit	C kit	D kit	
1	GII	GII.17	$4.07 \times 10^7$	+	+	+	+	
	GI	GI.1	$5.14 \times 10^4$			-		
2	GI	GI.2	$5.31 \times 10^7$	+	-	+	+	
3			$1.23 \times 10^4$	-	-	-	-	
4		$1.54 \times 10^1$	-	-	-	-		
5		GI.3	$2.51 \times 10^7$	+	-	+	-	
6	$4.43 \times 10^5$		-	-	-	-		
7	GII	GII.2	$4.13 \times 10^3$	+	-	-	-	
8		$2.07 \times 10^8$	+	+	+	+		
9		$5.27 \times 10^7$	+	+	+	+		
10		$4.28 \times 10^7$	+	+	+	+		
11		GII.4	$1.28 \times 10^6$	-	+	+	+	
12			$2.04 \times 10^5$	+	+	+	+	
13			$1.53 \times 10^5$	+	+	+	+	
14			$5.39 \times 10^4$	-	-	-	-	
15		GII.13	$3.14 \times 10^8$	+	+	+	+	
16			$4.32 \times 10^4$	+	+	+	+	
17		GII		$2.81 \times 10^6$	+	+	+	+
18				$2.73 \times 10^6$	+	+	+	+
19				$7.08 \times 10^5$	+	+	+	+
20				$2.78 \times 10^5$	+	+	-	-
21	GII.17		$1.62 \times 10^5$	-	-	-	-	
22			$6.50 \times 10^4$	-	-	-	-	
23			$3.14 \times 10^4$	+	+	-	-	
24			$2.15 \times 10^4$	-	-	-	-	
25			$1.80 \times 10^4$	-	-	-	-	
26			$1.78 \times 10^4$	-	-	-	-	
27		$1.63 \times 10^4$	-	-	-	-		

copies/ $\mu$ L以下のウイルス量ではノロウイルス抗原キットで偽陰性になる傾向がみられ、両遺伝子型のノロウイルス抗原キットに対する反応性に明らかな差はみられなかった。また、No.2のGI.2、No.5のGI.3やNo.11のGII.4はいずれもウイルス量が $10^{6-7}$ copies/ $\mu$ Lと十分量存在するにもかかわらず、それぞれBキット、B、Dキット、Aキットで偽陰性がみられた。ノロウイルス抗原キットで偽陰性となる要因として検体中のウイルス量や抗ノロウイルス抗体が捉えられないgenotypeの可能性が考えられた。ノロウイルス抗原キットの抗ノロウイルス抗体の作製には、バキュロウイルス発現系を利用している。しかし、抗体作製時に使用する蛋白産生遺伝子は、各社公表していないため、標的としている抗原部位が異なる可能性があり、各遺伝子型におけるキットの検出感度に影響していることが考えられた。

CキットについてはGIとGIIを区別することが可能である。No.2の検体はReal time RT-PCR法でGI.2のみの感染事例であったが、CキットではGIとGII

のいずれも陽性反応を示した。Cキットは添付書上、GI、GIIいずれも陽性の場合、再検査を行うことが推奨されている。再検査後、同様の結果の場合には、非特異反応の可能性が否定できないため、GIあるいはGIIの型別は行わず「ノロウイルス陽性」と判定するとされている。今回の検体では、GIIが偽陽性反応を示しており、本キット使用の際には、GI、GIIいずれも陽性を示した場合、判定には注意が必要である。

また、その他のノロウイルス抗原キットの偽陽性例がAキット、Dキットでそれぞれ1例みられた。これまで、ノロウイルス抗原キットによる偽陽性例として、原因は解明されていないが新生児由来の便による報告がある<sup>12)</sup>。今回我々の症例では年齢が47歳、78歳であり、既報との関連性がなく偽陽性の原因は不明であった。

本検討期間後に、新たにIPライン「デュオ」[ノロ・ロタ]（イムノ・プローブ）とラピッドテスト「ノロ」（積水メディカル）のノロウイルス抗原キットが販売された。今後も反応性の低い変異株に対して改良した



ノロウイルス抗原キットや新規発売のノロウイルス抗原キットに臨床検体を用いた検討および評価が求められる。以上より、ノロウイルス抗原キットは操作が簡便であり、迅速性にも優れているため臨床現場の検査法として有用性が高い。しかし検査の際は使用するノロウイルス抗原キットの感度や特異性に限界があることに留意しておく必要がある。臨床で使用する場合はその時期に流行している genotype や症状などを総合的に判断し、ノロウイルス抗原キットを適切に活用することで感染拡大の抑制に貢献できると考えられる。

利益相反自己申告：共著者高橋 聡はシノテスト株式会社から奨学寄附を受けている。

#### 文 献

- 1) Jeffrey P, James M, James W, Stephen B, John W, Suzanne M, *et al.* : "Norwalk-Like Viruses". CDC, MMWR 2001 ; 50 (RR09) : 1—18.
- 2) 牛島廣治：ノロウイルスの診断法. 日本医事新報 2006 ; 4281 : 63—7.
- 3) 西尾 治：ノロウイルス検出法. 食安監発第 1105001 号 平成 15 年 11 月 5 日 最終改正 平成 19 年 5 月 14 日 食安監発第 0514004 号 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>. 2017 年 8 月 3 日現在.
- 4) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, *et al.* : Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to Norovirus in Japan. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 2988—95.
- 5) Kim JS, Kim HS, Hyun J, Kim HS, Song W :

- Molecular Epidemiology of Human Norovirus in Korea in 2013. Biomed Res Int 2015 ; 468304 : 1—8.
- 6) 牛島廣治：ノロウイルス感染症の現状と診療面の変化. モダンメディア 2016 ; 62 : 196—207.
  - 7) 片山和彦：ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014 年版. IASR 2014 ; 35 : 173—5.
  - 8) 加村真知子, 向野賢治, 下山真智子, 釜田充浩, 辛島紀子：当院におけるノロウイルス胃腸炎のアウトブレイク事例. 日本環境感染学会誌 2016 ; 31 : 113—8.
  - 9) 松島勇紀, 石川真理子, 清水智美, 駒根綾子, 清水英明, 松尾千秋, 他：新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 の流行. IASR 2015 ; 36 : 175—8.
  - 10) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, *et al.* : Genetic analysis of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. Euro Surveill 2015 ; 20 (26) : 21173.
  - 11) Khamrin P, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, *et al.* : Evaluation of immunochromatography tests for detection of novel GII.17 norovirus in stool samples. Euro Surveill 2015 ; 20 (28) : 21185.
  - 12) 高橋伸方, 和田智顕, 池田政憲：NICU におけるノロウイルスの pseudo-outbreak. 小児感染免疫 2010 ; 22 (3) : 223—6.

Evaluation of Performance Among *Norovirus* Antigen Detection Kits with Immunochromatography

Yuki SATO<sup>1)</sup>, Masaaki SHINAGAWA<sup>1)</sup>, Yusuke TAKAHASHI<sup>1)</sup>,  
Masachika SAEKI<sup>1)</sup>, Yuki YAKUWA<sup>1)</sup> & Satoshi TAKAHASHI<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital,

<sup>2)</sup>Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

We have evaluated the performance among four brands of immunochromatography (IC) assay kits, available in the market in Japan, for detection of norovirus antigen and compared with Real Time PCR (RT-PCR) assays. The four brands used were ImmunoCatch-Noro (A Kit, EIKEN CHEMICAL Co., Ltd., Tokyo, Japan), Quick Chaser-Noro (B Kit, MIZUHO MEDY Co., Ltd., Saga, Japan), GE test Noro Nissui (C Kit, NISSUI PHARMACEUTICAL Co., Ltd., Tokyo, Japan), and Quick Navi-Noro2 (D Kit, DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tokyo, Japan). The results from the RT-PCR analysis of 69 suspected cases of norovirus infection identified 6 cases of Genogroup I (GI) and 22 cases of Genogroup II (GII) infection, whereas one case among them had a mixed infection of both GI and GII. The virus titers of the positive samples varied from  $1.54 \times 10^1$  to  $3.14 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L. The genotypes identified were as follows : GI, GI.1 (1 case each), GI.2 (3 cases), and GI.3 (2 cases) ; GII, GII.2 (1 case each), GII.4 (7 cases), GII.13 (2 cases), and GII.17 (12 cases). The positive concordance rates between the IC assay kits and the Real Time RT-PCR were as follows : A, 59.3% ; B, 51.9% ; C, 51.9% ; and D, 48.1%. On the other hand, the negative concordance rates were as follows : A, 97.6% ; B, 100% ; C, 100% ; and D, 97.6%. There was good agreement among the kits in norovirus detection as assessed with the  $\kappa$  coefficient. GII.17/Kawasaki308, known to be weakly-reactive for norovirus antigen assay kits, was detected in 12 cases ; however, the samples with a virus titer of  $10^1$  to  $10^5$  copies/ $\mu$ L or less tended to test false-negative. The sensitivity of detection, which is a limitation of norovirus antigen assay kits, as well as the reaction specificity of the assay should be of consideration in the use of IC assay kits in the clinical environment.