

[治 験]

イムノクロマト法を用いたベロ毒素の迅速検出法の評価

河原隆二・勢戸和子・田口真澄・小林一寛
大阪府立公衆衛生研究所

(平成 16 年 7 月 8 日受付, 平成 16 年 9 月 24 日受理)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) のベロ毒素 (VT) の迅速検出法としてイムノクロマト法を応用したキャピリアVT (日本ベクトン・ディッキンソン) の有用性を逆受身ラテックス法 (RPLA 法) と比較検討した。大阪府下で分離された EHEC 39 株および他の病原細菌 50 株を用いて試験を行ったところ, 特異性は 100% 一致したが, 感度は RPLA 法の 1/4 から 1/16 を示した。本キットは操作が極めて簡便で, さらに迅速に結果が得られることから, EHEC の鑑別方法として有用であると思われる。また臨床材料から直接 VT を検出できるか検討するため, ヒト糞便 (230 検体) およびその増菌培地 (83 検体) に対して本キットと培養法を比較した結果, 一致率は各々約 80%, 70% であったため, 臨床材料から VT を検出するにはさらに検討が必要であると考えられた。

Key words: 腸管出血性大腸菌, ベロ毒素, イムノクロマト法, 迅速検査法

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) 感染症は, 1996 年の大規模な集団発生以降は, 保育所や老人保健施設などにおける小・中規模な集団感染が多くなり事例当たりの規模は縮小傾向にある。しかし最近では食品流通を介した広域発生や散発事例も多く見られるなど, 発生状況は変化したがいまだにその勢いは衰えておらず, 全国における発生報告数は 2002 年で 3185 件に達した¹⁾。

我が国で分離される EHEC の多数を占める O157¹⁾ については種々の選択分離培地や同定キットなどが市販されており, 比較的容易に検出できるようになった。しかし, O157 の中にはベロ毒素 (VT) 非産生株が存在し, VT 産生株との鑑別には逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA 法)²⁾, 酵素免疫測定法 (ELISA 法)^{3), 4)} や PCR 法⁵⁾ など免疫学的または分子生物学的方法による VT の証明が必須となる。

また近年, O157 以外の血清型の EHEC が分離される割合が増加傾向¹⁾ にあり, その検出の重要性が指摘

されている^{6)~8)}。このうち, 分離頻度が高いのは O26, O111 であり, そのほかに市販の血清で型別不能な株をはじめとした多様な血清型が報告されている。これらの EHEC の検出は O157 のように選択分離培地が普及しておらず, また生化学的性状や血清型などから EHEC であることを推測するのはほぼ不可能である。

したがって O157 を含めいずれの血清型においても, EHEC の鑑別には VT の検索を行う必要がある。しかし従来法は操作が煩雑であるため, 食中毒事例など多くの検体に対し VT の検索をするには大変な労力を要する上に, コストの面においても, ルーチン検査としてどの施設でも実施できるものとは言えない。また結果を得られるまでに半日から一日かかるため, 治療や感染拡大防止を図る上で迅速に対応しにくいというのが実情である。このため, EHEC を見逃しなく検出し, その後の迅速な対応を行うためには, より迅速・簡便な VT 検査法を開発する必要がある。

そこで, 本研究では VT を迅速・簡便に検出することを目的に開発されたキャピリアVT (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い, その特異性および感度を VTEC-RPLA「生研」(以下 RPLA, デンカ生研) と比較し, さらに臨床検体に対してその有用性を検討した。

著者連絡先: (〒537-0025) 大阪市東成区中道 1-3-69
大阪府立公衆衛生研究所
河原 隆二
TEL: 06-6972-1321
FAX: 06-6972-0772
E-mail: kawahara@iph.pref.osaka.jp

材料と方法

1. 菌株および臨床材料

供試菌は、1998年から2001年にかけて大阪府下で分離し、大阪府立公衆衛生研究所にて保存していた EHEC 39 株 (O157:H7 29 株, O26:H11 6 株, O111:HUT 2 株, O111:HNM 2 株), VT 非産生の *E. coli* を含む腸管系を中心とした病原細菌 50 株を用いた (Table 1)。

臨床材料として、2002年に医療機関および保健所で EHEC 検査の対象となった患者および健常者の糞便 230 検体を使用した。このうち、EHEC 陽性検体は 16 検体であった。検体は採取後密封容器に入れ、4°C にて 0 から 30 日保存した。

2. キャピリアVT

本キットは、金コロイド標識抗ペロ毒素モノクローナル抗体を使用したイムノクロマトキットである。ペロ毒素 1 型 (以下 VT1), ペロ毒素 2 型 (以下 VT2) それぞれに対する抗体が混合されているため、VT 型にかかわらず検出可能となっている。

キット添付の説明書に従い、被検液 100 μ l をキャピリアVT の試料滴下部に滴下し、15 分後にテストブ

レートの判定部のライン (赤紫色) にて VT の有無を判定した。

3. キャピリアVT の特異性の検討

特異性の検討に用いる被検液は、O'Brien らの方法⁹⁾に準じて調整し、キャピリアVT および RPLA に供した。

菌株を保存培地からトリプトソーヤ・ブイヨン培地 (以下 TSB, 日水製薬) にて 35°C で一夜培養した後、その 1 白金耳をトリプトソーヤ寒天培地 (以下 TSA, 日水製薬) に接種し、35°C で 20 から 24 時間培養した。発育菌を 1 白金耳かき取り、0.5 ml の生理食塩水に懸濁して濃厚菌液とした。これを超音波細胞破碎機 (BIORUPTOR, コスモ・バイオ) で 10 分間処理した後、遠心してその上清を被検液とした。また EHEC の一部 (19 株) を毒素産生を促進する培地である CAYE 培地^{2), 10)} (自家調整) に接種し、35°C で 20 から 24 時間振とうしその培養液を超音波処理して同様にキットに用いた。

4. キャピリアVT の感度の検討

生理食塩水で 100 ng/ml に調整した RPLA キット添付の対照ペロ毒素 1 型、ペロ毒素 2 型を、キャピリ

Table 1. Specificity of CapiliaVT and RPLA methods performed with clinical isolates.

Isolates	No. of tested	No. of positive	
		CapiliaVT	RPLA
EHEC (toxin types)			
VT1	14	14	14
VT2	8	8	8
VT1+2	17	17	17
Total (Positive rate)	39	39 (100%)	39 (100%)
non-EHEC			
<i>Escherichia coli</i>	29	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	5	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	0
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0
<i>Escherichia hermanii</i>	1	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	1	0	0
Total (Positive rate)	50	0 (0%)	0 (0%)

アVT 用として調整した検体希釈液 (1% sodium chloride, 0.5% 2-methacryloyloxy ethyl phosphocholine, 0.05% polyoxyethylene stearyl amine, 0.09% sodium azide を含む 200 mM Tris-HCl buffer pH 7.5) で希釈系列を作成し, キャピリアVT の陽性反応を示す最小毒素力価を求めた。さらに, EHEC 39 株より調整した被検液から希釈系列を作成して, RPLA 法における VT 力価とそれに対応するキャピリアVT の陽性率を求めた。

5. 糞便を用いた培養法とキャピリアVT の比較

糞便はキャピリアVT 用検体希釈液 1 ml に固形便 50 mg または液状便 50 μ l を懸濁し, これを被検便液とした。

また, 糞便のうち 83 検体はセフィキシム・亜テルル酸カリウム (以下 CT, ソルビットマッコンキー寒天 CT サプリメント, アスカ純薬) 加 TSB にて 35°C で一夜増菌培養を行い, この培養液 50 μ l をキット添付希釈液 1 ml で希釈して, キャピリアVT に用いた。同時に, 糞便を CT 加ソルビトール・マッコンキー寒天培地 (以下 CT-SMAC, 日水製薬) および DHL (日水製薬) に塗布し, EHEC の発育の有無を確認した。

結 果

1. キャピリアVT の特異性の検討

血清型や VT 産生型が異なる EHEC 39 株に対し, キャピリアVT はすべて陽性を示し RPLA の結果と 100% 一致した (Table 1)。EHEC 以外の下痢原性大腸菌 (毒素原性大腸菌, 腸管病原性大腸菌など) を含む *E. coli* やその他の腸管感染症に関連する菌種など VT 非産生菌の 50 株はすべて陰性を示した。また, 一部の EHEC について CAYE 培地からも被検液を調整したが, 実施した 19 株すべてが陽性を示し, 培地による差は見られなかった。

2. キャピリアVT の感度の検討

標準 VT に対する本キットの検出限界は, RPLA 法

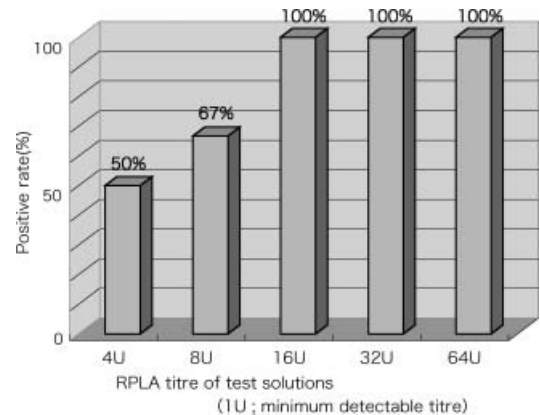


Fig. 1. Sensitivity test of CapiliaVT and RPLA with EHEC isolates.

での最小毒素力価を 1 単位 (U) としたとき, VT1; 8 U, VT2; 4U を示した。これは毒素量に換算すると VT1 で約 6.25 から 12.5 ng/ml, VT2 で約 3.125 から 6.25 ng/ml となり, RPLA 法 (0.78 から 1.56 ng/ml) より感度はやや低いという結果となった。

また EHEC 39 菌株から調整・希釈した被検液に対し, 各々の VT 力価における本キットの陽性率は 4U で 50% (18/36), 8U で 67% (22/33), 16U 以上で 100% (37/37) 陽性となった (Fig. 1)。すなわち本キットは通常の検査で用いられる被検液においても, 精製 VT と同様に RPLA 法の 4 から 16 分の 1 の感度を持つことが示された。

3. 臨床検体に対するキャピリアVT 適用の可否

糞便を直接検体としたときの結果を Table 2 に示した。培養法と本キットの結果の一致率は 80.9% となり, 培養法で EHEC 陽性で本キット陰性となった「偽陰性」が 4.3%, 培養法陰性, 本キット陽性の「偽陽性」が 14.8% であった。

また増菌培地では, 培養成績との一致率は 71.1% となり糞便直接法よりやや低い結果となった。

Table 2 Comparison between CapiliaVT and conventional culture method with stools.

Culture	CapiliaVT	Stools	
		No. of tested (%)	Incubated broth
		No. of tested (%)	
+	+	6 (2.6)	2 (2.4)
+	-	10 (4.3)	11 (13.3)
-	+	34 (14.8)	13 (15.7)
-	-	180 (78.3)	57 (68.7)
Total		230 (100)	83 (100)
Concordance rate		186/230 (80.9)	59/83 (71.1)

考 察

キャピリアVTは、臨床分離株から極めて簡単な操作で、短時間かつ容易にVTを検出することができた。今回、被検毒素液の調整には超音波細胞破碎機を用いたが、ポリミキシンB処理を行うことで同様の結果を得ることができる¹¹⁾ため、特別な機器の導入は必要なく、施設を問わず実施可能である。また、判定までの時間は被検液調整を含め超音波処理なら40分、ポリミキシンB処理でも1時間10分となり、従来法と比べると大幅な時間短縮、簡便化を図ることができる。

本キットの特異性についてはRPLA法と一致したが、感度の点ではRPLA法よりやや低く、その差は4から16倍であった。しかし、すでに市販されている同様のイムノクロマトキットより感度は高く¹²⁾、供試菌液の濃度に注意し、さらに菌体破碎処理を行えば、血清型にかかわらずEHECを効率よく鑑別できると考えられた。

また現在、臨床検体から直接VTを検出可能なELISAキットが市販されているが、ベッドサイドで手軽に実施することができず、非特異反応によると思われる偽陽性例が大阪府のみならず、海外でも発生しており¹³⁾、検査法としての信頼性・実用性の点で問題があると思われる。症状からEHEC感染が強く疑われる患者糞便が、イムノクロマト法でVT陽性を示したため、精査したところ市販血清では型別不能であるO121:H19 (VT2産生, 2例), O177:HNM (VT2産生, 1例)を分離したとの事例が大阪府下で発生しており、特に急性期の下痢検体についてスクリーニング検査として本キットを用いることができれば、O157以外の血清型も検出しやすくなるなど臨床上のメリットは大きい。しかしながら今回の検討では、偽陽性や偽陰性が多く見られる結果となった。これには、検体のほとんどが採取後数日から1カ月経過してしまっていたこと、投薬後の検便検体が含まれていたことなどの影響もあったと推測されるが、現状では便検体に対し本キットを使用するのは適当ではないと思われる。また、増菌培地を用いたときの一致率が低い結果を示したのは、VT産生に最適化されていないO157用の増菌培地ではVT濃度が十分に上がらなかったものと思われた²⁾。したがって本キットの臨床検体への応用には、非特異的反応を軽減する希釈液や抗体の特異性などの改良、VTの産生を誘導できる増菌培地の開発などさらに検討が必要である。

最近、患者便を塗布した分離平板上の集落をまとめてかき取り、ポリミキシンB処理した被検液について

類似のイムノクロマトキットを用いてVT検出を行い、良好な結果が得られたとの報告がなされた¹⁴⁾。この方法は検査の早い段階でスクリーニング法として行うことができるため、キャピリアVTにおいても有用な方法であると考えられる。

以上、今回の検討から、キャピリアVTは臨床検体のスクリーニング方法としてはまだ改良の必要があるものの、分離菌株に対してはRPLA法と同等に使うことができ、簡便性・迅速性を考慮すると極めて有用であることが示唆された。

本論文の要旨は第14回日本臨床微生物学会総会(2003年2月, 名古屋市)において発表した。

文 献

- 1) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課. 2003. 腸管出血性大腸菌感染症 2003年5月現在. 病原微生物検出情報 24: 129-130.
- 2) 甲斐明美, 尾畑浩魁, 畑山 薫, 他. 1997. ラテックス凝集反応法によるVero毒素産生性大腸菌の同定: 大腸菌ベロトキシン検出用試薬の評価. 感染症誌 71: 248-254.
- 3) Kehl, K. S., P. Havens, C. E. Behnke, et al. 1997. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 35: 2051-2054.
- 4) 小松 方, 相原雅典, 島川宏一, 他. 1998. ELISA法による糞便中Vero毒素の検出と抗Vero毒素抗体による偽陽性反応の識別. 日本臨床微生物学雑誌 8: 226-232.
- 5) 小林一寛. 1991. 腸管出血性大腸菌のPCR法による検出. 臨床と微生物 18: 507-513.
- 6) Fey, P. D., R. S. Wickert, M. E. Rupp, et al. 2000. Prevalence of non-O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stool samples from Nebraska. Emerg. Infect. Dis. 6: 530-533.
- 7) Park, C. H., H. J. Kim, D. L. Hixon. 2002. Importance of testing stool specimens for Shiga toxins. J. Clin. Microbiol. 40: 3542-3543.
- 8) 田中 博, 谷尾進司, 保科 健, 他. 2002. 中・四国地区における腸管出血性大腸菌感染症の疫学的解析と分離菌株の細菌学的検討. 感染症誌 76: 439-449.
- 9) O'Brien, A. D., G. D. Laveck. 1982. Immunological and cytotoxic activities of *Shigella dysenteriae* 1 (shiga) and shiga-like toxins. Infect. Immun. 35: 1151-1154.
- 10) Tsukamoto, T., Y. Kinoshita, S. Taga, et al. 1980. Value of passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin.

- Microbiol. 12: 768-771.
- 11) Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, et al. 1985. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. J. Clin. Microbiol. 22: 614-619.
- 12) 小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子. 1999. イムノクロマト法による志賀毒素 (STx) の迅速, 簡便検出法. 感染症誌 73: 213-217.
- 13) 2001. University Outbreak of Calicivirus Infection Mistakenly Attributed to Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7—Virginia, 2000. MMWR 50: 489-491.
- 14) Park, C. H., H. J. Kim, D. L. Hixon, et al. 2003. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. J. Clin. Microbiol. 41: 2650-2653.

Evaluation of an Immunochromatographic Test for a Rapid Detection of Vero Toxins

Ryuji Kawahara, Kazuko Seto, Masumi Taguchi, Kazuhiro Kobayashi
Osaka Prefectural Institute of Public Health

Vero Toxins (VT) produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are one of the major virulence factors and bring lethal outcome to some patients due to hemolytic uremic syndrome. CapiliaVT, an immunochromatographic test for the rapid detection of the VT, was evaluated by comparison with the reversed passive latex agglutination (RPLA) kit. All specimens prepared with EHEC isolated 39 strains showed positive and all other pathogenic bacteria 50 strains showed negative for the CapiliaVT kit. The results indicated that the specificity of the kit was completely corresponding with that of RPLA kit. Though, the sensitivity was lower than that of RPLA (between 1/4 to 1/16) when dilution test of samples obtained with EHEC isolates was performed. The sensitivity and specificity of the CapiliaVT kit was lower than that of conventional culture method (EHEC isolation) when 230 stool specimens and 83 further cultured broth were examined. It was shown that the CapiliaVT kit needs further improvement for detection VT in clinical specimens. Considering its rapidity and simplicity, we conclude that the CapiliaVT is the excellent kit to identify EHEC for the isolated strain but remain a problem with sensitivity and specificity.