

[原 著]

腸管出血性大腸菌検査における O157 イムクロマト法の評価

勢戸和子・河原隆二・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 17 年 1 月 12 日受理)

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の迅速診断法として開発されたイムクロマトキットキャピリア O157 の有用性を評価するため、糞便検体から直接 O157 抗原を検出し、培養法および市販イムクロマトキット NOW EH *E. coli* O157 (NOW) の成績と比較検討した。培養法にて EHEC O157 が検出された糞便 112 検体のうちキャピリア O157 は 100 検体、NOW は 96 検体で陽性を示し、検出率はキャピリア O157 の方が優れていた。培養陰性でキットが非特異反応を示したと考えられる検体数は、キャピリア O157 で 7 検体、NOW では 2 検体と前者の方が多く見られたが、O157 菌株を用いたキャピリア O157 の検出感度は 10^4 CFU/ml と NOW よりも 1 オーダー高く、検出感度を上げるための反応系が非特異反応の一因となることが推察された。EHEC の確定診断や疫学解析に原因菌の分離は不可欠だが、キャピリア O157 は糞便中の EHEC O157 を検出するスクリーニング法として有用であると考えられた。

Key words: 腸管出血性大腸菌, 志賀毒素産生性大腸菌, O157, イムクロマト法, 迅速検査法

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症の確定診断には EHEC の分離同定が不可欠であるが、これには 2~3 日を要することから、血便や強い腹痛など臨床症状から EHEC 感染症が疑われる場合には、糞便から直接迅速診断キットが使用されることがある。特にイムクロマト法は、操作が簡便で結果が 15 分以内に得られることから、迅速検査法として注目され、EHEC O157 や志賀毒素 (VT) の検出キットとしてその有用性が報告されている^{1)~3)}。しかしながら、糞便検査における検討が十分になされておらず、イムクロマト法陽性であるが EHEC が分離されない症例が毎年数例あり、行政対応上問題が生じる場合がある。そこで今回、EHEC O157 の迅速検査法として開発されたイムクロマトキット「キャピリア O157」(以下キャピリア, 日本ベクトン・ディッキンソン) について、その特異性および検出感度を検討するとともに、糞便について O157 抗原を検出し、培養法の成績と比較してその有用性を評価した。また、同種のキットである

NOW EH *E. coli* O157 (以下 NOW, アスカ純薬) を同時に使用し、キット間の比較も実施した。

材料と方法

材料: 菌株は、当課保存の *Escherichia coli* 45 株 (O157 36 株, O26 7 株, O111 1 株, O118 1 株) と *E. coli* O157 と同一抗原をもつ⁴⁾ *Salmonella* O30 5 株, *E. coli* と共通あるいは同一抗原をもつと報告されている^{5), 6)} *Escherichia hermannii* および *Citrobacter freundii* 各 2 株, *Enterobacter cloacae* 1 株, *Vibrio parahaemolyticus* 2 株の合計 57 株を用いた。これらの菌株は、普通寒天培地 (以下 NA, 日水製薬) 発育菌から加熱死菌液を作製し、多価血清である病原大腸菌免疫血清 O157 (以下 O157 血清, デンカ生研) およびモノクローナル抗体感作ラテックスを用いた大腸菌 O157 検出キット「UNI」(以下 UNI, Oxoid) で O157 抗原を確認した。臨床材料には、2001 年 7 月~2002 年 10 月に医療機関および保健所などで EHEC 検査の対象となった採便後 7 日目までの 4°C 保存糞便 281 検体を使用した。このうち 100 検体はシードスワブ 1 号 (栄研化学) に採取されていた。

キット: 菌液あるいは糞便希釈液 100 μ l を、キャピリアでは試料滴下部に、NOW ではスワブに滴下し、15 分後に判定部の青紫色ラインの発色を判定した。

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
勢戸和子
TEL: 06-6972-1321
FAX: 06-6972-0772
E-mail: seto@iph.pref.osaka.jp

なお、両キットとも判定部の対照域が発色しなかったものは判定不能とした。

特異性および検出感度の測定: トリプトソイブロス (以下 TSB, 日水製薬) で前培養した被検菌を NA に塗抹し、発育菌を生理食塩水に懸濁した後、キャピリアに添付の検体希釈液 (以下添付液) および生理食塩水で 10 倍階段希釈系列を作製して、キャピリアには希釈添付液を、NOW には希釈生理食塩水を滴下した。また任意の希釈液を NA に 0.1 ml ずつ塗抹し生菌数を測定して、滴下菌液濃度を計測した。

糞便を用いた培養法とキットとの比較: 培養検査にはセフィキシム・亜テルル酸カリウム (以下 CT, アスカ純薬) 加ソルビットマッコンキー寒天培地 (日水製薬) と DHL 寒天培地 (日水製薬) を併用し、精査が必要となった糞便 12 検体では、CT-TSB による増菌培養 (37°C, 20 時間) も実施した。分離された *E. coli* は、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いた型別と、PCR 法⁷⁾または VTEC-RPLA (デンカ生研) を用いた毒素産生性試験を実施し、直接分離培養で EHEC O157 が分離された場合を培養陽性と判定した。また、糞便は粘稠性が高いため添付液で 20~30 倍に希釈し、100 μ l を両キットに滴下した。

結 果

1. 特異性

被検菌株 57 株について O157 血清および UNI で O157 抗原を確認したところ、54 株は両方法の成績が一致し、O157 抗原陽性あるいは陰性と判定できた (Table 1)。このうち O157 抗原陽性の 42 株 (*E. coli* 36 株, *Salmonella* O30 5 株, *C. freundii* 1 株) は

100 μ l 中 10^3 ~ 10^5 個でキャピリア、NOW の両キットとも陽性を示し、O157 抗原陰性株 12 株 (*E. coli* 9 株, *E. cloacae* 1 株, *V. parahaemolyticus* 2 株) は 10^6 ~ 10^7 個の滴下でも陰性であった。残りの 3 株は O157 血清陽性・UNI 陰性を示し、*C. freundii* 1 株は 10^6 個で、*E. hermanii* 2 株は 10^7 個でキャピリア陰性、NOW 陽性を示したが (Table 1), それぞれ 10^4 個, 10^6 個に希釈すると NOW は陰性化した。

2. 検出感度

O157 抗原陽性の 42 株について、各希釈液の 100 μ l をキットに滴下して検出感度を求めた (Table 2)。キャピリアでは、 10^2 個で 42 株中 37 株 (88.1%) が陽性を示し、残りの 5 株も 10^3 個で陽性と判定されたが、NOW は、 10^2 個で 38 株中 8 株 (21.1%), 10^3 個で 42 株中 39 株 (92.9%) が陽性を示し、 10^4 個で全株陽性と判定された (Table 2)。すなわち、キットの検出感度はキャピリアで 10^4 CFU/ml, NOW では 10^5 CFU/ml となり、キャピリアの方が 1 オーダー高い成績が得られた。

3. 培養法とキットとの比較

糞便からの EHEC O157 検出において、培養陰性の 1 検体でキャピリアが判定不能となったため、280 検体の成績で比較検討したところ、培養法とキャピリアの結果が一致した検体は 255 検体で一致率は 91.1% を示し、培養法と NOW の一致率 (260 検体, 92.9%) に匹敵する成績であった (Table 3)。特に培養陽性 112 検体のうちキャピリア陽性は 100 検体、NOW 陽性は 96 検体で、検出率はキャピリアの方が優れていた。培養陽性・キャピリア陰性の不一致は 12 検体あり、いずれも NOW 陰性であった (Table

Table 1. Specificity of agglutination tests and immunochromatographic assay kits with the clinical isolates.

Isolates	No. of tested	No. of positive			
		Diagnostic serum*1	UNI*2	Capilia	NOW
<i>E. coli</i> O157*3	36	36	36	36	36
<i>Salmonella</i> O30	5	5	5	5	5
<i>C. freundii</i>	2	2	1	1	2
<i>E. hermanii</i>	2	2	0	0	2
<i>E. coli</i> O26, O111, O118*3	9	0	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	1	0	0	0	0
Total	57	45	42	42	45

*1 Anti-O157 serum (Denka Seiken)

*2 *E. coli* O157 Latex Test UNI (Oxoid)

*3 Including EHEC

Table 2. Sensitivity tests of Capilia and NOW with clinical isolates possessing O157 antigen.

Applied concentration*1	Capilia		NOW	
	No. of positive/ No. of tested	(%)	No. of positive/ No. of tested	(%)
10 ¹	7/37	(18.9)	1/ 8	(12.5)
10 ²	37/42	(88.1)	8/38	(21.1)
10 ³	37/37	(100)	39/42	(92.9)
10 ⁴	10/10	(100)	19/19	(100)

*1 CFU/100 µl

Table 3. Performance of immunochromatographic assay kits with stool specimens.

EHEC O157 isolation*1	Capilia*2		NOW*3	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	100	12	96	16
Negative	13	155	4	164

*1 Conventional culture method.

*2 Overall agreement to EHEC O157 isolation: 91.1% (255/280)

*3 Overall agreement to EHEC O157 isolation: 92.9% (260/280)

Table 4. Comparison between conventional culture method and immunochromatographic assay kits with stool specimens.

EHEC O157 isolation*1	Capilia	NOW	No. of specimens
+	+	+	96
+	+	-	4
+	-	-	12
-	+	+	4
-	+	-	9
-	-	-	155
Total			280

*1 Conventional culture method.

4)。

一方、培養陰性 168 検体のうち 155 検体はキャピリア、NOW とともに陰性を示したが、残りの 13 検体のうち 4 検体は両キットとも、9 検体はキャピリアのみ

陽性を示した (Table 4)。両キット陽性の 4 検体はいずれも EHEC O157 患者の接触者検便で、2 検体は *E. coli* O157:H16 (VT 陰性) あるいは O157 血清および UNI 陽性の *C. freundii* が分離された。再検査が可能であった 12 検体について増菌培養を実施したところ、キャピリアのみ陽性の 1 検体で EHEC O157 が分離された。

考 察

EHEC O157 の検出試薬として体外診断用医薬品および食品検査用試薬が数種類市販されている^{1), 2), 8)}が、菌株を用いた検討で、キャピリアは特異性、検出感度ともに従来品より優れているとの結果が得られた。すなわち、抗 O157 モノクローナル抗体を用いた UNI とは反応せず、*E. coli* O157 抗原と交差反応を示す菌株であると考えられた *E. hermannii* 2 株および *C. freundii* 1 株について、NOW では陽性と判定される菌数でもキャピリアでは陰性となり、キャピリアの方が高い特異性を示した (Table 1)。検出感度についても 10⁴ CFU/ml と NOW より高感度であり、同種の O157 検出キット 5 品について報告された⁸⁾検出感度 (10⁶~10⁷ 個/ml 以上) よりも 100~1,000 倍の感度を示した。

糞便を用いた検討でも、培養陽性検体の検出率はキャピリアのほうが NOW に比べ高く (Table 3)、キャピリア陰性・NOW 陽性の検体は見られなかった (Table 4) ことから、キャピリアは NOW に比べ高感度であるといえる。培養陽性・キャピリアおよび NOW 陰性の不一致が 12 検体見られたが (Table 4)、このうち 9 検体はシードスワブに採便されており、実際には糞便が 30 倍以上に希釈され検出感度を下回ったものと推察された。

培養陰性・キャピリア陽性の不一致は 13 検体見られたが、このうち *E. coli* O157:H16 陽性、O157 抗原保有 *C. freundii* 陽性、増菌で EHEC O157 陽性の 3 検体は、キャピリア陽性の判定が非特異反応とは考えられない。また、別の 3 検体は抗菌薬服薬が明らかな患者便で、薬剤の影響で培養陰性となったものと推察された。これらを除くと、キャピリアで偽陽性が疑われる検体数は 7 検体であると考えられた。一方、NOW で偽陽性が疑われる検体数は、前述の *E. coli* O157:H16 および O157 抗原保有 *C. freundii* 陽性の 2 検体を除く 2 検体であり、これらの成績は、イムノクロマト法陽性であっても、キャピリアでは 6.2% (7/113)、NOW では 2% (2/100) は非特異反応である可能性を示している。しかしながら、培養陽性検体

におけるキャピリアの陽性率はNOWよりも高く、検出感度が高いことが非特異反応の一因となっていると考えられ、検体のスクリーニングというキットの使用目的を考えると、多少の非特異反応は示しても見逃しが少ないほうが望ましいと思われる。

キャピリアは糞便から直接O157抗原を検出する迅速検査法として非常に有用であるが、糞便中の菌数が少ない場合には偽陰性を呈すること、同一抗原をもつ *Salmonella* O30 や *C. freundii* では陽性を示すこと、*E. coli* O157 にはVT陰性株も存在することを考慮し、本キットの結果だけで診断してはならない。2000～2002年に感染症情報センターに報告されたヒト由来 *Salmonella* 8,048株中O30は3株(0.04%)⁹⁾と分離頻度は低いが、O157と共通抗原をもつ *C. freundii* は本研究でも1検体から分離され、食品についても378検体中15検体(4.0%)から検出されたとの報告¹⁰⁾があり、十分に注意が必要である。

同様のイムノクロマト法でVTを検出するキット「キャピリアVT」も開発され、分離株のVT産生性を迅速簡便に判定できることが確かめられている¹¹⁾。分離された大腸菌に使用するキットであり、糞便直接の使用には課題が残るが、血清型O157以外のEHECは増加しており¹²⁾、急性期の患者便に両キットを併用できれば、精度の高い迅速診断が可能になると期待される。いずれにせよ、EHECの確定診断や疫学解析には分離株が必要であり、スクリーニングの結果を参考にして効率的な培養検査を実施しなければならない。また、行政機関は、イムノクロマト法の結果のみによる届出に際しては、患者情報や菌分離の有無を確認の上、行政的疫学調査の必要性を判断すべきである。

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) 小松 方, 相原雅典, 長坂陽子, 他. 1997. ラテックス凝集法およびイムノクロマトグラフィーを用いた糞便中 *Escherichia coli* O157:H7 の迅速検出法について. 感染症誌 71: 1124-1129.
- 2) 竹田多恵, 山形匡子, 吉田祐司, 他. 1998. イムノクロマトグラフィー市販キットを用いた *Escherichia coli* O157 患者の迅速診断. 感染症誌 72: 834-839.
- 3) 小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子. 1999. イムノクロマト (EIA) 法による志賀毒素 (STx) の迅速, 簡便検出法. 感染症誌 73: 213-217.
- 4) Shimada, T., Y. Kosako, Y. Isshiki, et al. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 possesses somatic (O) antigen identical with that of *Salmonella* O30. Curr. Microbiol. 25: 215-217.
- 5) Rice, E. W., E. G. Sowers, C. H. Johnson, et al. 1992. Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. J. Clin. Microbiol. 30: 1315-1316.
- 6) Bettelheim, K. A., H. Evangelidis, J. L. Pearce, et al. 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. J. Clin. Microbiol. 31: 760-761.
- 7) 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.
- 8) 塚本定三, 河合高生, 竹田美文. 1998. 糞便からの大腸菌O157の迅速同定のための市販検出キットの評価. 感染症誌 72: 40-44.
- 9) 病原微生物検出情報ホームページ. <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>
- 10) 塚本定三, 神吉政史, 河合高生, 他. 1999. 各種食品から検出された大腸菌O157と共通のO抗原をもつ *Citrobacter freundii* について. 日食微誌 16: 215-220.
- 11) 河原隆二, 勢戸和子, 田口真澄, 他. 2004. イムノクロマト法を用いたベロ毒素迅速検出法の評価. 日本臨床微生物学雑誌 14: 194-198.
- 12) 病原微生物検出情報. 2002. 23: 137-138.

Evaluation of an Immunochromatographic Assay Kit for a Rapid Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

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

The clinical utility of a new immunochromatographic assay kit Capilia O157 for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (EHEC O157) infection was compared with that of the commercial kit NOW EH E. coli O157 (NOW). When stool specimens from 112 culture-positive persons were directly tested with Capilia O157 and NOW, 100 and 96 samples gave positive results, respectively. Both kit showed false-positive results in seven and two stool specimens from 168 culture-negative persons, respectively. Sensitivity of Capilia O157 was determined using the pure cultures of 42 clinical isolates possessing O157 antigen. Capilia O157 detected them at levels approximately 10-fold lower than those gave positive results with NOW. These results indicated that Capilia O157 was useful as a screening tool for detecting EHEC O157 in stool specimens.