●製品 & 技術

イムノクロマト法検査キット チェックリアO-157

森 健二郎

日東電工 (株) メディカル事業部 研究開発センター
〒567-8680 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

Immunochromatography Test Kit Checlear O-157

Kenjiro Mori

NITTO DENKO CORPORATION 1-1-2, Shimohozumi, Ibaraki, Osaka 567-8680, Japan

Checclear O-157 is the immunochromatography test kit which is developed for easy and rapid detection of *E.coli* O-157 in food. Detection limited of *E.coli* O-157 by this method was 5×10^4 cells/mL. Compare to the result of culture method (official method), data of Checclear O-157 correspond with culture method (official method). But Checclear O-157 showed cross reaction with some strains (*Citrobacter freundii*, *Salmonella urbana*, *Bacillus cereus*) other than *E.coli*. Considering those results, Checclear O-157 will be useful in preliminary screening of *E.coli* O157 in food.

Key words : immunochromatography / *E.coli* O157 / test kit / nitrocellulose membrane

1. はじめに

臨床検査, 食品検査, 環境検査などの分野で, 簡便・迅速に検査が行えるイムノクロマト法の検査キットがよく用いられている. この方法は以前より妊娠検査などに用いられてきた方法であるが, 最近ではインフルエンザウイルスや食品アレルギー物質など様々な検査項目のものが見られるようになった.

イムノクロマト法検査キットでは, ニトロセルロース, ナイロンなどの多孔質膜やガラス繊維濾紙が基材として用いられる. 短冊状にしたこれら基材に, 被検出物質と特異的に反応する抗体などを固定して検出部としたものをクロマト試験片と

呼ぶ. 検査では, クロマト試験片の片端から液状の検体, および, 着色粒子などで標識された抗体溶液を吸収させ, 毛細管現象により液を基材中に展開させる. 検体中に被検出物質が含まれる場合は, 検出部において被検出物質を介して着色粒子が結合する. 例えば, 検出部に抗体を1mm幅のライン状に固定すると, 検体中に被検出物質が含まれる場合は着色粒子の集まりが1mm程度の着色ラインとして目視で観察できる状態になり, 被検出物質が含まれない場合はラインは現れないことになる (Fig. 1).

以下に当社で開発したイムノクロマト法検査キットのチェックリアO-157について紹介する.

2. 大腸菌O157抗原 検出試薬 チェッ クリアO-157

2.1 大腸菌O157

腸管出血性大腸菌の一血清型である大腸菌O157は、日本でも1996年に大規模な感染を引き起こして社会問題になったが、その後も毎年のようにこの菌による食中毒が報告されている。大腸菌O157により小児や老人では胃腸炎に続いて急性腎不全から溶血性尿毒症症候群 (HUS) を起こし、成人でも強い腹痛を伴った多量の出血をみる出血性大腸炎を起こすことが知られている。この菌は牛肉、ハンバーグ、ローストビーフ、レタス、貝割れ大根、キャベツ、アルファルファ、メロン、アップルジュース、ヨーグルト、マヨネーズ、チーズ、井戸水など様々な飲食物を介して感染すると云われている。

2.2 キット構成と検出方法

チェッククリアO-157は、食品に含まれるO157抗原を簡便・迅速に検出するために開発されたイムノクロマト法検査キットである。ニトロセルロースの多孔質膜に抗大腸菌O157ウサギポリクローナル抗体を吸着固定して検出部としたクロマト試験片を組み込んだカセットと、発色用の試薬液で構成されている (Fig. 2)。ニトロセルロース多孔質膜は、菌をスムーズに展開させるために孔径8 μm のものを使用した。孔径やラテラル方向への吸水速度が異なるもの、或いは強度を付与するた

Fig 1 Immunochromatography Assay

Fig. 2 Checkclear O-157 kit and Casette

めにポリエステルフィルムなどで裏打ちされたものなどイムノクロマト法用の膜が販売されているので、これらの中から反応系に適したものを選択することができる。発色用の試薬は、粒径0.2 μm の青色カルボキシル化ポリスチレン系ラテックス粒子 (日東電工製) に抗大腸菌O157ヤギポリクローナル抗体をカルボジイミド法により結合したものである。検出の標識となる着色マーカーとしては金コロイド粒子もよく用いられるが、本キットのように液状の試薬とする場合は、保存性の点から分散安定性が自在に調整できるポリマー粒子に抗体を共有結合するのが最適である。

検出の操作は検体50 μL と試薬液2滴をカセットに滴下するだけである。10~15分後にカセットの判定窓に判定ラインとコントロールラインを認

Table 1 Detection sensitivity (Checlear O-157)

	大腸菌O-157菌濃度 (cells/mL)								
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	5×10 ⁴	10 ⁴	10 ³	ブランク
コントロールライン	±	+	+	+	+	+	+	+	+
判定ライン	±	++	++	+	±	±	—	—	—

++:強陽性, +:陽性, ±:弱陽性, —:陰性

Table 2 Test results of food sample (Checlear O-157)

食品	接種菌数 (cfu/25g)	サンプル数	チェックリアO-157		公定法		キット性能	
			陽性	陰性	陽性	陰性	感度(%)	特異性(%)
牛挽肉	1.1	10	4	6	4	6	100	100
	18	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
牛スライス肉	1	10	4	6	4	6	100	100
	16	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
牛タン	1	10	8	2	8	2	100	100
	16	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
牛レバー	0.6	10	5	5	5	5	100	100
	14	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
カットレタス	0.6	10	5	5	5	5	100	100
	11	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
アルファルファ	0.6	10	6	4	6	4	100	100
	11	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
ブロッコリー	0.6	10	3	7	3	7	100	100
	14	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
牛乳(低温殺菌)	0.6	10	7	3	7	3	100	100
	14	5	5	0	5	0	100	—
	0	5	0	5	0	5	—	100
計		160	82	78	82	78	100	100

めた場合を陽性、コントロールラインのみを認めた場合を陰性と判定する。

2.3 性能

2.3.1 チェックリアO-157の検出限界

大腸菌O157:H7 (ATCC35150) 加熱処理菌の希釈系列50 μLを検体としてチェックリアO-157で

検出した結果、大腸菌O157は5×10⁴ cells/mL以上で陽性と判定された (Table 1)。

2.3.2 チェックリアO-157と培養法 (公定法) との相関性

牛挽肉など食品を対象とした試験を行った。市販の食品8種類について大腸菌O157:H7無接種群、低レベル接種群、高レベル接種群を調製し、これ

Table 3 Correlation of test results (Checlear O157)

		チェックリアO-157	
		陽性	陰性
公定法 (培養法)	陽性	82	0
	陰性	0	78

一致率=100%

らを4℃で24時間保存した後、ノボビオシン添加mEC培地を加えて42℃で18時間静置培養した。これらの培養液についてチェックリアO-157および公定法による検出を行った。結果、大腸菌O157高濃度接種群では公定法の判定において全て陽性となった。一方、低濃度接種群では判定結果に陽性と陰性が混在した。これら公定法の判定結果とチェックリアO-157の検出結果は全て一致した。すなわち、チェックリアO-157と公定法の一致率は100%であった (Table 2, 3)。

2.3.3 チェックリアO-157の特異性

次に反応の特異性について検討した。純培養した 10^8 cfu/mL以上の各種細菌の懸濁液をチェックリアO-157にて検出した。その結果、一部の菌株 (*Citrobacter freundii*, *Salmonella urbana*, *Bacillus cereus*) で交叉反応が見られたが良好な結果と思われる (Table 4)。

2.4 考 察

チェックリアO-157の検出限界は 5×10^4 cells

/mLであった。また、大腸菌O157を接種した食品を用いて公定法との相関性を調べたところ、一致率100%であった。一部の菌株と交叉反応が見られたことから偽陽性反応の可能性はあるものの、偽陰性反応は殆ど無く、食品の一次スクリーニング検査用として有用であると考えられる。

また、チェックリアO-157は本年に新タイプの上市を予定している。新タイプでは、検体と試薬液を滴下する部分に設置したパッド (液溜め) から吸い上げ方式でクロマト試験片へ液を移動させる形状にした。これにより、試験片中を展開し難かった一部の検体 (牛タンや砂肝などの一部) もスムーズに流れるようになり、より確実な検査が可能になると思われる。

3. おわりに

イムノクロマト法の特徴は、基材の毛細管現象を利用することにより、検出部で被検出物質を濃縮するので比較的高感度に検出ができることと、過剰な被検出物質や標識抗体が自然に洗い流されるので洗浄分離の操作が要らないことである。この検出方法は、今後も簡便迅速な検査法として広く用いられると思われる。

(受付 2004年3月10日 掲載決定 3月27日)

Table 4 Specifity test (Checlear O157)

陽性となったもの	<i>Escherichia coli</i> O26:H11, <i>Escherichia coli</i> O111:H21, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Alcalogenes denitrificans</i> , <i>Candida albicans</i>
陰性となったもの	<i>Escherichia coli</i> O157:H7(VT1+VT2) 産生株・VT 非産生株, <i>Escherichia coli</i> O157:NM(VT1) 産生株・(VT2)産生株, <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella urbana</i> , <i>Bacillus cereus</i>