

なった。

多包虫症は現在北海道ではマススクリーニングの形で行政サービスが行われているが、方法はELISAとWestern Blotting(WB)、ほかによっている。ELISAは一次スクリーニングに用いられ、WBは超音波検査、医師による診察などとともに二次検診に使用されている。二次検診の後には専門の医師の診察、最終的に外科手術により確定診断を行うシステムとなっている。しかし佐藤ら⁹⁾は多包虫患者のELISAでの陽性率は90%に達するが、ELISA陽性者のうち実際の患者は1%程度にしかすぎず、高率に偽陽性が認められると報告している。またCTやMRIなどの画像診断の有用性も確かであるが、石灰化などに頼りすぎる危険性も指摘されており、それなりの注意は払うべきであろう。一方、旭川医科大学の伊藤¹⁰⁾は多包虫症の診断用抗原として分子量18 kDaの多包虫骨格成分(Em 18)を使用し、イムノブロット法を用いた診断法を開発している。海外のグループもこのEm 18の精製に成功しており、独自にEm 18-ELISA法を開発している。伊藤らはEm 18の組み替え蛋白の作成にもほぼ成功しており、今後この組み替え蛋白を使用した診断法に移行すると報告している。

第一選択、第二選択薬 ■

赤痢アメーバ症の現時点での第一選択薬は5-ニトロイミダゾール製剤であるメトロニダゾール(フラジール)である。経口錠(250 mg)が現在市場化されている。副作用として実験的には発癌性、変異原性が確認されているが、ヒトでの症例の記録はこれまでに報告されていない。その他、神経系、血液系に基礎疾患がある場合も投与を原則としては控える。下痢、末梢神経炎、白血球減少、運動失調、頭痛、めまいなどの副作用を訴えることもある。重症赤痢、肝膿瘍にしばしば使用されたデヒドロエメチンは現在製造中止となっており入手できない。腸管内の嚢子にはニトロイミダゾール製剤は腸管からの吸収が早いので効果が十分ではないとしばしばいわれている。そのような場合はテトラサイクリンなどを併用するか、

下記研究班より供給されているフロ酸ジロキサニドを使用するが、筆者らはメトロニダゾールを2クール投与するとほとんどの対象が嚢子陰性となることを経験している。

多包虫症の治療は外科的に病巣の全切除を行うのが第一選択の治療法である。しかしこのようなアプローチができない症例もあり、病態に応じアルベンダゾールが投与され、特に肺の転移病巣に対しては効果が50%に確認されているという。進行した肝病巣に対する効果はほとんどないが、時期によってはアルベンダゾールが肝の病巣体積の増加を50%の率で抑制したことも認められており⁹⁾、悪性腫瘍と同等の扱いを必要とするという本疾患の性格を考慮するに、投与対象の病期を正確に把握して投与すれば、治療効果は少なくとも病巣の容積の拡大を抑制できる可能性はあるものといえよう。多くの症例を経験した佐藤は肺転移巣と遺残病巣に対しては補助的にアルベンダゾール投与が行われると述べている¹⁰⁾。

治療の実際と注意点 ■

1. 赤痢アメーバ症

投与量は状況に応じて調整を図るものの、一般には下記の量を原則としている。

(1) アメーバ性大腸炎：フラジール 1,000 mg/day, 分3, 7~10日連用

(2) アメーバ赤痢、アメーバ性肝膿瘍：フラジール 1.25~2.0 g/day, 分3, 7~10日間連用

治療効果が十分でない場合は、3~4週間程度のインターバルをおいて再度投与するか、第二選択薬とみなされる同系統のチニダゾールなどに替える。メトロニダゾール自体は腸管からの吸収が非常に良いが、下痢が激しい場合、あるいは臓器内での薬物濃度を急速に上昇させ、抗アメーバ作用を発揮させたい場合などはフラジールを点滴投与すると効果がある場合がある。ヒューマンサイエンス財団の「熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究班」(連絡先：宮崎医科大学寄生虫学講座、名和行文教授ほか、詳細は文献10)を参照されたい)から無償で提供されている。

(40)

2. 多包虫症

上述のようにアルベンダゾールは補助療法とみなすべきであろうが、疾患の臨床的な重篤さを考えれば、熟知しておくべきものであると考える。

(1) エスカゾール 200 mg 錠, 600 mg/day, 分3, 28日間服薬, 14日間休薬を病状をモニタリングしながら繰り返す。

アルベンダゾールは副作用の少ない薬剤であるが、長期投与を必要とするため、特に投与初期の肝機能障害、貧血、顆粒球減少に関しては注意を払う。

文 献

- 1) 感染症の診断・治療ガイドライン編集委員会編：感染症の診断・治療のガイドライン2004, 日本医師会, 2004
- 2) World Health Organization : Amoebiasis. Weekly Epidemiology Record 72 : 97-99, 1997
- 3) Makioka, A., Kumagai, M. et al. : Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. J Parasitol 88 : 994-999, 2002
- 4) Takeuchi, T., Okuzawa, E. et al. : High sero-

positivity of Japanese homosexual men for amebic infection. J Inf Dis 159 : 808, 1989

- 5) 竹内 勤：わが国におけるアメーバ症の実態の解明と対策確立に関する研究。厚生科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, 平成13年度総括・総合研究報告書, 2002
- 6) 佐藤直樹, 小笠原和宏ほか：エキノコックス症—多包性エキノコックス (alveolar echinococcosis) を中心に。新世紀の感染症学, 日本臨床(増刊) : 636-643, 2003
- 7) Sanuki, J., Asai, T. et al. : Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. Parasitol Res 83 : 96-98, 1997
- 8) Ito, A. : Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections (Review). Parasitol Int 51 : 221-235, 2002
- 9) 佐藤直樹, 内野純一ほか：肝多包虫症に対するメベンダゾールとアルベンダゾールの治療効果に関する臨床的検討。厚生省新薬開発研究事業, 熱帯病治療薬の開発研究, 平成4年度報告書, p. 72-86, 1993
- 10) 佐藤直樹：エキノコックス症(包虫症)。寄生虫症薬物治療の手引き—2003, 改訂第5版, 厚生科学研究費補助金創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業, 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究班, p.41-42, 2003

臨床検査ガイド 2005~2006

これだけは必要な
検査のすすめかた・データのよみかた

編集：

- 和田 攻 東京大学名誉教授
大久保昭行 国立印刷局東京病院顧問
矢崎 義雄 独立行政法人国立病院機構理事長
大内 尉義 東京大学教授

文光堂

4. 免疫学的検査 / C. 感染症・免疫血清診断

血中赤痢アメーバ抗体価(間接蛍光抗体法)

竹内 勤

■ デシジョンレベル (表1)

表1 間接蛍光抗体法(慶大法)による血中抗赤痢アメーバ抗体のデシジョンレベル

抗体価 (血清希釈倍数)	方針	高頻度に見られる疾患	否定できない主要疾患
×64 未満 (陽性下限未満)	糞便検査を併用して感染の有無を決める	赤痢アメーバ感染なし またはキャリア(感染があってもごく早期では上昇していないことがある)	なし(ただし, 以前のアセトン固定抗原を使用すると, 特に腸アメーバ症の場合偽陰性として現れることがあった)
×64	糞便検査と臨床症状の観察が必要	キャリアの一部および腸アメーバ症の一部	やはり上記の可能性がある
×256~1,024	症状があれば糞便検査, 内視鏡などを併用して診断し, 治療を実施する。原則として有症状の時は入院加療の方がよい。無症状であれば糞便の抗原検査などで感染の有無を確認し, 陽性であれば外来にて薬剤投与	腸アメーバ症	なし
×1,024~4,096	早期に化学療法を開始する。肝膿瘍があれば, 入院が必要	腸アメーバ症の一部 肝膿瘍	なし
×4,096 以上	緊急に治療に踏み切る必要があれば化学療法と同時にドレナージなど行う。早期に入院させ処置を行う	肝膿瘍を主体とする転移性アメーバ症	なし

■ 間接蛍光抗体法(IFA)による抗体価の基準値

表2にはわが国において実施されている赤痢アメーバ症の血清診断に用いる間接蛍光抗体法(IFA)の陽性下限の血清希釈倍数値を記した。わが国においては本法のキットがそれほど広く流通していないため, 多くの場合抗原としては赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)無菌培養株(HM-1:IMSS, HK-9など)を適当な方法で固定して調製しなければならないが, 筆者らのところで行っているシャウジン固定によると, ×64以上が陽性と判定される¹⁾。永倉ら²⁾が実施したフォルマリン固定による方法でも同様×64が陽性下限である。一

表2 間接蛍光抗体法による抗赤痢アメーバ抗体の基準値(陽性下限)

基準値	抗原調整法	実施または製造機関
×64*(陽性下限)	シャウジン液	慶應大医学部
×64(//)	3%PBS-フォルマリン	東海大医学部
×100(//)		Bio Mérieux

*血清の希釈倍数をもって抗体値としている。

方, わが国で現在唯一と思われる市販の間接蛍光抗体法キット(Bio Mérieux アメーバスポットIFセット, 輸入発売元株式会社シンテック)については筆者らは使用したことはない

が、 $\times 100$ 以上の場合陽性と判定される。

■ 測定上の注意

1. 患者の前処置

食事の影響は原則的に無視しうるので、採血は空腹時でなくてもよい。その他、特に前処置は必要としない。

2. 採血と検体保存上の注意

採血後、血清分離については特に注意すべき点はなく、通常分離操作でよい。溶血は判定に影響を与えることがあるので、可能な限り避けた方がよい。血清分離後は原則として -20°C 、あるいは -70°C (deep freezer) にて保存する。各検査機関に送付される場合は血清分離後そのまま直ちに送付するか、いったん冷凍したら、特に夏季には ice box を用いて送付する方がよい。要するに、何度も凍結・融解を繰り返した血清の場合には偽陽性または偽陰性反応がより出現しやすくなる。

■ 検査によって何がわかるか

厳密に言えば、この IFA を実施してわかることは血中に抗赤痢アメーバ抗体が存在するというのみであって、それが赤痢アメーバ症として治療の必要性に即時直結するわけではない。IFA が陽性下限以上の抗体価を示す場合にもさまざまな病態があることを理解すべきである。

まず、赤痢アメーバ感染において発症に至るためにはアメーバ栄養型の組織内侵入が必要となる。アメーバの組織内侵入がない場合は通常キャリア (asymptomatic cyst carrier) として存在するわけであるが、このキャリア (いわゆる一度も発症したことのない carrier、従来はこれを contact carrier といった) も非病原性 (nonpathogenic) の赤痢アメーバ (これを現在は *Entamoeba dispar* とし、病原性を有する赤痢アメーバすなわち *E. histolytica* と別種として扱う) 感染によるものと、*E. histolytica* に感染しているが、無症状のまま推移しており、何らかの理由で抗体産生に至っていないものがあることを理解する必要がある。頻度

からみれば前者の方が明らかに多い。後者は発症に至る可能性がある。また、最近では抗体価が陽性でも長期間無症状のまま一度も発症せず持続性感染として存在する場合もかなりあることがわかっている。このようなケースは感染株の病原性の判定では前述のように病原性である *E. histolytica* による感染とされるものであり、糞便抗原検査などで *E. histolytica* の感染が確認されたら、特に他の関連する事情のない限り抗アメーバ剤を通常投与している。一方、*E. dispar* 感染では発症しない。したがって治療の必要はない。

また、キャリアの一部には以前発症したことがあるが、次第に症状が消失して、キャリアとなった例 (convalescent carrier と呼ばれた) があるが、この場合も多く抗アメーバ抗体陽性となる。一般に IFA は赤痢アメーバ症の標準的な血清診断法として用いられているゲル内沈降反応 (gel diffusion precipitin test: GDP) より鋭敏で、上記の可能性は高い。このようないったん症状が消失したキャリアにおいて再度発症するかどうかについては IFA によっては明らかに予測することはできない。

IFA によって symptomatic なアメーバ症のケースを診断する場合、病型によって抗体価の分布域に差がみられることには注意すべきである。陽性率そのものも病型によってやや異なることが明らかとなっている (後述)。

■ どういうときに検査するか

本法は赤痢アメーバ症の確定診断の一助として用いるものであるから、どのような場合に赤痢アメーバ症を疑うか、およびそれを疑って診断を進めるとき、どのようなタイミングで IFA を実施するかという二つの問題が考えられる。

まず、最近のわが国における赤痢アメーバ症の疫学的状況をみると、感染を疑うための危険因子は概略以下のようにまとめることができる。

- (1) 開発途上国への旅行。
- (2) 男性同性愛歴。

(3) 施設内感染.

臨床的には腸アメーバ症として、腹痛、下痢などの初発症状をもって発症するわけであるが、注意する必要があるのは全身状態が腸アメーバ症の場合は比較的良好に保たれることで、発熱をみず、多核白血球の増加も観察されない。一方、赤痢アメーバの転移による肝膿瘍においては肝腫大などのほか、中等度発熱、末梢血中の多核白血球増加もみられる。また、腸アメーバ症による症状が全く欠如している肝膿瘍例もかなりの頻度でみられることにも留意すべきである。

IFAを実施する時期およびその意義は腸アメーバ症と肝膿瘍では少し異なっている。一般的には腸アメーバ症の場合は糞便検査(可能であれば抗原検査を含む)、内視鏡およびそれによる生検などを先行させるか、同時に行えばよい。異なった方法で血清抗体を検査できれば信頼度は上がる。また、腸アメーバ症診断におけるIFAの意義はどちらかといえば補助的なもので、IFAのデータのみで確定診断を下すことは慎重に行うべきである。糞便の形態的検査を繰り返してもアメーバが検出されない場合、上に述べたように筆者らはIFAだけではなく、何種類かの方法を併用するか、PCRと対比させるなどしてより確実を期している。

表1に示したように、腸アメーバ症においてはIFAによる抗体価は肝膿瘍におけるよりも低く、 $\times 256$ 前後に分布していることが多い。これは他の血清学的方法についても同様である。陽性率もだいたい85~90%程度で、肝膿瘍の場合より低く、特に以前実施されていたアセトン固定によるIFAでは40~50%程度の陽性率しか得られていなかった。

一方、転移性アメーバ症(アメーバ性肝膿瘍)の場合は臨床症状から現在では直ちにCT、エコーなどの画像診断が行われることが多いが、これらの検査によって肝膿瘍が鑑別診断の対象となったら、直ちにIFAを含む血清学的診断を実施すべきである。アメーバ性肝膿瘍の確定診断にも、またそれをrule outするにも有用である。上記のアセトン固定による方

法でもアメーバ性肝膿瘍診断には100%の陽性率が示されている。筆者らの方法¹⁾でもほぼ同様の結果が得られている。

肝膿瘍の場合、糞便検査によってもアメーバが検出できないこともあり、したがってアメーバ検出にいたずらに時間を費やさず、画像および血清診断を重視し、血清診断が例えばIFAでは表1に示したように $\times 4,096$ などと高い値を示し、肝膿瘍の定型的な画像診断上の特徴が見出されたら、時期を失せず積極的な治療に踏み切るべきである。換言すれば、IFAを含む現行のアメーバ症の血清学的診断法の多くはアメーバ性肝膿瘍に対しては確定診断法としての意義を有している。

以上を要するに、赤痢アメーバ症の場合は病型によってIFAを含む血清学的診断法の意義が異なり、実施する時期もそれぞれ限定される。

ここで関連検査項目を含め、選択の基準をまとめると以下のようなになる。

まず腸アメーバ症を疑った場合は糞便検査と内視鏡検査(生検を含む)が関連検査項目としてあげられる。この中でまず実施すべきは抗原定量を含む糞便検査である[抗原定量はわが国では一般化されておらず、キットも市販はされていないが、最後に述べるように入手可能である]。ついで血清反応、内視鏡検査、PCRなどが次に行う項目となる。この3種類の検査のうちどれを優先させるかはそのときの状況にもよるが、筆者らは血清反応と糞便内の抗原検査を優先させている。

アメーバ性肝膿瘍を疑った場合はまずCT、エコーなどで膿瘍の存在を確認し、直ちに血清反応を行う。抗原の定量を含む糞便検査、内視鏡検査、PCRは強いて実施しなくとも確定診断は可能であるが、補助的な意味合いを有する検査として実施する。

アメーバ性肝膿瘍に腸アメーバ症が合併したと思われるときは肝膿瘍に準じて検査項目の選択を行えばよい。

■ IFA が異常となる疾患

本法のような感染症に対する血清学的診断法は特異性が最も重要な利点の一つであって、他の一般的な病態を表すマーカーと異なり、アメーバ症のときにのみ陽性となることが期待される。したがって、IFA が異常値を示す場合（陽性化）は原則的に赤痢アメーバ症に限るが、前述のように病型に応じて異常値のレベルが異なること、あるいは持続性感染など、臨床的に無症状であっても異常値を呈する場合があることなどを念頭におく必要がある。

また、このような血清反応の場合常に考慮しなければならないのは特異性に関連した偽陽性（false positive）、偽陰性（false negative）の出現である。false positive が出現することは筆者らが実施してきた IFA の場合は比較的少なく、特定の因子が影響を及ぼすという傾向はみられなかったが、きわめて明確に false positive が観察された結節性動脈周囲炎（PN）の症例を経験したことがある。この後、PN のケースを少数ではあるが集め、同様の検査を試みたが、同じ結果は得られなかった。

false negative の出現について正確な原因はあまり知られていない。前述のように、腸アメーバ症においては血清診断の陽性率が一般に低く、したがって、確かに陰性例は散見されるが、筆者らの経験では現在実施されている方法自体の欠点というより、感染を受けた個体の側の免疫応答の強弱に依存しているとの印象を得ている。例えば、*E. histolytica* が内視鏡下生検によって大腸組織内に検出されているにもかかわらず、血清中の抗アメーバ抗体値は数ヵ月間のフォロー中、IFA、ゲル内沈降反応（GDP）を含むどの方法によっても陰性であったという症例を経験したことがあるが、主治医側の詳細な検討によれば、この症例は低 IgM 血症であって、加うるにその他の 1～2 の免疫応答性が低下していた。さらに、HIV と *E. histolytica* との合併例の調査では、高率に GDP などの false negative の例が見られた。詳細は明らかではないが宿主側の免疫不全がこのような反応に影響することはあり得ると思われる。

■ IFA が異常となる薬物

現在までのところ、IFA の異常を起こす具体的な薬物は知られていない。

■ 検査の総合評価

1. 腸アメーバ症

腸アメーバ症に対して検査データの評価をする際はおのおの方法の特質をよく認識したうえで行う必要がある。まず糞便検査の場合、特異性は高いが、感度は低い。嚢子が糞便中に検出されれば、感染を確定しうるが、*E. histolytica* か *E. dispar* かの鑑別が必要になる。このことは糞便を材料とした特異的抗原定量法を実施すればクリアできる。一方、下痢便中に栄養型を検出すればほぼ *E. histolytica* の感染として確定診断につながる。上述のように嚢子が有形便に検出され、かつ認めうるべき症状のないときは特異抗原検出（後述）を含む免疫学的方法や内視鏡検査（生検を含む）、または PCR を行って評価せざるを得ない。また糞便検査の感度の悪さ（約 1/2 は見逃される）を考えると、嚢子が検出されずとも何らかの疑わしい症状があった場合は血清診断や内視鏡検査を実施する方がよい。血清反応と内視鏡下生検の意義はアメーバの組織内侵入に伴うもの、すなわち病原性である *E. histolytica* による invasive amebiasis の診断にあり、一方、形態的な糞便検査は多くの場合単に感染が起こっていることを意味しているにすぎない。すなわち感染株の病原性に関連した *E. histolytica*/*E. dispar* の確定ができない。このような差異をよく考慮に入れて総合的評価を行うべきである。

2. 腸管外アメーバ症

腸アメーバ症の合併の有無にかかわらず、画像診断にて腸管外アメーバ症（アメーバ性肝膿瘍）が疑われたら、血清反応の結果を重視して評価を行えばよい。他の臓器に転移性病巣が形成された場合もアメーバによると疑ったときは血清反応の結果を重視して考える。

■ 予想外の値が得られた場合にはどうするか
前述のように腸アメーバ症の場合は 10% 前後

のIFAの陰性例が存在する。このような場合は2～3週間の間をおいてペア血清として再検査するか、他のGDPなどの方法をも考慮して見る必要がある。それと同時に大切なことは糞便検査、内視鏡下生検など、他の方法を併用して診断を早期に確定するよう試みることである。特に最近特異抗原検出、PCRの信頼性が高いことがわかってきているので、実施できる機関へ依頼を出しても良い。

一方、肝膿瘍の場合は前述のようにfalse negativeが出現することはほとんどなく、症状が疑わしくともIFAが陰性であれば、まず他の疾患を考える方がよい。同時に1～2の異なる方法、特にGDPを併用し、同様に陰性となれば結論はより確実となる。

以上のほか、検体の保存状況、運搬方法、その他について基本的なチェックは怠るべきではない。

赤痢アメーバ症を疑って、PCRまで行っても診断がつかないという事態はまずないが、そのようなときは現時点での第一選択薬剤であるメトロニダゾールを試験的に投与してみるのも一つの方法ではある。肝膿瘍の場合でなかなか確定診断できない場合には薬剤投与のほか、外科的にドレナージを施行してもよいが、いずれにしる現時点では確定診断に困るという症例は少ない。

■ 異常値がみられた場合の検査の進め方と治療的対応

病型にかかわらず、IFAを含む血清反応はある程度臨床症状などによって診断が絞り込まれた段階で実施されることが多く、特に肝膿瘍では確定診断法としても用いられるので、現実にはそれ以上の検査を必要とすることは少ない。

ただ、臨床的には合致しているのにIFAが陰性と出た場合の対応に注意する必要がある(前述)。

赤痢アメーバ症は原則的には全病型とも化学

療法によって治療を行う。巨大な肝膿瘍では種々の圧迫症状などがあった場合、外科的にaspirationを試み、減圧を図ることがあるが、ドレインに感染が起こったこともあり、このような危険性を勘案したうえで判断する。

第一選択の薬剤は5-ニトロイミダゾール製剤であるメトロニダゾール(商品名フラジールほか)である。同系統のチニダゾールも同じように使用できる。これらの薬剤は強い殺アメーバ作用を有するが、実験的に発癌性や変異原性があることも確認されており、投与対象に注意をはらうとともに、今後標準的な投与量も改変される可能性があることにも留意する必要がある。

■ 新しい抗原検査キットの動向

前述のように抗原をdetectして診断する方法もキットとして確立された。筆者らは現在、*E. histolytica* IIキット(TechLab)を主に使用している。この方法はアメーバが大腸粘膜上皮細胞を認識するのに必要なadhesinをモノクローナル抗体を用いてサンドイッチELISAで定量するもので、輸入可能である。因みに筆者らは関東化学を通して輸入している。

文 献

- 1) 竹内 勤, 小林正規, 三浦左千夫ほか: 赤痢アメーバ症血清診断法の検討—138例を対象として。感染症学雑誌 59(臨時増刊): 167-168, 1985
- 2) Nagakura, K., Tachibana, H., Tanaka, T. et al.: An outbreak of amebiasis in an institution for the mentally retarded in Japan. Jpn J Med Sci Biol 42: 63-76, 1989
- 3) Sargeant, P. G.: The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. Parasitol Today 3: 40-43, 1987
- 4) 奥沢英一, 小林正規, 竹内 勤: 抗赤痢アメーバ抗体測定用間接赤血球凝集反応キット(赤痢アメーバHA®)の評価。寄生虫学雑誌 42: 227-233, 1993

LAB DATA
TEST SELECTION AND INTERPRETATION

臨床検査 データブック

2005—2006

監修

高久史麿

自治医科大学学長

編集

黒川 清

日本学術会議会長

春日雅人

神戸大学大学院教授

北村 聖

東京大学大学院教授

医学書院

Decision Level

●陽性

【高頻度】*Entamoeba histolytica* の組織内侵入による invasive amebiasis, すなわちアメーバ赤痢, アメーバ性大腸炎, アメーバ性肝膿瘍で陽性となる。無症状であってもアメーバが組織内に侵入していれば陽性となることがある。【対策】アメーバ性肝膿瘍の場合は強陽性にでることが多く, その場合は画像診断のデータと併せて確定診断としての意義を有するので治療に踏み切る。腸アメーバ症でも 80~90% 前後は陽性となるが, しばしば抗体価が陽性下限に近いことがある。その場合はペア血清を使用して再検査するか, 他の血清反応や糞便検査, 内視鏡所見を併せて判断する

異常値のメカニズムと臨床的意義

アメーバ症として発症するには *E. histolytica* の組織内侵入が必要条件となり, その結果抗体産生が起こる。しかし発症直後は抗体産生が十分に起こらず, 検査しても陰性と判定されることもあるので注意を要する必要がある。慢性感染, 再発例では抗体が確実に検出できる。診断上の意義は高いが, アメーバ性肝膿瘍診断において特に高い。

判読 凍結と融解を繰り返した血清, あるいは溶血を起こした血液からの血清では, 時に偽陰性, 偽陽性がでることがある。また自己抗体陽性時には, 時に偽陽性が現れる。

採取保存 血清分離後直ちに検査するか, -20°C 以下で凍結保存。

測定前後の患者指導 採用する方法, 測定する抗体と病態との関係を患者に理解させる必要がある。

(竹内 勤)

蛍光抗体法 (IFA)

検体量

- PHA: 血清 0.3 ml, 髄液 2 ml
- ELISA: 血清 0.3 ml
- IFA: 血清 0.3 ml

検査日数 2~5 日

Decision Level

●陽性

【高頻度】トキソプラズマ感染時に陽性となる。IgM が陽性の場合には急性感染を意味しており, 診断上の意義は高い。また本疾患の諸病型のうち亜急性感染であるリンパ節炎の場合は抗体価が高く現れ, 診断に有用となる。慢性感染である網脈絡膜炎や AIDS に伴う脳炎では現行の血清反応の陽性率は一般に下がる。疑わしいときにはペア血清を使用して検査するか, 複数の方法を実施し, 比較検討する。普通抗体価は赤血球凝集反応で感染後 2~4 カ月後から上昇するといわれている。【対策】「異常値のメカニズムと臨床的意義」を参照

異常値のメカニズムと臨床的意義

トキソプラズマは細胞内寄生原虫であるので通常抗体産生は確実に起こる。しかし, この原虫感染は基本的に日和見感染症としてよいもので, 多くの場合, 慢性感染で無症状で推移し, わが国でも抗体陽性率は健康な成人でも 10~20% 程度に達している。したがって抗体陽性がトキソプラズマ感染による発症を必ずしも意味していない。しかし, 亜急性感染であるトキソプラズマ性リンパ節炎の場合は血清反応の信頼度は高く, 診断基準も作成されている。しかし慢性感染である網脈絡膜炎や AIDS に伴う脳炎では, 血清抗体の陽性率は必ずしも高くなく, 臨床症状や他の検査所見を総合して診断する。判読 自己抗体が存在するときには, 時に偽陽性を生じやすい。凍結, 融解を繰り返した血清, 溶血した試料より分離した血清も偽陽性, 偽陰性を生じることがある。

採取保存 血清分離後直ちに検査するのが通常であるが, できない場合は -20°C で保存する。

測定前後の患者指導 測定する抗体と病態との関係を患者に理解させる。

(竹内 勤)

トキソプラズマ抗体

Toxoplasma antibody

保

基準値

●トキソプラズマ抗体 (PHA)

- 血清: 陰性 (160 倍未満)
- 髄液: 陰性 (4 倍未満)

●IgG 抗体

- ELISA: 陰性 (5 IU/ml 以下)
- IFA: 陰性 (20 倍未満)

●IgM 抗体

- ELISA: 陰性 (0.7 以下)
- IFA: 陰性 (10 倍未満)

測定法 受身赤血球凝集反応 (PHA), ELISA, 間接

感染症検査

感染症予防必携

編 集

道榮宏彦 齊毅勤三子 澄雄弘雄

修 光信 峻和眞國 泰治

崎上尾部 谷田内葉村 輪下川邊

山井牛岡 神倉竹千西 簀雪吉渡

財団法人 日本公衆衛生協会

整備)と個人衛生の向上(特に手洗い)は、糞口感染症コントロールの要点である。

1. 人糞の衛生的処理。
2. すべての食品の加工、調理および配膳の衛生監視。手洗施設の整備と使用に対する特別な配慮。また、ハエによる汚染を防ぐ。
3. 牛乳および乳製品の殺菌。
4. 下痢または腹部症状を訴えるものは、公衆の消費する食品の取り扱いを制限する。また、できるなら家庭での食品取り扱いも控えさせる。
5. 防ハエ対策とハエの発生防止。
6. 給水施設の保護および浄化。関係職員への指導教育の徹底。なお、給水管の敷設に当たって下水管との交差接続に留意。

学校や大きな建物において水道水をいったん貯水し、それをポンプアップして配水している場合、貯水槽、配水槽の清掃がおろそかにされやすい。定期的に浄化する必要がある。

7. 小児用食品の調理、取り扱いおよび貯蔵は、清潔について念入りに注意する。このことは、特に保育所、幼稚園などの幼児施設で重点的に指導する必要がある。

8. 関係者への衛生教育は、特に環境衛生施設や給食施設に働く職員を初め、食品取扱業者、学校職員、保母などに重点をおくこと。

B アメーバ赤痢 (赤痢アメーバ症) Amebiasis (5類-全数)

ICD-10 A06

I 臨床的特徴

1. 症状 赤痢アメーバ症は人体寄生性原虫である赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 (Emended Walker 1911) による消化器症状を主徴とする感染症である。ほとんど無症状で推移する持続性感染が多いが、発症した場合、病型は腸アメーバ症 intestinal amebiasis と腸外アメーバ症 extraintestinal amebiasis とに大別できる。前者は具体的にはアメーバ赤痢 amebic dysentery とアメーバ性大腸炎 amebic colitis が主体。アメーバ赤痢は比較的緩徐に発症するが粘血性下痢、腹痛(回盲部のことが多い)、同部の圧痛などを呈する。下痢は1日十数回程度まで、テネスマス(しぼり)は軽い。回盲部が索状に触知されることもある。全身状態は良好に保たれ、発熱も欠くか、あっても軽度。放置すれば自然に症状の消退を見るが、ある期間において上記の症状が再発する。この間はむしろ便秘傾向を示す。この経過を繰り返し慢性化し、いわゆる潰瘍後大腸炎となる。アメーバ性大腸炎の場合は種々の性状の下痢および腹痛が主な症状。腸アメーバ症の経過中にしばしばアメーバの血行性転移を起こし肝膿瘍 amebic liver abscess を形成することがある。肝膿瘍は右季肋部痛、同部圧痛、肝腫大などを症状とする。右

季肋部痛は右側に放散し、呼吸時に増強する。そのほかに食欲不振など。全身状態も悪化し、中等度の発熱、白血球増多なども見る。肝機能は正常範囲内のことが多いが、膿瘍が胆管を圧迫すれば黄疸、その他の肝機能障害を見る。放置すれば膿瘍の破裂による腹膜炎、直接進展による横隔膜下膿瘍、肺膿瘍、二次的血行転移による脳、肺など各臓器の膿瘍形成を見る。

鑑別診断は腸アメーバ症の場合は細菌性赤痢、潰瘍性大腸炎、大腸がんなど。肝膿瘍の場合は肝腫瘍、細菌性肝膿瘍などが鑑別の対照となる。

2. 病原体 赤痢アメーバの生活環は嚢子cystと栄養型trophozoiteから構成される。嚢子は物理的環境に抵抗力が強く、成熟嚢子が感染能力を有する。栄養型は活発にアメーバ運動をし、組織に侵入し、病原として作用する。従来非病原性の赤痢アメーバとされたアメーバは現在*Entamoeba dispar* Brumpt, 1925として別種であることが確定している。この*E. dispar*感染は発症することなく、したがって治療を必要としない。しかし、光顕的に*E. histolytica*との鑑別は困難で、診断に際して問題となる。

3. 検査 腸アメーバ症の場合は糞便検査、内視鏡（生検）、血清学的診断法を併用するが、*E. dispar*との鑑別が重要。糞便検査では下痢便には栄養型、有形便では嚢子を検出する。栄養型は粘液の部分を検査すれば検出しやすい。温度を保つことも必要。下痢便中に赤血球を捕食している栄養型虫体、あるいは生検組織内に栄養型を見いだしたら*E. histolytica*としてよい。血清学的診断法としてはゲル内沈降反応、間接蛍光抗体法、ELISAなど。肝膿瘍の場合、糞便検査のみでは診断は困難で、適当な画像診断と血清学的診断法を併用する。肝膿瘍の場合血清学的方法は極めて信頼度が高い。最近サンドイッチELISAによる特異抗原検出（*E. histolytica* IIキットなど）、遺伝子増幅（PCR）による診断も実用化されている。

II 疫学的特徴

1. 発生状況 現在熱帯地方の発展途上国を中心に約5億人の感染者が存在する。しかし、この大多数は*E. dispar*感染による無症状の嚢子保有者asymptomatic cyst carrierであり、*E. histolytica*感染による発症者は一部に過ぎないと考えられる。わが国ではアメーバ赤痢が法定伝染病であるために届出が必要であったが、新しい感染症予防法では第4類、次いで2003年の改訂で第5類に分類された。わが国での発生状況調査によると1980年（昭55）初頭より増加傾向にあり、特に感染症法施行後、届出基準が変更されたこともあり、年間500例前後の症例が見いだされている。1980～90年代は多くは国内感染例であり、男性が多く、特に東京、大阪などの大都市に集中して見られたが、次第に女性の感染者を見ることも増えてきた。男性同性愛者間での性感染症（STD）としての発生例が最も多いと考えられるが、各種施設での集団発生（施設内感染）も報告されており、また輸入感染症としても増加傾向にある。

2. 感染源 感染能力を有するのは感染者の糞便中にある嚢子（多くは外界で成熟し、感染力を得る）のみであり、下痢便中の栄養型、未成熟嚢子は感染能力を有しない。

赤痢アメーバはヒトのみならずサル、ブタなどに感染が広がっている（人獣共通感染症）ので、動物からの感染も起こりうる。

3. 伝播様式 最も主要な感染様式は糞便中の嚢子によって食物、飲料水が汚染された結果起こる経口感染である。おそらく発展途上国においてはこれが大多数の場合の伝播様式と思われる。欧米諸国あるいはわが国においてはこのような定型的な経口感染も確かに起こっているが、男性同性愛者間で性行為によって伝播していることが注目される。しかし、この場合も伝播はoral-anal contactによるので、嚢子の経口摂取が原因となっていることは間違いない。施設などでは汚染された手指などから経口感染が起こることもあると考えられる。

4. 潜伏期 不定であるが、7～20日くらいの場合が比較的多い。

5. 感染期間 嚢子排出期間中は当然ながら伝播を起こしうるが、期間は一定していない。持続性感染の場合、数年以上嚢子排出を続けることがある。

6. ヒトの感受性 発症には宿主側の栄養状態などの要因が関与するが、感受性に関する人種的差異、あるいは遺伝的な要因の解明はようやく行われ始めた。肝膿瘍の併発については地域によって頻度に差異がある。

III 予防・発生時対策

A. 方針

まず嚢子による環境汚染、食物などの汚染を防ぐことが肝要である。このためには糞便の衛生的処理、飲料水系の整備、ハエなど嚢子伝播に関与する可能性のある昆虫の駆除を行う。要するに他の細菌性経口感染症の場合とほぼ同様である。男性同性愛者に関しては不潔な性行為を避けることが重要である。

B. 防疫

1. 糞便の処理を確実にを行う。
2. 感染症となりうる嚢子排出者を確実に見だし、伝播を防ぐよう環境に配慮する。

C. 流行時対策

本症は地方流行的なものであり、特に流行時の対策はない。しかし、各種施設での集団感染には環境衛生対策、集団治療などが必要となることがある。

D. 治療方針

ニトロイミダゾール製剤であるメトロニダゾールを第一選択薬剤として用いる。チニダゾールもこれに準ずる。腸アメーバ症の時はこれに適当な抗菌薬を併用、肝膿瘍の時はメトロニダゾール投与に肝ドレナージを併用することもある。メトロニダゾールは神経系あるいは血液疾患がある時および妊婦には投与しない（実験的に発がん性、変異原性が認められている）。

AXENIC CULTIVATION OF *ENTAMOEBA DISPAR* IN NEWLY DESIGNED YEAST EXTRACT–IRON–GLUCONIC ACID–DIHYDROXYACETONE–SERUM MEDIUM

Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Ali Haghghi*, Shaden A. Khalifa, Hiroshi Tachibana†, and Tsutomu Takeuchi

Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.
e-mail: skobaya@sc.itc.keio.ac.jp

ABSTRACT: Yeast extract–iron–gluconic acid–dihydroxyacetone–serum medium that allows axenic cultivation of *Entamoeba dispar* was designed based on casein-free yeast extract–iron–serum (YI-S) medium, and the usefulness of the medium was assessed. The main differences from YI-S medium are replacement of glucose by gluconic acid, addition of dihydroxyacetone and D-galacturonic acid monohydrate, and sterilization by filtration. This medium promoted the axenic growth of 5 strains of *E. dispar* (2 strains of nonhuman primate isolates and 3 strains of human isolates). In addition, to clarify the biological basis for the growth of *E. dispar* in this medium, analyses of relevant enzymes on the glycolytic pathway of the amoebae as well as of the protozoans that are the best culture supplement for amoebae are being performed.

After axenic cultivation of *Entamoeba dispar* (strain: SAW760RRcloneAR) was reported (Clark, 1995) in casein-free yeast extract–iron–serum (YI-S) medium (Diamond et al., 1995) supplemented with gastric mucin, the efficacy of this axenic culture system was assessed for other *E. dispar* strains. However, despite its utility, the only *E. dispar* strain established as an axenic amoeba in YI-S medium thus far is SAW760RR clone A.

On the other hand, when a monoxenic culture system for *E. dispar* in biosaic–cysteine–starch–iron–serum (BCSI-S) medium with *Pseudomonas aeruginosa* was developed (Kobayashi et al., 1998), a significant growth-promoting effect of dihydroxyacetone (DHA) was observed. DHA is a ketotriose and as a sugar source for *E. dispar* is thought to be directly metabolized to DHA phosphate (DHAP), which is an intermediary metabolite in the Embden–Meyerhof–Parnas glycolytic pathway.

Another significant result was that during characterization of the glycolytic pathway of *Crithidia fasciculata*, an effective culture associate of *E. dispar* in BI-S-33 medium (Diamond et al., 1978), approximately 35 times as much glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity as that of *Trypanosoma cruzi* (Tulahuén strain) was detected. *Trypanosoma cruzi* can be used as a growth-promoting supplement for monoxenic culture of *E. histolytica*. However, it does not promote the growth of *E. dispar*, whereas *C. fasciculata* does (S. Kobayashi, unpubl.). G6PDH activity has not been detected in axenically grown *E. histolytica* (Reeves, 1972) or *E. dispar* (S. Kobayashi, unpubl.). G6PDH is an essential enzyme not only in the pentose-phosphate pathway but also in the Entner–Doudoroff pathway, which starts with G6P. G6PDH catalyzes the transformation of G6P to 6-phosphogluconate (6PG) via 6-phosphogluconolactone, and we focused attention on the glycolytic pathway after 6PG in *E. dispar* and examined the reactions after 6PG. Both the pentose-phosphate and Entner–Doudoroff glycolytic pathways can branch from 6PG. The activity of 6PG dehydratase (EC 4.2.1.12.) (Gottschalk and Bender, 1982; Nguyen and Schiller, 1989), which is one of the enzymes in the Entner–

Doudoroff pathway, was detected in the lysates of both *E. histolytica* (HM-1:IMSS clone 6) and *E. dispar* (CYNO 16:TPC), and its activity in *E. dispar* was 2.87 times greater than in *E. histolytica*. By contrast, no 6PG dehydrogenase activity in the pentose-phosphate pathway was detected in either lysate (S. Kobayashi, unpubl.). On the other hand, DHA, which has a growth-promoting effect, is thought to be metabolized to G3P through DHAP, which is converted to G3P by triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1.). Thus, if viable *C. fasciculata* actually supplies a growth-promoting substance like DHA, DHA may be preferable to viable *C. fasciculata* as a culture ingredient. On the basis of this information, we hypothesized the existence of some failure in the upstream portion of the glycolytic pathway in *E. dispar*, before DHAP or G3P production from glucose in YI-S medium. We, therefore, attempted to design an axenic culture medium for *E. dispar* by modifying the ingredients of YI-S medium, and we tested its usefulness.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

All chemicals used in this study were of the highest quality commercially available unless otherwise stated.

Entamoeba dispar Isolates

Five strains of *E. dispar* were subjected to a trial of axenic cultivation in this study. Two strains (CYNO 09:TPC and CYNO 16:TPC) from nonhuman primates were isolated in Japan (Kobayashi et al., 1998) in Robinson's medium (Robinson, 1968), and 2 strains (AS 2 IR and AS 16 IR) were isolated from humans in Iran. An *E. dispar* strain, SAW 1734R clone AR (SAW1734RclAR), was used as the reference strain. The axenic *E. dispar* strains were transferred to monoxenic culture medium with viable *C. fasciculata* and antibiotics (as in the classic approach Diamond used for *E. histolytica*, Diamond, 1983) in BI-S-33 medium. The *C. fasciculata* was then replaced with antibiotic-sensitive *P. aeruginosa* in BCSI-S medium because *P. aeruginosa* is removed easily by antibiotics and antibiotic-resistant *C. fasciculata* usually survive in test medium for axenic culture even after 2–3 subcultures, and it promotes the growth of *E. dispar*.

Yeast–iron–gluconic acid–dihydroxyacetone–serum medium

Yeast–iron–gluconic acid–dihydroxyacetone (YIGADHA) broth was prepared by first dissolving the following ingredients in 880 ml of water distilled and purified with a Milli-Q column (Millipore Co., Billerica, Massachusetts): K_2HPO_4 , 1 g; KH_2PO_4 , 0.6 g; NaCl, 2.0 g; yeast extract (BBL, Becton Dickinson Co., Cockeysville, Maryland), 30 g; gluconic acid, 5.0 g; DHA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), 1.0 g; D-galacturonic acid monohydrate, 0.2 g; L-cysteine hydrochloride, 1.0 g; ascorbic acid, 0.2 g; and ferric ammonium citrate (brown), 22.8 mg. The pH was adjusted to 6.5 with 1 N NaOH, and the solution was

Received 20 January 2004; revised 4 May 2004; accepted 4 May 2004.

* Present address: Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Teheran 19395, Iran.

† Present address: Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan.

I checked this proof for marked all changes and returned it to the author.

Please G3P.

D: Please note that the abbreviation YIGADHA-S in the title has been expanded. Please check the author. This article has been lightly edited for grammar, style, and usage. Please compare it with our original document and make changes in these pages. Please limit our corrections to substantive changes that affect meaning. If no change is required in response to a question, please write "OK as set" in the margin. Copy editor

sterilized by filtration (Sartorius membrane filter; 0.2- μ m pore size). An 88 ml volume of YIGADHA broth was aseptically dispensed into a 100-ml, screw-capped glass bottle and stored at -30°C .

To complete the YIGADHA-serum (YIGADHA-S) medium, 2 ml of vitamin mixture #18 prepared according to the instructions for PDM-805 medium (Diamond and Cunnick, 1991), and 16 ml of heat-inactivated bovine serum was aseptically added to 88 ml of the YIGADHA broth. A 5-ml volume of the complete medium was then dispensed into 13- \times 100-mm, screw-capped borosilicate glass culture tubes (Asahi Techno Glass Co., Chuo-ku, Tokyo, Japan).

Establishment of the culture of *Entamoeba dispar* with sterilized *Crithidia fasciculata*

After removing *P. aeruginosa* by washing and addition of antibiotics (polymyxin B, 130 units/ml), trophozoites of the 5 strains of *E. dispar* were transferred to YIGADHA-S medium with sterilized *C. fasciculata* (2–3 million/ml, ReF-1:PRR, ATCC no. 50083) by fixation with 10% (v/v) formalin as described in the literature (Clark, 1995). All 5 strains of *E. dispar* adapted to the culture at 35.5°C in the YIGADHA-S medium with the associate within 2 wk after 3–4 whole-medium changes by centrifugation (275 g, 4 min) and eventually started to grow continuously. When the same growth-promoting effect was later found with autoclaved *C. fasciculata* in Hanks' solution as with the formalin-fixed *C. fasciculata*, we switched the method of sterilizing *C. fasciculata* to autoclaving (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) because of its simplicity.

When the amoebae were subcultured, 0.6–0.8 ml of the amoeba suspension (2.5×10^4 to 5×10^4 /ml) was usually transferred to the fresh medium, after the cultures were chilled for 5 min in an ice-water bath. They were then inverted several times to disperse the amoebae. Subcultures were successfully prepared at intervals of 3 and 4 days.

Growth kinetics of the amoebae

At 24-hr intervals for 96 hr, the number of amoebae in 5 μ l of the homogeneous amoeba suspension diluted with known volume of YIGADHA-S medium were counted under a microscope after chilling the culture tubes for 5 min in an ice-water bath. The data were then converted to number per milliliter.

Zymodeme analysis and polymerase chain reaction

Zymodeme analysis (Sargeant, 1988) and polymerase chain reaction (PCR) analysis (Tachibana et al., 1991; Cheng et al., 1993) of the amoeba isolates were performed to characterize the amoebae grown in the axenic culture.

RESULTS

YIGADHA-S medium was designed, and the culture associates tested could be removed with no loss of *E. dispar* viability as a result of searching for the improved basic medium and condition for axenic cultivation of *E. dispar*, based on the casein-free YI-S medium.

YI-S medium was therefore modified as follows. Glucose was replaced by GA, DHA and D-galacturonic acid monohydrate were added because of the significant growth-promoting effects under the axenic culture conditions, and the medium was sterilized by filtration and adjusted to pH 6.5 with NaOH.

As a result of these modifications, trophozoites of *E. dispar* started to grow continuously in the absence of viable *C. fasciculata* or *P. aeruginosa* for the first time, although supplementation with the formalin-fixed organisms was still necessary for growth.

The growth-promoting ability of *C. fasciculata* was also maintained in this YIGADHA-S culture system even after it was autoclaved (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) in Hanks' solution. There was no difference between the growth-promoting effect of autoclaved *C. fasciculata* and of formalin-fixed organisms. Because the procedure was easier, the amoebae were maintained in the

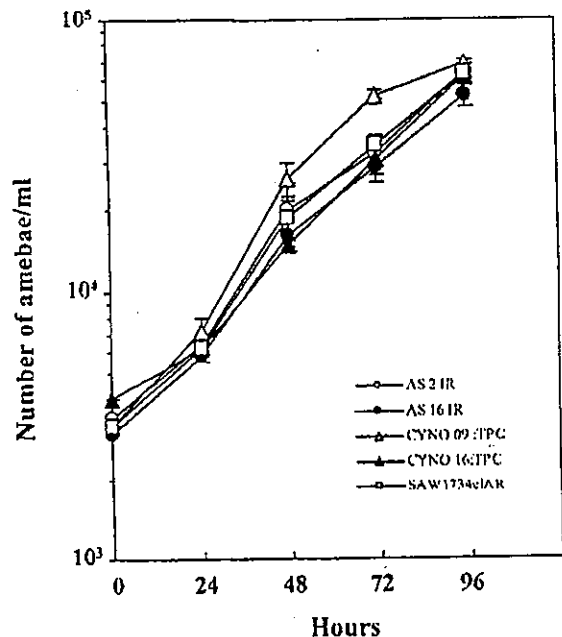


FIGURE 1. Growth kinetics of 5 strains of *Entamoeba dispar* in the 4-yr passaged cultures in YIGADHA-S medium supplemented with autoclaved *Crithidia fasciculata*. Mean numbers of amoebae in duplicate cultures are plotted.

medium with autoclaved *C. fasciculata*. The growth kinetics of the 5 strains of *E. dispar* in this culture system are shown in Figure 1.

After 3 mo of maintenance in this culture system, 1 strain of *E. dispar* (CYNO 16:TPC) started to grow without any supplement, e.g., without autoclaved *C. fasciculata*. However, addition of 6PG (Sigma P-7877, 67 $\mu\text{g}/\text{ml}$), an intermediary metabolite in the Entner–Doudoroff pathway (Fig. 3), was necessary to maintain this strain without the autoclaved organisms.

After culturing with autoclaved *C. fasciculata* for 1 yr and 4 yr, respectively, other *E. dispar* strains started to grow axenically in the YIGADHA-S medium without the addition of any culture associates. The growth kinetics of 5 strains of axenically grown *E. dispar* are shown in Figure 2. The clear differences in growth kinetics between monoxenic culture (Fig. 1) and axenic culture (Fig. 2), except for the CYNO 09:TPC strain, suggest the existence of some other growth-promoting factor in autoclaved *C. fasciculata*.

The CYNO 16:TPC and CYNO 09:TPC strains were usually subcultured by transferring 1 ml of amoeba suspension to fresh YIGADHA-S medium, and the AS 16 IR, AS 2 IR, and SAW1734cIAR strains were subcultured by transferring 1 ml of amoeba suspension concentrated to an adequate density for subculture (3×10^4 to 6×10^4 amoebae/ml) by centrifugation (275 g, for 4 min).

The zymodemes of the 5 strains grown in both the monoxenic and axenic YIGADHA-S media were all judged to be type I. All 10 DNA samples of the 5 strains used in the PCR analyses described above were amplified with *E. dispar*-specific primers

THE JOURNAL OF PARASITOLOGY, VOL. 90, NO. 7, MONTH 2004

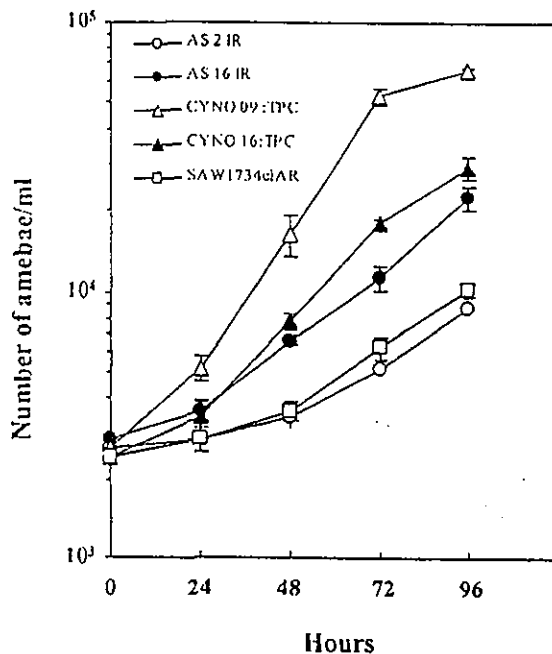


FIGURE 2. Growth kinetics of 5 strains of axenically grown *Entamoeba dispar* in 2-yr (CYNO 09: TPC), 3-yr (CYNO 16:TPC), and 2-mo (AS 2 IR, AS 16 IR, and SAW 1734clAR) passaged cultures in YIGADHA-S axenic medium. Mean numbers of amoebae in duplicate cultures are plotted.

alone; the *E. histolytica*-specific primers did not elicit any DNA amplification. These findings are summarized in Table I.

DISCUSSION

We have previously reported a monoxenic culture system for *E. dispar* in BCSI-S medium in which glucose was replaced with starch and to which sterilized *C. fasciculata* were added after heat treatment at 56 C for 30 min followed by incubation in 1% hydrogen peroxide at 4 C for 24 hr (Kobayashi et al., 1998). The sterilized parasite appeared to be metabolically inactive as judged by the nuclear magnetic resonance spectra. Although the growth-promoting effect of *C. fasciculata* was

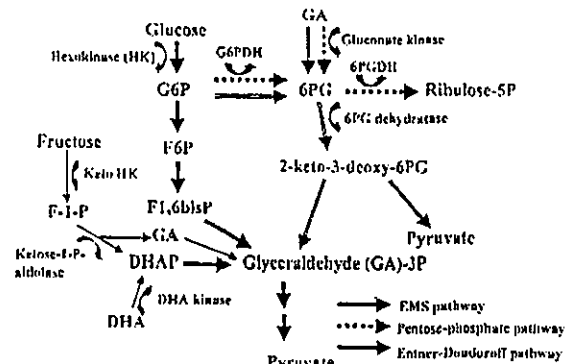


FIGURE 3. Metabolic map of 3 glycolytic pathways.

partially lost as a result of this sterilization step, the minimum essential effect persisted, which made it possible to establish a long-term monoxenic culture of *E. dispar* with metabolically inactive *C. fasciculata*. In this study, we succeeded in producing an axenic culture system of *E. dispar* by using YIGADHA-medium designed on the basis of YI-S medium from the monoxenic culture of the amoeba with sterilized *C. fasciculata*.

During attempts to improve the culture system, it was found that by replacing some kinds of sugar from starch, the growth of *E. dispar* was promoted significantly in the BCSI-S monoxenic culture system. First, a marginal growth-promoting effect of fructose was found, although its effect was insufficient for axenic cultivation of *E. dispar*, and a more useful compound, DHA, was used. The concentration (0.1%) of DHA required for the growth of *E. dispar* in YIGADHA-S medium was very critical; DHA concentrations below 0.05% and greater than 0.15% failed to effectively promote the growth of *E. dispar*. However, despite the clear effect of DHA and fructose on the growth of *E. dispar*, the results of our biochemical assays for phosphorylation of DHA by DHA kinase, ketohexokinase, and ketose-1-phosphate aldolase, the enzymes involved in the conversion of fructose or DHA to DHAP (Fig. 3), showed no significant activity of these enzymes in the crude lysates of axenic *E. dispar* (CYNO 16:TPC) or *E. histolytica* (HM-1:IMSS clone 6) (data not shown). The mechanism of growth-promoting effect of DHA and fructose is not yet understood.

Pimenta et al. (2002) demonstrated an interesting morpho-

TABLE I. Zymodeme and PCR analyses of 5 strains of *Entamoeba dispar*.

Strain	Xenic (date)	Zymodeme*		PCR†	
		Monoxenic (date)	Axenic (date)	Monoxenic	Axenic
SAW 1734clAR	Z-III‡ (March 1985)	Z-1 (January 2000)	Z-1 (February 2003)	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
AS 2 IR	Z-1 (June 1998)	Z-1 (January 2000)	Z-1 (February 2003)	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
AS 16 IR	Z-1 (June 1998)	Z-1 (January 2000)	Z-1 (February 2003)	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
CYNO 09:TPC	Z-1 (April 1992)	Z-1 (January 2000)	Z-1 (February 2003)	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
CYNO 16:TPC	Z-III (April 1992)	Z-1 (January 2000)	Z-1 (February 2003)	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>

* Zymodemes type I and III are classified as *E. dispar*.

† PCR analysis using 2 sets of oligonucleotide primers each (p11 plus p12 and p13 plus p14, respectively) for amplification of the DNAs of *E. histolytica* and *E. dispar*. The zymodeme and PCR analyses were performed around the same time.

‡ Data cited from Mirelman et al. (1986).

logical characteristic of *E. dispar* by electron microscopy: some concomitant bacteria cells were free and viable in the cytoplasm of *E. dispar*, without being surrounded by a distinct phagosome membrane. This suggests that some bacterial species can survive in the cytoplasm and exist in a symbiotic relationship with *E. dispar*. If the Entner-Doudoroff pathway does indeed function in glycolysis in *E. dispar*, as reported in *E. histolytica* under axenic conditions (Hilker and White, 1959), the reactions upstream in the EMS pathway (Fig. 3) including a reaction regulating the transformation of fructose-6-phosphate to fructose-1,6-bisphosphate or vice versa, usually catalyzed by 6-phosphofructokinase (6-PFK) and fructose-bis-phosphatase (EC 3.1.3.11.) and affecting the both the glycolysis and glycogenesis pathways, may not function well in *E. dispar*. The regulatory reactions in *E. histolytica* are well known to be regulated by a single unique enzyme (ppi-dependent 6-PFK; EC 2.7.1.90.), and the reaction is reversible and has no apparent regulatory function (Reeves et al., 1974, 1976).

The clear growth-promoting effect of autoclaved *C. fasciculata* (or *P. aeruginosa*) indicated that they contain as yet unidentified heat-stable growth-promoting substances for *E. dispar*. If the substances can be identified, YIGADHA-S medium will be improved. Further analyses of the axenically grown *E. dispar* will enable us to further elucidate the biological properties of *E. dispar* that differ from those of pathogenic *E. histolytica*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Louis S. Diamond, NIH, for supplying the reference strain of *E. dispar* (SAW1734RCIAR) and *C. fasciculata* (ReF-1; PRR). This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (10670237) from the Ministry of Education of Japan, and also by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

LITERATURE CITED

- CHENG, X.-J., H. TACHIBANA, S. KOBAYASHI, Y. KANEDA, AND M.-Y. HUANG. 1993. Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* isolates from Shanghai, China. *Parasitology Research* 79: 608–610.
- CLARK, C. G. 1995. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 590–593.
- DIAMOND, L. S. 1983. Lumen-dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads and *Giardia*. In *In vitro cultivation of protozoan parasites*, J. B. Jensen (ed.). CRC press, Boca Raton, Florida, p. 65–109.
- CLARK, C. G., AND C. C. CUNNICK. 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 277–278.
- , AND C. C. CUNNICK. 1991. A serum-free, partly defined medium, PDM-805, for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and other *Entamoeba*. *Journal of Protozoology* 38: 211–216.
- , D. F. HARLOW, AND C. C. CUNNICK. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 431–432.
- GOTTSCHALK, G., AND R. BENDER. 1982. D-Gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*, Vol. 90. In *Methods in enzymology*, W. A. Wood (ed.). Academic Press, New York, p. 283–287.
- HILKER, D. M., AND A. G. C. WHITE. 1959. Some aspects of the carbohydrate metabolism of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 8: 539–548.
- KOBAYASHI, S., E. IMAI, H. TACHIBANA, T. FUJIWARA, AND T. TAKEUCHI. 1998. *Entamoeba dispar*: Cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 3S–8S.
- MIRELMAN, D., R. BRACHA, A. WEXLER, AND A. CHAYEN. 1986. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infection and Immunity* 54: 827–832.
- NGUYEN, L. K., AND N. L. SCHILLER. 1989. Identification of a slime exopolysaccharide depolymerase in mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology* 18: 323–329.
- PIMENTA, P. F. P., L. S. DIAMOND, AND D. MIRELMAN. 2002. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: Differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 209–219.
- REEVES, R. E. 1972. Carbohydrate metabolism in *Entamoeba histolytica*. In *Comparative biochemistry of parasites*, H. Van den Bossche (ed.). Academic Press, New York, p. 351–358.
- , R. SERRANO, AND D. J. SOUTH. 1976. 6-Phosphofructokinase (pyrophosphate) properties of the enzyme from *Entamoeba histolytica* and its reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 251: 2958–2962.
- , D. J. SOUTH, H. J. BLYTTI, AND L. G. WARREN. 1974. Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7737–7741.
- ROBINSON, G. L. 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 285–294.
- SARGEANT, P. G. 1988. Zymodemes of *Entamoeba histolytica*. In *Amoebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*, J. I. Radvin (ed.). John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 370–387.
- TACHIBANA, H., S. KOBAYASHI, M. TAKEKOSHI, AND S. IHARA. 1991. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* 164: 825–826.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Parasitology International 53 (2004) 247–254



www.elsevier.com/locate/parint

An experimental model for amoebic abscess production in the cheek pouch of the Syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*[☆]

M.A. Beg^{a,*}, S. Kobayashi^b, A.S. Hussainy^a, A. Hamada^c, E. Okuzawa^c, R.A. Smego Jr.^{a,1},
R. Hussain^a

^aDepartments of Microbiology, Pathology and Medicine, The Aga Khan University Medical College, P.O. Box 3500, Stadium Road, Karachi 74800, Pakistan

^bThe Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University, School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

^cThe Japanese Overseas Health Administration Centre (JOHAC), 3211 Kozukue-cho, Kohoku-ku, Yokohama, Japan

Received 24 December 2003; accepted 5 February 2004

Abstract

A new experimental model was developed in hamsters for amoebic abscess caused by *Entamoeba histolytica*. *E. histolytica* trophozoites were cultured in a liquid axenic medium, and then injected intradermally into the cheek pouch of the Syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*. Inoculation consistently resulted in abscess formation at the site in 20 of 22 (91%) study animals. The amoebic nature of the abscesses was confirmed by light microscopy and histopathologic examination. Abscess formation was maximal at day 12 post-inoculation. Potential applications of this simple and reliable model include further elucidation of the pathogenesis of invasive amoebiasis, studies of the host response to amoebae, and in vivo evaluation of chemotherapeutic agents that show in vitro efficacy against *E. histolytica*.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Amoebic abscess; Animal model; Cheek pouch; Hamster

1. Introduction

Since the discovery of *Entamoeba histolytica* as the causative agent of invasive amoebiasis in

humans by Losch in 1875, scientists have tried to duplicate the disease in laboratory animals. Although rodent models have been used extensively, no single animal has been found to reliably replicate the natural infection that occurs in humans. Experimentally, amoebic abscesses, particularly in the liver, have been produced in rodents by inoculating virulent trophozoites of *E. histolytica* through various routes [1]. Injection of parasites either directly into the liver parenchyma or via the portal vein have been the most widely used techniques for in vivo studies [2,3].

[☆] Presented in part at the 50th Annual Meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, Atlanta, November 11–15, 2001.

*Corresponding author. Tel.: +92-21-4859-4516; fax: +92-21-4934294/4932095.

E-mail address: masim.beg@aku.edu (M.A. Beg).

¹ Present address: Department of Medicine, University of North Dakota, 1919 Elm Street North Fargo, North Dakota 58102, USA.

Shibayama et al., [4] have demonstrated liver invasion and abscess formation by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters. Several unique characteristics of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*, would seem to make it an ideal animal model for research work such as its immunogenetic tolerance to human parasites and its possession of paired eversible cheek pouches that can serve as natural windows for detailed microscopic investigation [5]. Early parasitologic research using the golden hamster includes studies involving *E. histolytica* [6,7], *Leishmania* spp [8,9], *Schistosoma mansoni* [10], *Hymenolepis nana* [11], and *Trichinella spiralis* [12,13]. More recently, the suitability of the cheek pouch of the golden hamster, as an intact living membrane, has been demonstrated in experimental *Trypanosoma cruzi* [14,15] and *Plasmodium berghei* [16] infections.

The physiologic relevance of this site for development of an amoebic abscess has been reported previously as examples of amoebiasis of the female genital tract [17] and penis [18]. Since both sites are lined by stratified squamous epithelium this suggests that the hamster cheek pouch is a good potential site for experimental amoebiasis.

A model for invasive amoebiasis, including abscess production, would be useful for further investigations of pathogenesis and potential therapeutic regimens. In this report, we describe a simple and reliable technique for producing amoebic abscesses in the cheek pouch of the golden hamster via intradermal inoculation of axenically-cultured *E. histolytica* trophozoites.

2. Materials and methods

2.1. Animals and preparation of inocula

Male golden hamsters (*M. auratus*) aged 4–6 weeks and each weighing approximately 40–50 g were used in all experiments; hamsters were given free access to water and standard feed. Individual animals were selected for time-sequence studies and killed at different points after inoculation of parasites. Highly virulent, axenic trophozoites of *E. histolytica* strain SAW755CR clone B (generously supplied Dr Diamond) were maintained in a

liquid TYI-S-33 15% Bovine serum (BS) medium [19]. Inoculae were prepared from 72 h amoebic cultures in a late logarithmic phase of growth. Strain virulence was confirmed by inoculating trophozoites directly into the liver of a hamster with resultant amoebic liver abscess production within 1 week. Each hamster cheek pouch was injected with an inoculum containing 5×10^5 *E. histolytica* trophozoites in 0.2 ml of liquid medium. This dose was calculated after testing a range of concentrations of amoebae from 0.5 to 2.0×10^6 organisms per inoculum. Strains of *Entamoeba dispar* were maintained under monoxenic culture conditions in YIGADHA-S (yeast–iron–gluconic acid–dihydroxyacetone–serum) medium [20]. The maintenance and care of experimental animals complied with the Aga Khan University guidelines for the humane use of laboratory animals.

2.2. Induction of amoebiasis

2.2.1. Experiment 1

Two groups of hamsters (containing four animals each) were inoculated intradermally with axenically-grown trophozoites of either *E. histolytica* strain SW755CR clone B (Group 1) or non-pathogenic *E. dispar* CYN016TPC (Group 2) [20]. Organisms were inoculated intradermally into the hamster's cheek pouch using a tuberculin needle ($26G \times \frac{1}{2}$) and syringe.

2.2.2. Experiment 2

The cheek pouches of 10 animals were inoculated intradermally with trophozoites of the *E. histolytica* SAW755CR clone B study strain using a tuberculin needle and syringe. Single study animals were killed at days 2 and 4 whilst pairs of animals were killed at days 7, 12 and 17 post-inoculation. The last pair was not sacrificed in order to observe the natural course of the infection.

2.2.3. Experiment 3

Twelve animals were divided into groups of four each: Group 1—the cheek pouches of all animals were inoculated intradermally with trophozoites of the *E. histolytica* SAW755CR clone B study strain using a tuberculin syringe. Group 2—the cheek