

2) 結核菌

結核症は免疫機能が保たれている時点では、通常の結核と同様な病態を示すが、AIDS発症患者の結核症は全身性に播種をして急激な経過をとる例が多い。組織学的には細胞性免疫不全状態であることから、肉芽腫の形成が不良で、Langhans型巨細胞の出現はほとんどなく、核片の多い壊死性病変が特徴

である。結核菌も多数認められる。

文 献

- 1) 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. (1992) MMWR Recomm Rep., 41 (RR-17), 1-19.

シンポジウム：寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題

赤痢アメーバの抗原検出法

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学*
 東京大学医科学研究所 感染免疫内科**
 小林正規*・前田卓哉*・**・竹内 勤*

Key Words : アメーバ症診断, 赤痢アメーバ特異抗原検出キット, *E. histolytica* II TechLab kit, 特異性, 感度

顕微鏡による赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の鑑別に際しては、糞便などの検査材料から嚢子や栄養型が検出されることが前提であり、また、非病原性の *E. dispar* との形態的な鑑別が困難という問題がある。現在、*E. histolytica* (E.h) と *E. dispar* (E.d) の鑑別には遺伝子診断法 (PCR 法) と赤痢アメーバの抗原検出法が一般に用いられている。ここではキットを用いた赤痢アメーバ抗原検出法をとりあげ、世界的に汎用されている TECHLAB 社の *E. histolytica* II kit について、その検査方法の実際と検出感度や応用例について紹介する。

E. histolytica II kit の測定原理

E. h/E. d の両者の接着因子 (adhesin) に特異的で共通なエピトープに反応するポリクローナル抗体を吸着させた ELISA プレートの well 底内壁上に、E. h あるいは E. d の adhesin 抗原を捕捉させる。次に、

ペルオキシダーゼ標識した E. h adhesin に特異的なモノクローナル抗体を加え、E. h adhesin にのみ標識抗体を結合させる。最終的に呈色反応に必要な過酸化水素と基質を加え、その吸光度を測定することで E. h adhesin の存在、すなわち E. h の感染を診断する。

検出感度・特異性

約 0.2-0.4ng/well の adhesin が検出可能とされる¹⁾。無菌培養した E. h 栄養型 (HM-1: IMSScl6 株) を用いたわれわれの実験結果では、栄養型数が 20-25 amebae 以上で明瞭な呈色反応 ($OD_{450} = 0.113 \leq$) を示した (図 1)。嚢子の場合には嚢子壁が嚢子内栄養型の adhesin 抗原と抗体との反応を遮断しているため、嚢子壁を破砕する必要がある。そのため事前に凍結・融解 (1 回) を行っている。特異性は発現蛋白である E. h adhesin に特異的なモノクロー

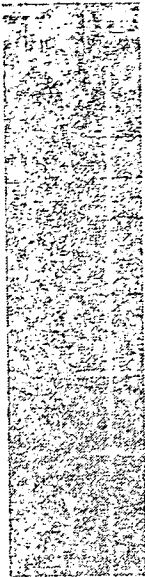
Utility of *Entamoeba histolytica*-specific Antigen Detection Kit

Seiki Kobayashi* Takuya Maeda*・** Tsutomu Takeuchi*

*Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

**Division of Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

論文請求先：小林正規 〒163-8582 新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学

<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS cl6 No. amoebae 40-50amoebae		OD ₄₅₀ =0.478	
20-25amoebae		OD ₄₅₀ =0.113	陽性 0.1 ≧
10-13amoebae		OD ₄₅₀ =0.062	0.06 ≧ 疑陽性 <0.1
5-7amoebae		OD ₄₅₀ =0.042	陰性 < 0.06
3-4amoebae		OD ₄₅₀ =0.038	
1-2amoebae		OD ₄₅₀ =0.038	

***0.2-0.4ng adhesin検出可能**

図1 キットの感度については、使用書によれば0.2-0.4ng/wellのアドヘシン抗原検出が可能とされている。アメーバ数にして1well当たり20個以上で陽性となった。陽性基準は使用書では陰性コントロールのOD値に0.05を加えた値以上であれば陽性とする。われわれはアメーバ数の少ない場合も考慮して、便宜上0.1以上を陽性、0.06から0.1までを疑陽性、0.06未満を陰性としている。

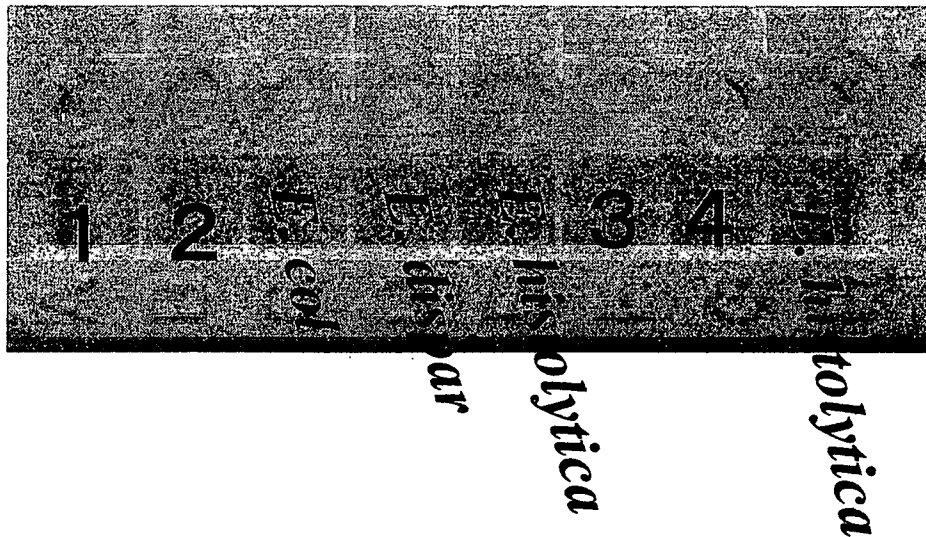


図2 1-4: 被検検体。 *E. histolytica* (*Entamoeba histolytica*), *E. dispar* (*Entamoeba dispar*), *E. coli* (*Entamoeba coli*): 培養虫体。特異性は高く *E. histolytica* とのみ反応していることがわかる (反応陽性: 呈色(黄))。

表1 メトロニダゾール治療後のフォローアップ

	No. Positives of <i>E. histolytica</i>					
	治療前	治療後				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
顕微鏡検査	12	4	1	1	1	0
<i>E. histolytica</i> II Kit	19*	4	2	1	0	0

*輸送のため採便から検査までに2日同梱したため(冷蔵保存)、栄養型のみが排出されていた便では保存期間中に栄養型が選れ、抗原検出検査のみで診断が可能であった検体も含まれるため、一概に顕微鏡検査に対する優位性を示す結果ではない。

ナル抗体を用いているため高い(図2)。

実際の検査成績

1) 臨床診断への応用

赤痢アメーバが感染すると、ELISA法など感度の高い方法を用いれば、症状の有無にかかわらず、多くは血清反応陽性となる。しかしながら宿主側に免疫グロブリン産生にかかわる免疫不全がある場合や、稀ではあるが、病毒性(virulence)が極めて低い赤痢アメーバ株感染も見られ、無症候で血清反応が陰性となる場合もある。このような症例では嚢子や栄養型検出とともに特異抗原の検出による診断が有用となる。また、嚢子や栄養型の検出が困難な水様性下痢や時間が経過したため栄養型の検出が困難となった嚢子排出が見られない便を検査材料とした検査、そして治療後の治療効果判定には抗原検出法がとくに有用となる(表1)。

抗原検出キットの利点

①冷凍で長期保存、冷蔵庫保存でも少なくとも2-3日は抗原検出が可能(抗原量が多い場合、便の性状(水様性便等)によるものか冷蔵保存1ヵ月後に検出された例もある)。②便以外に肝膿瘍等の膿汁からの抗原検出も可能。③治療効果判定に有用。④検査に無駄がなく個人検査から集団スクリーニングまで対応できる。

問題点

①抗原量が少ないと偽陰性となる。②well底を傷つけると偽陽性となる。③使用期限が1年と短いためコストが高くなる。④わが国では診断用として認可されていない。

結論

血清学的診断や顕微鏡検査に抗原検出検査を併用すると、赤痢アメーバの検出率や検査の信頼度は確実に上昇すると考えられる。また、抗原検出キットはPCR法のようにE.dの同定はできないが、E.h抗原とのみ反応することから赤痢アメーバを確実に鑑別できる。

文 献

- 1) Catalog No. T5017 (TECHLAB, U.S.A) (2003) : A 2nd generation monoclonal ELISA for detecting *E. histolytica* adhesion in fecal specimens. Issued.

日本臨牀 63 卷 増刊号 7 (2005 年 7 月 28 日発行) 別刷

広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査

—その数値をどう読むか—

[第 6 版]

(3)

VIII. 免疫学的検査

E. 非ウイルス性感染症関連検査 (抗原および抗体を含む)

赤痢アメーバ

小林正規 前田卓哉 竹内 勤

VIII 免疫学的検査 E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

赤痢アメーバ

*Entamoeba histolytica*小林正規 前田卓哉
竹内 勤Key words: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, 血清学的診断法, 無症候性アメーバ症, 組織侵入性アメーバ症

1. 概 説

赤痢アメーバ症は、診断が確定してから7日以内に届出義務を有する五類感染症に分類されている原虫疾患である(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律, 2003年改定)。臨床診断には大腸内視鏡, 画像診断(腹部超音波, 腹部CT, MRIなど)が有用であり, 検査室では赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の顕微鏡的同定, および血清学的診断法が一般に用いられている。形態的に赤痢アメーバとの鑑別が困難な非病原性の *Entamoeba dispar*¹⁾との鑑別診断にはアイソエンザイム・パターン(zymodeme)解析, 遺伝子診断法や特異抗原検出法が用いられる。一般に疫学調査で *E. dispar* 感染者の血清反応は陰性となる。

2. 検査の目的

(1) 赤痢アメーバ栄養型, 嚢子, 特異抗原および特異遺伝子の検出: 便, 膿瘍からの膿汁, 病巣組織生検材料から直接, 赤痢アメーバ(病原体)を検出・同定する。

(2) 血清学的診断法: 組織侵入性アメーバ症(大腸潰瘍, 肝, 肺膿瘍など)の診断に特に有用性が高く, 一般に有症期で75-80%程度が, そして治療回復期には90%以上が陽性となる²⁾。急性期にはレクチン抗原を用いたIgM抗体の検出²⁾やフェノール抽出抗原を用いたIgG抗体の検出などが有用となる³⁾。

3. 試料の採取方法, 保存条件

(1) 患者血清: 小分けして-20℃以下で保存。

(2) 便: 検鏡や培養検査には新鮮便を用いる。1晩以上検査ができない場合は嚢子の変性を防ぐため冷蔵保存する。遺伝子診断には集嚢子後, あるいは便を直ちに凍結し, 凍結サンプルから直接DNAの抽出を行う。また便(懸濁液)を100℃, 10分, あるいは90%エタノール処理後凍結保存する簡便な方法もある。抗原検査のためには凍結保存する。抗原性が保持されるだけでなく, 凍結融解により嚢子壁が破壊され抗原成分を溶出させる効果がある。

(3) 膿汁, 生検組織材料: 検鏡後, 遺伝子診断・抗原検査材料は凍結保存する。(免疫)病理組織学的検査標本作製にはホルマリン固定する。

4. 測定法

a. 血清抗体検査法

抗原には無菌培養した赤痢アメーバ標準株(HM-1: IMSSなど)抽出液あるいは固定虫体を用いる。

(1) ゲル内沈降反応(GDP): 基本的に粗抽出抗原を用いる。臨床症状によく対応し特異性も優れるが, 無症候性の腸アメーバ症での検出感度は低い(図1)。

(2) 蛍光抗体法(IIFA): 初期診断にはIgM, IgGの両抗体が検出できる蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン(全分画)などが用いられる。アメーバ性肝膿瘍および大腸炎患者での抗体陽性率は94%以上である^{3,4)}。

(3) 酵素抗体法[EIA(ELISA)]: EIA用96 wellプレートあるいはニトロセルロース膜(dot-ELISA)を用いる方法がある。感度の高い方法で, 診断検査に汎用されている²⁻⁴⁾。

Seiki Kobayashi, Takuya Maeda, Tsutomu Takeuchi: Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University 慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学

b. 抗原検査法

(1) 酵素抗体法(EIA): 国内外で汎用されている *E. histolytica* II キット (TechLab, VA, USA, 関東化学) の測定原理は *E. histolytica*/*E. dispar* 特異抗原(adhesin; 接着因子) に対する抗体を吸着した反応用 well に, 検体の希釈液と酵素標識した *E. histolytica* 特異抗原に対する抗体を同時に加え, 検体中の特異抗原を well 上に補足すると同時に標識抗体を抗原に結合させる方法である。また, *E. histolytica*/*E. dispar*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* の 3 種原虫の各特異抗原に対する抗体を同一膜上に間隔を置いて固着し, 3 種原虫いずれかの抗原を捕捉させる方法のキット (Triage Micro Parasite Panel; Biosite Diagnostics, Inc., CA, USA) も米国で市販されている。

(2) 免疫組織化学法: 病変部の組織切片と赤痢アメーバ特異抗体を反応させ, 酵素抗体法で赤痢アメーバの同定と局在をみる方法である。

c. 遺伝子診断法(PCR法)

検体中の赤痢アメーバに特異的な DNA 断片を増幅・検出する方法である。

5. 基準値, 平均値

a. 血清抗体検査法

(1) ゲル内沈降反応(GDP): 明瞭な沈降線が検出された場合を陽性と判定する。一般に治療開始6カ月後には沈降線は薄くなり, 数も減少する。

(2) 間接蛍光抗体法(IIFA): 著者らの教室での陽性限界は血清希釈倍率 64 倍以上⁴⁾, アメーバスポット IF(日本ビオメリユー・バイテック) では 100 倍以上で特異蛍光が認められた場合を陽性と判定している⁵⁾。抗体価は組織侵襲度合いと相関性が高い⁴⁾。

(3) 酵素抗体法(EIA): プレート EIA の場合は被検血清の吸光度を複数陰性コントロールの吸光度の平均で割った値(negative control value: NCV)が 2 以下を陰性, 2 以上 3 未満を疑陽性として 3 以上を陽性とする基準値や, 陰性コントロール吸光度の標準偏差(SD)の 3 倍以上を陽性とする基準値などが設定される⁶⁾。dot-

ELISA では塗布抗原に対応して明瞭な陽性反応がみられた場合を陽性と判定する⁷⁾。

b. 抗原検査法

(1) 酵素抗体法(EIA): *E. histolytica* II キットの陽性限界は検体の吸光度から陰性コントロールの吸光度を引いた値が 0.05 以上を陽性, 0.05 以下を陰性と判定する。ただし, 抗原量が少ない場合, 陰性と判定される場合があるので注意を要する。Triage Micro Parasite Panel の場合は膜上の所定の抗原塗布位置に明瞭な陽性反応バンドが認められたものを陽性と判定する。治療効果判定に有用である。

(2) 免疫組織化学法: 反応陽性細胞が形態的にも赤痢アメーバの特徴に合致した場合を陽性と判定する。

c. 遺伝子診断法(PCR法)

増幅が期待される既知サイズの特異 DNA が検出された場合を陽性と判定する。

6. 生理的変動(測定に影響を及ぼす因子)

a. 血清抗体検査法

GDP 法で血清成分が擬似沈降線を形成することがある(洗浄過程で消失)。IIFA 法検査に用いる励起波長によっては赤痢アメーバに自家蛍光がみられ, 固定方法, 血清との反応によっても非特異蛍光がみられる(ブロッキング処理で改善)。dot-ELISA では乳び血清不溶成分が非特異反応の原因となる(濾過で除く)。

b. 抗原検査法

便懸濁液は凍結・融解後よく攪拌し, その遠沈上清を用いることで再現性のよい反応結果が得られる。

c. 遺伝子診断法

用いるプライマー²⁾によって検出感度⁸⁾や特異性に差がみられる(複数のプライマーを使用することで偽陰性を避ける)。

7. 臨床的意義(異常値を示す疾患)

潰瘍性大腸炎, 癌, 白血病などに合併した赤痢アメーバ症患者が, 副腎皮質ステロイドや抗癌剤投与後重症化したり, 妊娠によって症状が増悪することが知られている。免疫不全症候群

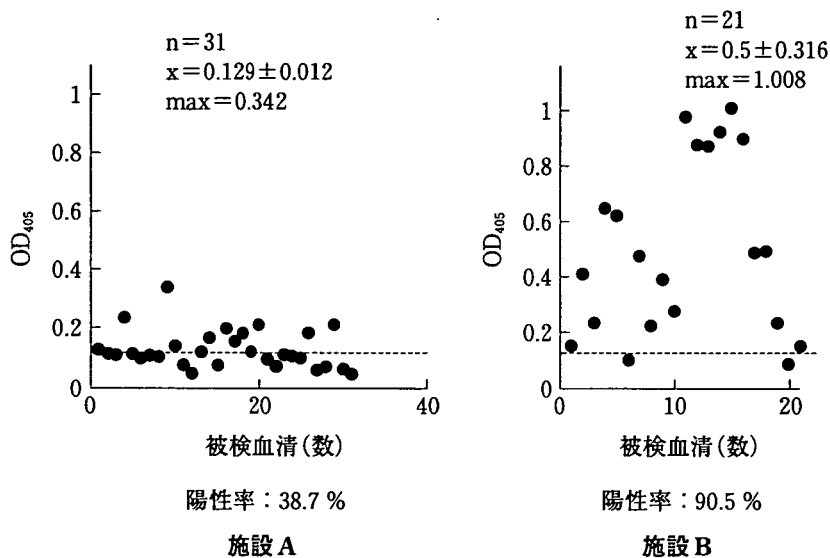


図1 低血清抗体価を示した施設(A)内赤痢アメーバ集団感染

図は2施設(施設A, B)の赤痢アメーバ糞便検査陽性者の血清抗体価(EIA法)の分布を示している。施設A: 分離株の遺伝子多型解析から単一株の感染と考えられ, 赤痢アメーバ株のvirulenceの低さが低抗体価(陽性率: 38.7%)に反映されたものと推定される。GDPはすべて陰性であった。施設B: やはり単一株が感染した他の施設での血清反応の結果を比較として示してある。この施設での感染者の90%以上は無症候であったにもかかわらずEIAとGDP陽性率は施設Aの場合と明らかに異なり, それぞれ90.5%と57.1%であった。

を基礎疾患にもつ場合については, 血清の γ -グロブリン低値を特徴とする common variable immunodeficiency syndrome (CVI) に合併した無症候性赤痢アメーバ症例(血清反応陰性)の報告もあり⁹⁾, 必ずしも症状の増悪を引き起こすとは限らないようである。また著者らの経験した低IgM血症に合併した赤痢アメーバ症例で, 大腸組織内に赤痢アメーバが確認されたにもかかわらず, 血清反応が陰性で経過した例もあり, 免疫不全症候群のタイプによっては有症であっ

ても抗体が陰性となる可能性を示している⁴⁾。赤痢アメーバ側の影響する因子に関しては, 株の遺伝子多型性パターン¹⁰⁾が異なるだけでなく, 感染者がすべて無症候性で抗体価も極めて低い特徴を示した株も分離されている(図1)。

8. 関連検査項目

- ① 便潜血反応, ② 肝機能, ③ 潰瘍性大腸炎, ④ 血算・血液生化学, ⑤ 細菌・ウイルス。

文献

- 1) Diamond LS, Clark CG: J Eukaryot Microbiol 40: 340-344, 1993.
- 2) Christopher DH, et al: Exp Rev Mol Med 22: 1999(<http://www.expertreviews.org/99000599h.htm>).
- 3) 田邊将信ほか: 日本臨牀 57(増刊: 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査3): 241-244, 1999.
- 4) 竹内 勤: 臨床検査ガイド(Medical Practice 編集委員会編), p 898-902, 文光堂, 2001.
- 5) 飯村さかえ, 村岡良明: 最新検査 5: 31-38, 1987.
- 6) Takeuchi T, et al: Jpn J Exp Med 58: 229-232, 1988.
- 7) Yamaura H, et al: J Infect Chemother 9: 25-29, 2003.
- 8) 阿部仁一郎ほか: 感染症誌 76: 921-927, 2002.
- 9) 大西健児, 木村京子: Clinical Parasitology 9: 95-96, 1998.
- 10) 野崎智義ほか: 病原微生物検出情報(IASR) 24: 79-80, 2003.

日本臨牀 63 卷 増刊号 7 (2005 年 7 月 28 日発行) 別刷

広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査

—その数値をどう読むか—

[第6版]

(3)

VIII. 免疫学的検査

E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

クリプトスポリジウム

所 正治 井関基弘

VIII 免疫学的検査 E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

クリプトスポリジウム

Cryptosporidium

所 正治 井関基弘

Key words: クリプトスポリジウム, *Cryptosporidium*, 抗原検出, 抗体検出, 酵素イムノアッセイ

はじめに

クリプトスポリジウムは腸管寄生原虫で、ヒトが感染すると激しい下痢を起こし、糞便に多数のオーシストが排出される。診断は糞便からオーシストを検出すればよい。種々の検出方法があり、蛍光抗体法も用いられる。また、最近ではオーシストそのものを検出するのではなく、原虫の可溶性抗原を酵素イムノアッセイ法で糞便から検出する診断用キットも各種市販されている。

感染すると本原虫特異的血清抗体価が上昇する。本症では抗体価が上昇した頃には症状が消失するので、抗体検査の診断的意義はないが、地域住民における流行の実態を把握するには血清学的疫学調査が有用である。

1. クリプトスポリジウム症の概略

病原体は *Cryptosporidium hominis* や *C. parvum* などで、腸上皮細胞の微絨毛内で増殖し、有性生殖で形成された成熟オーシスト(直径約 5 μm の短楕円形)が糞便に多数排出される。オーシストの経口摂取で感染し、激しい水様下痢を起こす。免疫機能正常者では下痢は1週間前後で終息するが、エイズなど免疫不全患者では慢性化・重症化し、致死的になる。確実に効く治療薬はない¹⁾。

熱帯・温帯を問わず世界中に広く分布し、年間2.5億～5億人が感染。我が国では途上国旅行による輸入感染例が多いが、国内感染も少なくない。水道水汚染による大規模な集団感染も発生しているし、エイズや先天性免疫不全患者

における死亡例もみられる。届出感染症(5類、全数把握)、エイズ診断の指標疾患に指定されており、人獣共通感染症である。

2. 診断のための免疫学的検査

a. 蛍光抗体法によるオーシストの検出

診断には、普通は、糞便の顕微鏡検査でオーシストを検出する方法がとられる。しかし、オーシストが小さく、通常原虫・虫卵検査法では検出できないので、簡易迅速シヨ糖浮遊法、シヨ糖遠心浮遊法、抗酸性染色法など特殊な検査法が用いられる²⁾。手技は簡単で、試薬のコストは安い。顕微鏡観察は×400または×600の倍率で行う必要があり、オーシストの判定には多少の熟練が要求される。また、これらの方法ではインタクトなオーシストは検出できるが、スポロゾイトが脱囊した後のオーシストは検出できない。

一方、蛍光抗体法であれば、コストは高くつくが、顕微鏡観察は×200の倍率でも検出できるので観察時間を短縮できるし、特異性が高いので判定を誤る危険性も低い。また、脱囊後のオーシストも検出できるので、検出効率も高くなる。下記に示した直接蛍光抗体法用の試薬キットが市販されている。ただし、両者とも診断薬としての認可がまだなされていないので、研究用として使用することになる。

1) MeriFluor™ *Cryptosporidium*/*Giardia*

Meridian Bioscience社(米国)の製品で、取扱業者はアベバイオロジカルリサーチ社(電話: 044-966-3151)。クリプトスポリジウムのオーシスト壁とジアルジア(ランブル鞭毛虫)のシス

Masaharu Tokoro, Motohiro Iseki: Department of Parasitology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University 金沢大学大学院医学系研究科 寄生虫感染症制御学

ト壁に対する2種類のモノクローナル抗体にFITCを標識した混合試薬を使い、2種の原虫を同時に検出できる。糞便塗抹から染色終了までの所要時間は約1時間。感度、特異性ともに優れている。

キットには必要な試薬のほか、陽性対照、陰性対照、染色用スライドグラスなども含まれており、50検体用の価格は米国で280ドル。国内販売価格は約6万円で、1検体あたり1,200円かかるが、利用価値は高い。

2) クリプトスポリジウム検出キット™

和光純薬工業社の製品で、オーシスト壁に対するモノクローナル抗体にFITCを標識したものの。もともと水道水や河川水からの検出を目的に開発されたものであるが、糞便からの検出にも使用できる。水試料50回用の価格は6万円であるが、糞便検査には試薬の使用量が少ないので約200検体の検査が可能で、1検体あたりの価格は300円程度になる。

b. 原虫特異的抗原の糞便からの検出

顕微鏡による検査には時間と労力がかかるし、オーシストの形態的特徴に十分慣れないと判定を誤る。そこで、肉眼的に判定ができる迅速診断法が開発され、最近では種々のキットが市販されている。糞便内の原虫特異的抗原(オーシストではなく、可溶性抗原物質)を酵素免疫アッセイ法(enzyme immunoassay: EIA)で検出する方法で、発色の有無(または強弱)を肉眼的に判定できるので、熟練を必要とせず、診断は誰にでもできる。

原理は、各原虫種の抗原に特異的に反応する抗体を線状あるいはドット状に吸着させたメンブレンに、糞便溶解液を載せて糞便内の原虫抗原を捕捉させ、酵素標識抗体を反応させ、基質を加えて発色させる方法あるいは免疫クロマトグラフィ法である。

検出感度も特異性も優れている。国内での価格は高く、診断薬としての認可もされていないが、顕微鏡検査に代わるものとして、今後、積極的に導入すべきものである。以下に代表的なものを紹介する。

1) Triage™ Parasite Panel

Biosite Diagnostics社の製品。1枚の小さなパネル上で赤痢アメーバ、ジアルジア、クリプトスポリジウムの3種を同時に検出できる。新鮮または凍結保存した糞便を使い、検査所要時間は約15分。判定は、パネル中央部に記載されている3種の原虫名の各箇所に出る青黒い線が出現するか否か、肉眼で行う⁹⁾。価格は20検体で510ドル。輸入すると国内では1検体あたり約3,000円になる。

なお、赤痢アメーバの場合、病原性の*Entamoeba histolytica*か非病原性の*Entamoeba dispar*かをこのキットで鑑別することはできない。

2) ColorPAC™ Giardia/Cryptosporidium

Becton Dickinson社の製品。1枚の小さなパネルに装着した膜上でジアルジアとクリプトスポリジウムの2種を同時に検出できる。ホルマリンで保存した糞便を使用し、所要時間は約10分。膜上の所定の位置に線状の発色があるかどうかを肉眼で判定する⁹⁾。価格は30検体分で554ドル。

3) ProSpecT™ Cryptosporidium

Alexon・Trend社の製品で、Rapid AssayキットとMicroplate Assayキットとがある。前者は直径2cm、高さ2.5cmほどのデバイスの上面に装着したメンブレンフィルター上で反応を行い、膜面の所定箇所に直径約2mmの青いドットが出現するか否かで判定する⁹⁾。所要時間は約20分。価格は20検体で317ドル。後者はマイクロプレートを用い、発色(黄色)の有無・強弱を肉眼または分光光度計で判定する。所要時間は約2時間。価格は24検体用で199ドル、96検体用で638ドル。

新鮮便、凍結保存便のほか10%ホルマリンで固定した便も使える。また、ジアルジアを同時に検出できるマイクロプレートキットもあり、価格は96検体用で811ドル。

3. 疫学調査のための免疫学的検査

感染するとクリプトスポリジウム特異的IgM、IgG、IgAなどの血清抗体価が上昇する。ただ、抗体価が上昇した頃には下痢は終息するので、

血清検査は診断のためには無意味である。

感染により上昇した IgG 抗体は半年から 1 年は陽性を示すので、血清学的疫学調査で抗体保有率を調べることにより、その地域・集団における長期的な流行の実態、累積感染者数、感染の危険度を把握することができる。一方、糞便検査による疫学調査では、オーシストの排出は感染後約 1 カ月で終息するので、調査した時点での感染者数を知ることはできるが、長期的な汚染の実態を知ることはできない。

抗体価の測定には間接蛍光抗体法、酵素抗体法などが用いられる。クリプトスポリジウム感染に対する免疫応答の詳細に関しては、近年のレビューを参照されたい⁹⁾。

a. 顕微鏡的抗体検査

間接蛍光抗体法や酵素抗体法を用い、抗原には精製したオーシスト、オーシストから脱囊させたスポロゾイト、感染させた動物の腸の凍結切片やパラフィン包埋切片などを使用する。

著者らの経験では、実験的に感染させたマウスの血清では抗体価の判定は容易であるが、ヒトや動物の場合は難しい。なぜなら、後者の場合は、10 倍や 20 倍希釈血清ではほぼ全例が陽性反応を示し、希釈倍率が高くなるにつれて連続的に陽性個体数が減少する。実験動物と違っ

て陰性対照の選定が困難なため、何倍以上の希釈をもって真の陽性と判定するかの設定が難しい。疫学調査で抗体保有率を示す場合には注意を要する。

b. マイクロプレート酵素抗体法

精製したオーシストを凍結融解・超音波破碎したものを抗原とし、96 穴マイクロプレートで血清を反応させ、吸光度で判定する。多数の検体を調べるのに適しているが、この場合も陽性限界(閾値)の OD 値設定には注意を要する。

おわりに

我が国の病院検査室では原虫・寄生虫症診断のための検査が全くおろそかにされている。顕微鏡検査には、ある程度の熟練を要するし、時間と労力がかかり、人員不足のために十分な対応がとれないのが実情である。しかし、診断がつかなければ適正な治療ができず、放置すれば患者の命にもかかわる。

最近では、顕微鏡検査に代わるものとして、肉眼で判定できる迅速診断用キットが各種市販されており、信頼度も高い。価格は高いが、国内でも検査診断薬として早急に認可し、日常検査に積極的に導入する必要がある。また、より安価な検査キットの開発も欠かせない。

文献

- 1) 井関基弘: 日本臨牀 61(増刊号 2): 608-612, 2003.
- 2) 井関基弘, 木俣 勲: 臨床検査 42: 541-546, 1998.
- 3) Sharp S, et al: J Clin Microbiol 39: 332-334, 2001.
- 4) Garcia LS, Shimizu RY: J Clin Microbiol 38: 1267-1268, 2000.
- 5) Parisi MT, Tierno PM Jr: J Clin Microbiol 33: 1963-1965, 1995.
- 6) Riggs MW: Microbes Infect 4: 1067-1080, 2002.

〈症 例〉

PCR 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療効果の判定に
有用であったアメーバ赤痢の 1 例

福 羅 匡 普 川 原 弘 山 田 真 善
高 瀬 修 二 郎 及 川 陽 三 郎 所 正 治

症 例

PCR 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療効果の判定に有用であったアメーバ赤痢の 1 例*

福羅匡普 川原 弘 山田真善
高瀬修二郎 及川陽三郎 所 正治**

はじめに 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) を病原体とする大腸炎のうち、粘血便を特徴とする赤痢症状を示すものをアメーバ赤痢と呼ぶが、1999 年 4 月から施行された感染症新法では腸管外病変も含めてアメーバ赤痢と定義し、2003 年 11 月から 5 類感染症として全例報告の対象となっている¹⁾。今回、polymerase chain reaction (PCR) 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療の効果判定に有用であった 1 例を経験したので、本症診断の問題点などの考察を加えて報告する。

症 例

症 例：54 歳，男性。

生活歴：25 歳時に香港，マカオに 1 週間の旅行歴があった。同性愛や肛門性交の経験はない。

現病歴：2001 年 10 月 3 日に粘血便と全身倦怠感を主訴に当院消化器内科を受診した。大腸内視鏡検査で盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが、上行結腸から S 状結腸にかけての粘膜面は正常であった。潰瘍部位の生検組織所見では軽度の非特異的炎症性変化を認めたが、便培養では結核菌を含めた有意な起炎菌が検出されなかったため、潰瘍性大腸炎の初期病変が疑われ、mesalazine 1,500 mg/day の服用が開始さ

れた。都合で治療は他院で継続することになったが、症状が改善しないため 2003 年 7 月 12 日から服薬を自己中断していた。9 月ごろより粘血便と全身倦怠感が増悪してきたために 10 月 3 日に再び当科を受診し入院となった。排便は 1 日 6~10 回の粘血便であったが、食事摂取と体重には変化を認めなかった。

入院時現症：身長 146 cm，体重 45.1 kg で、栄養状態は良好であった。発熱，貧血および黄疸はなく，腹部では腹壁は平坦・軟，圧痛は認められなかったが，腸雑音がやや亢進していた。血液検査所見では，赤沈の軽度亢進を認める以外，白血球数や CRP も正常であった。大腸内視鏡検査では，盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが，これらの所見は 2 年前のそれと同様であった (Fig. 1)。しかし，生検組織 1 個から赤血球を貪食する泡沫状細胞質，赤色調類円形核を有するアメーバ栄養体の集簇が認められた (Fig. 2)。排便直後に便を検鏡すると運動性を示すアメーバ栄養体が確認され，コーン核染色では赤痢アメーバに特徴的なカリオソームも染色された。また，便抽出液についての Eh DNA に特異的なプライマーを用いた PCR 法では 472 bp の部位に明瞭なバンドが検出された (Fig. 3)。腸管外病変の合併は認められなかったため，10 月 30 日から metronidazole 1,500 mg/day を 2 週間経口投与したところ，投与後 4 日目には自覚症状が消失し，7 日目には PCR 法にても Eh DNA を検出できなくなり，以後症状の再発を認めていない。

* A Case of Amoebiasis Suggesting Usefulness for Diagnosis and Treatments by Detection of the Specific DNA Fragment for *Entamoeba histolytica* with a PCR Method.

要旨は第 193 回日本内科学会北陸地方会にて発表した。

** M. Fukura, H. Kawahara (助教授), M. Yamada, S. Takase (教授) (消化器機能治療学), Y. Oikawa (講師) (生体感染防御学): 金沢医科大学; M. Tokoro: 金沢大学寄生虫感染制御学。

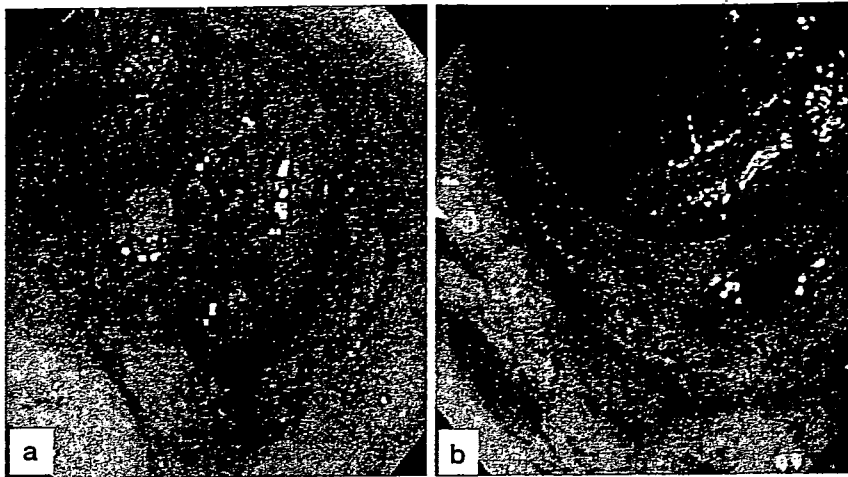


Fig. 1. 入院時大腸内視鏡検査所見

a: 盲腸, b: 直腸

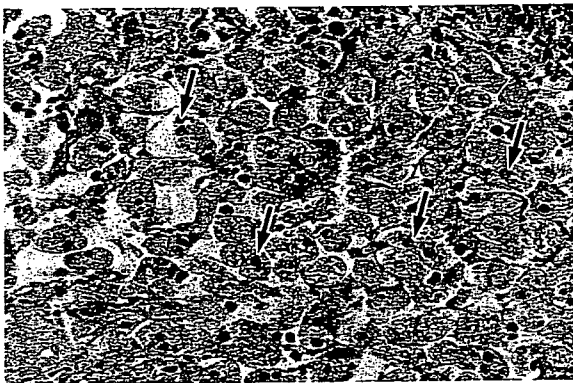


Fig. 2. 大腸生検組織所見

赤血球(→)を貪食したアメーバ栄養体が多数認められる。

考 察

びらんは上皮粘膜が欠損した状態を指し、周辺粘膜よりわずかに隆起し、その中央部は発赤調を示し、白苔はないかあっても小さいものをいう²⁾。大腸におけるびらんは種々の病態で出現するが、非特異的および特異的炎症性病変を念頭において検索を進めるのが一般的である。慢性の経過を示す炎症性腸疾患で、便中に有意な起炎菌が検出されない場合、潰瘍性大腸炎や Crohn 病などの非特異的大腸炎が診断の鑑別にあげられる。潰瘍性大腸炎にみられるびらんの特徴は、粘膜下の血管透見性消失あるいは発赤や浮腫を示す粘膜を背景に、びらんがびまん性ないし連続性に存在するこ

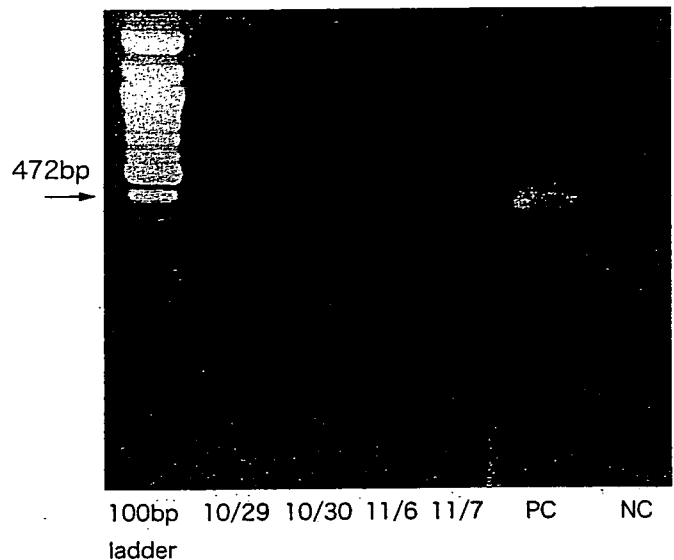


Fig. 3. 赤痢アメーバの PCR 結果

PCR 法で便中アメーバ遺伝子を検索すると、治療開始前には 472 bp の位置にバンドが明瞭に認められるが、治療 1 週後には検出されない。

PC: positive control, NC: negative control

とである³⁾。一方、Crohn 病ではアフタ様と表される小潰瘍が腸管の長軸方向に沿って配列し、次第に癒合して縦走潰瘍を形成していくが、潰瘍周囲の介在粘膜には血管透見性を認め⁴⁾、discrete ulcer と表現されている⁵⁾。

本症例での大腸病変は小さな多発性びらんないし不整形潰瘍で、しかも潰瘍周囲の発赤が強かったため、潰瘍性大腸炎や Crohn 病との鑑別が困難

であった。しかし、この潰瘍性病変の分布は盲腸および直腸だけに限局し、2年の時間が経過しても大きな変化を認めなかった。このことは赤痢アメーバの特徴をよく反映した所見と考えられる。すなわち、経口摂取されたアメーバ嚢子は小腸下部で嚢を脱して栄養体となり回盲部で分裂・増殖する。一方、直腸付近ではアメーバ栄養体を含んだ便が停滞する部位である⁶⁾。これらのことから回盲部と直腸は赤痢アメーバでもっとも炎症性変化を示す部位と考えられている。

赤痢アメーバの確定診断はアメーバの検出によって行われるが、その方法には①検鏡による便中アメーバの検出、②生検組織中におけるアメーバの検出、③特異的抗体を用いた血清反応診断、④特異的プライマーを用いたPCR法などがあげられる。アメーバは保温された便を直接検鏡しないと検出がむずかしく、一般の細菌検査では検出されないため外来診療での診断を困難にしている。一方、生検組織中にアメーバ栄養体を証明するには、潰瘍底ないしその辺縁から正確に組織を採取する必要がある^{7,8)}。本症では多数の生検組織の1カ所において、粘膜表層の滲出物中にアメーバ栄養体がかろうじて付着していた。したがって、生検自体が適切に行われたとしても組織切片作成までの過程でアメーバ栄養体を失った可能性も十分に考えられ、組織生検だけでは確診手段としては十分とはいえない。

最近ではPCR法がアメーバの診断に用いられるようになってきているが、この方法はアメーバの遺伝子を増幅して検出するため、少量の検体でも検出感度は高い。そのうえ、アメーバ栄養体と嚢子のいずれでも検出結果に差はなく、また冷所で1週間程度は保存可能であるため、排便後ただちに検体処理する必要がない⁹⁾。さらに、プライ

マーの設定によっては形態的には区別のできない非病原性の *Entamoeba dispar* との鑑別も可能となってきている¹⁰⁾。本症では入院時に検出されたPCR法による赤痢アメーバ遺伝子が、治療開始後1週間で陰性となり、その後は症状の再発も認めていない。以上のことから、PCR法による糞便中アメーバ遺伝子の検出は赤痢アメーバの診断だけでなく、治療の効果判定にも有用であると考えられる。

PCR法による赤痢アメーバ遺伝子の検出には、糞便からのDNA抽出、PCRおよび電気泳動による結果判定などやや複雑な過程が必要であるが、海外旅行者および海外よりの入国者の増加によって症例数の増加が懸念されるため、今後PCR法のさらなる簡便化と普及が望まれる。

文 献

- 1) 竹内 勤：アメーバ赤痢。日医会誌 122(10 臨増)：84, 1999
- 2) 酒井義浩ほか：大腸びらんの診断概論。消内視鏡 3(2)：137, 1991
- 3) 松本誉之、北野厚生：潰瘍性大腸炎。消内視鏡 3(2)：153, 1991
- 4) 牧山和也：クローン病とアフタ様びらん。消内視鏡 3(2)：161, 1991
- 5) 長廻 紘：4内視鏡診断。炎症性腸疾患、武藤徹一郎ほか(編)、医学書院、東京、p182-187, 1999
- 6) 牛尾恭輔ほか：寄生虫性感染症アメーバ性大腸炎。胃と腸 37(3)：415, 2002
- 7) 北野厚生ほか：アメーバ赤痢。胃と腸 32(3)：481, 1997
- 8) 宮岡正明ほか：アメーバ性大腸炎の内視鏡的検討。Prog Digest End 30：54, 1987
- 9) 阿部仁一郎ほか：赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の鑑別診断における Multiplex-PCR法の有用性。感染症誌 76(11)：921, 2002
- 10) Evangelopoulos A et al：A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol 94(3)：233, 2000

《症 例》

PCR 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療効果の判定に
有用であったアメーバ赤痢の1例

福 羅 匡 普 川 原 弘 山 田 真 善
高 瀬 修 二 郎 及 川 陽 三 郎 所 正 治

症 例

PCR 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療効果の判定に有用であったアメーバ赤痢の 1 例*

福 羅 匡 普 川 原 弘 山 田 真 善
高 瀬 修 二 郎 及 川 陽 三 郎 所 正 治 **

はじめに 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) を病原体とする大腸炎のうち、粘血便を特徴とする赤痢症状を示すものをアメーバ赤痢と呼ぶが、1999 年 4 月から施行された感染症新法では腸管外病変も含めてアメーバ赤痢と定義し、2003 年 11 月から 5 類感染症として全例報告の対象となっている¹⁾。今回、polymerase chain reaction (PCR) 法による糞便中遺伝子の検出が診断および治療の効果判定に有用であった 1 例を経験したので、本症診断の問題点などの考察を加えて報告する。

症 例

症 例：54 歳，男性。

生活歴：25 歳時に香港，マカオに 1 週間の旅行歴があった。同性愛や肛門性交の経験はない。

現病歴：2001 年 10 月 3 日に粘血便と全身倦怠感を主訴に当院消化器内科を受診した。大腸内視鏡検査で盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが、上行結腸から S 状結腸にかけての粘膜面は正常であった。潰瘍部位の生検組織所見では軽度の非特異的炎症性変化を認めたが、便培養では結核菌を含めた有意な起炎菌が検出されなかったため、潰瘍性大腸炎の初期病変が疑われ、mesalazine 1,500 mg/day の服用が開始さ

れた。都合で治療は他院で継続することになったが、症状が改善しないため 2003 年 7 月 12 日から服薬を自己中断していた。9 月ごろより粘血便と全身倦怠感が増悪してきたために 10 月 3 日に再び当科を受診し入院となった。排便は 1 日 6~10 回の粘血便であったが、食事摂取と体重には変化を認めなかった。

入院時現症：身長 146 cm，体重 45.1 kg で、栄養状態は良好であった。発熱，貧血および黄疸はなく，腹部では腹壁は平坦・軟，圧痛は認められなかったが，腸雑音がやや亢進していた。血液検査所見では，赤沈の軽度亢進を認める以外，白血球数や CRP も正常であった。大腸内視鏡検査では，盲腸と直腸に多発性のびらんおよび不整形潰瘍を認めたが，これらの所見は 2 年前のそれと同様であった (Fig. 1)。しかし，生検組織 1 個から赤血球を貪食する泡沫状細胞質，赤色調類円形核を有するアメーバ栄養体の集簇が認められた (Fig. 2)。排便直後に便を検鏡すると運動性を示すアメーバ栄養体が確認され，コーン核染色では赤痢アメーバに特徴的なカリオソームも染色された。また，便抽出液についての Eh DNA に特異的なプライマーを用いた PCR 法では 472 bp の部位に明瞭なバンドが検出された (Fig. 3)。腸管外病変の合併は認められなかったため，10 月 30 日から metronidazole 1,500 mg/day を 2 週間経口投与したところ，投与後 4 日目には自覚症状が消失し，7 日目には PCR 法にても Eh DNA を検出できなくなり，以後症状の再発を認めていない。

* A Case of Amoebiasis Suggesting Usefulness for Diagnosis and Treatments by Detection of the Specific DNA Fragment for *Entamoeba histolytica* with a PCR Method.

要旨は第 193 回日本内科学会北陸地方会にて発表した。

** M. Fukura, H. Kawahara (助教授), M. Yamada, S. Takase (教授) (消化器機能治療学), Y. Oikawa (講師) (生体感染防御学): 金沢医科大学; M. Tokoro: 金沢大学寄生虫感染制御学。

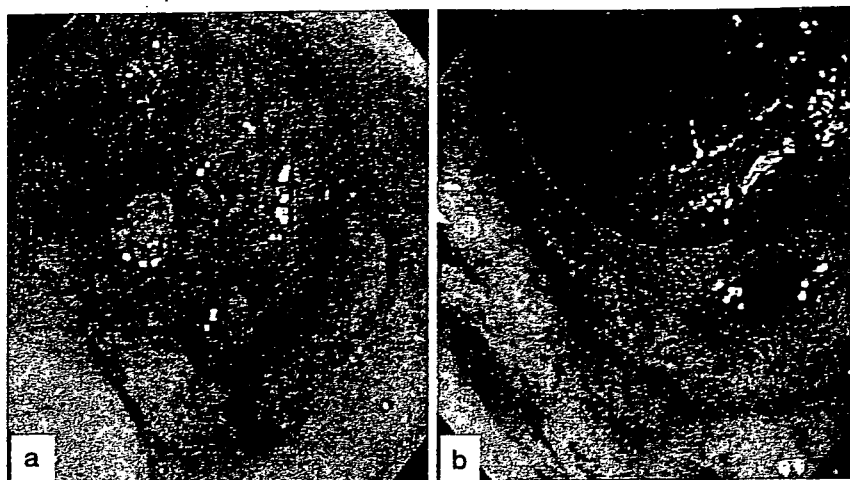


Fig. 1. 入院時大腸内視鏡検査所見

a: 盲腸, b: 直腸

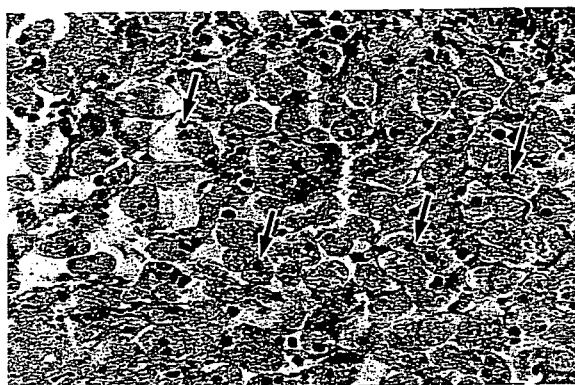


Fig. 2. 大腸生検組織所見

赤血球(→)を貪食したアメーバ栄養体が多数認められる。

考 察

びらんは上皮粘膜が欠損した状態を指し、周辺粘膜よりわずかに隆起し、その中央部は発赤調を示し、白苔はないかあっても小さいものをいう²⁾。大腸におけるびらんは種々の病態で出現するが、非特異的および特異的炎症性病変を念頭において検索を進めるのが一般的である。慢性の経過を示す炎症性腸疾患で、便中に有意な起炎菌が検出されない場合、潰瘍性大腸炎や Crohn 病などの非特異的大腸炎が診断の鑑別にあげられる。潰瘍性大腸炎にみられるびらんの特徴は、粘膜下の血管透見性消失あるいは発赤や浮腫を示す粘膜を背景に、びらんがびまん性ないし連続性に存在するこ

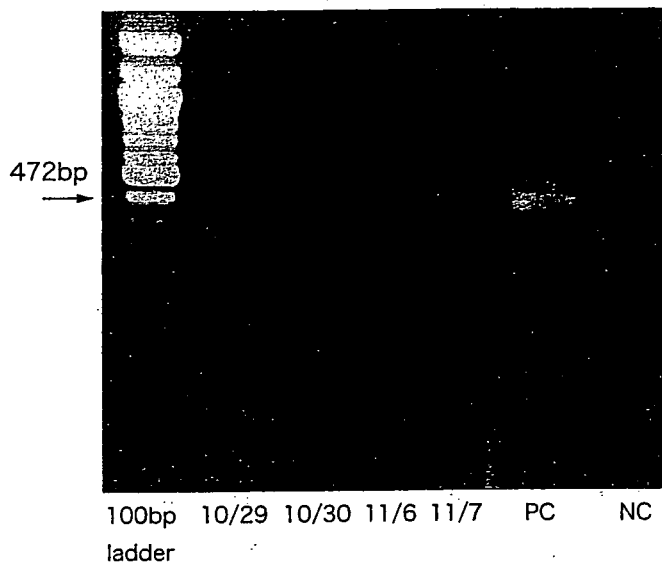


Fig. 3. 赤痢アメーバの PCR 結果

PCR 法で便中アメーバ遺伝子を検索すると、治療開始前には 472 bp の位置にバンドが明瞭に認められるが、治療 1 週後には検出されない。

PC : positive control, NC : negative control

とである³⁾。一方、Crohn 病ではアフタ様と表される小潰瘍が腸管の長軸方向に沿って配列し、次第に癒合して縦走潰瘍を形成していくが、潰瘍周囲の介在粘膜には血管透見性を認め⁴⁾、discrete ulcer と表現されている⁵⁾。

本症例での大腸病変は小さな多発性びらんないし不整形潰瘍で、しかも潰瘍周囲の発赤が強かったため、潰瘍性大腸炎や Crohn 病との鑑別が困難

であった。しかし、この潰瘍性病変の分布は盲腸および直腸だけに限局し、2年の時間が経過しても大きな変化を認めなかった。このことは赤痢アメーバの特徴をよく反映した所見と考えられる。すなわち、経口摂取されたアメーバ嚢子は小腸下部で嚢を脱して栄養体となり回盲部で分裂・増殖する。一方、直腸付近ではアメーバ栄養体を含んだ便が停滞する部位である⁶⁾。これらのことから回盲部と直腸は赤痢アメーバでもっとも炎症性変化を示す部位と考えられている。

赤痢アメーバの確定診断はアメーバの検出によって行われるが、その方法には①検鏡による便中アメーバの検出、②生検組織中におけるアメーバの検出、③特異的抗体を用いた血清反応診断、④特異的プライマーを用いたPCR法などがあげられる。アメーバは保温された便を直接検鏡しないと検出がむずかしく、一般の細菌検査では検出されないため外来診療での診断を困難にしている。一方、生検組織中にアメーバ栄養体を証明するには、潰瘍底ないしその辺縁から正確に組織を採取する必要がある^{7,8)}。本症では多数の生検組織の1カ所において、粘膜表層の滲出物中にアメーバ栄養体がかろうじて付着していた。したがって、生検自体が適切に行われたとしても組織切片作成までの過程でアメーバ栄養体を失った可能性も十分に考えられ、組織生検だけでは確診手段としては十分とはいえない。

最近ではPCR法がアメーバの診断に用いられるようになってきているが、この方法はアメーバの遺伝子を増幅して検出するため、少量の検体でも検出感度は高い。そのうえ、アメーバ栄養体と嚢子のいずれでも検出結果に差はなく、また冷所で1週間程度は保存可能であるため、排便後ただちに検体処理する必要がない⁹⁾。さらに、プライ

マーの設定によっては形態的には区別のできない非病原性の *Entamoeba dispar* との鑑別も可能となっている¹⁰⁾。本症では入院時に検出されたPCR法による赤痢アメーバ遺伝子が、治療開始後1週間で陰性となり、その後は症状の再発も認めていない。以上のことから、PCR法による糞便中アメーバ遺伝子の検出は赤痢アメーバの診断だけでなく、治療の効果判定にも有用であると考えられる。

PCR法による赤痢アメーバ遺伝子の検出には、糞便からのDNA抽出、PCRおよび電気泳動による結果判定などやや複雑な過程が必要であるが、海外旅行者および海外よりの入国者の増加によって症例数の増加が懸念されるため、今後PCR法のさらなる簡便化と普及が望まれる。

文 献

- 1) 竹内 勤：アメーバ赤痢。日医会誌 122(10 臨増)：84, 1999
- 2) 酒井義浩ほか：大腸びらんの診断概論。消内視鏡 3(2)：137, 1991
- 3) 松本誉之, 北野厚生：潰瘍性大腸炎。消内視鏡 3(2)：153, 1991
- 4) 牧山和也：クローン病とアフタ様びらん。消内視鏡 3(2)：161, 1991
- 5) 長廻 紘：4内視鏡診断。炎症性腸疾患, 武藤徹一郎ほか(編), 医学書院, 東京, p182-187, 1999
- 6) 牛尾恭輔ほか：寄生虫感染症アメーバ性大腸炎。胃と腸 37(3)：415, 2002
- 7) 北野厚生ほか：アメーバ赤痢。胃と腸 32(3)：481, 1997
- 8) 宮岡正明ほか：アメーバ性大腸炎の内視鏡的検討。Prog Digest End 30：54, 1987
- 9) 阿部仁一郎ほか：赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の鑑別診断における Multiplex-PCR法の有用性。感染症誌 76(11)：921, 2002
- 10) Evangelopoulos A et al：A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol 94(3)：233, 2000