

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策政策研究事業）

（総括）・分担）研究年度終了報告書

抗原検出キットを用いたアメーバ赤痢の診断法に関する研究

研究代表者 渡辺 恒二 国立国際医療研究センター・エイズ治療・研究開発センター

研究要旨

アメーバ赤痢は、*Entamoeba histolytica* による腸管寄生虫症である。21世紀に入り、国内で急速に症例数が増加し、死亡例も毎年の如く報告されている。多くの症例は、性感染症を感染経路としており、同じく性感染症として流行している HIV感染者では高頻度かつ重症例が度々報告されている。一方で、国内のアメーバ赤痢の診断法は諸外国と比較して遅れており、糞便の直接検鏡法のみが保険診療で認められている状況である。本研究では、正確かつ迅速なアメーバ赤痢診断を可能とし、診断の遅れによる致死化を防ぐ目的で、主に迅速検出抗原キットの有用性を、HIV診療を行っている全国多施設で得られる臨床検体を用いて、PCR法と比較検証する。抗原検出キットの有用性が示された場合には、これを広く臨床に用いられるように働きかけを行う。

A) 研究目的

アメーバ赤痢は、*Entamoeba histolytica* によって引き起こされる腸管寄生虫症であり、5 類全数把握疾患に指定されている。発生件数は、2000 年に 378 件であったが 2016 年には 1151 件と急増している。さらに、診断の遅れは致命的となることが知られており、確定診断例だけでも死亡例が最近 10 年間 (2008-2017) に 38 件報告いるが、死亡例の多くは剖検で診断されており、死亡症例数は過小評価されている可能性が高い。アメーバ赤痢は、国内では性感染症として拡大しており、特に HIV 感染者では大きな問題となっている。一方、これまで国内の保険診療で認可され、年間数千件の検査 (2017 年実績) があつた「血清赤痢アメーバ抗体」検査が、2017 年末に検査不可となり、国内で認可されている診断的検査は、「鏡検法 (*Entamoeba* の形態的同定)」

のみとなった。今後、病原体診断は益々困難となり、重症致死例が増加することが懸念される。他方、海外では「*E. histolytica* 抗原検出法」が広く用いられており、鏡検法を大きく上回る感度と特異度を持つことが知られている。2017 年には、イムノクロマトグラフィ法による迅速抗原検出法が、アメリカ食品医薬品局認可となった。本研究では、アメーバ赤痢を臨床現場で確実に診断できる診療体制を構築するために、日本での診療体制におけるイムノクロマトグラフィ法によるアメーバ抗原診断の有用性を検証する。

B) 研究方法

・研究体制

研究に先立ち、HIV 感染者の診療を行っている全国の 5 施設で、原虫検鏡検査の件数を調査したところ、2017 年 1 年間の糞便

直接検鏡検査の検査実績は 1,603 件であった。これらの協力機関において、研究期間内のうち 1 年強の期間で検体採取を行う。目標件数は 2,000 件とする。具体的な検査項目は、アメーバ赤痢を含めた原虫感染が疑われる症例に対して、イムノクロマトグラフィキットによる *E. histolytica* 抗原検出法を、保険診療内での鏡検法検査が終了した検体に対して検査し、その有用性を検討する。また、検体中に *E. histolytica* が存在するかを確認するために、遺伝子増幅検査 (PCR 法) を対象となった全検体に対して行う。原虫に対する PCR 法は、遺伝子抽出が困難な場合があるため、その手法は一般標準化されていないが、本研究では、これまで臨床検体に対する全国からの *E. histolytica* 診断を引き受けてきた実績のある感染症研究所寄生動物部八木田を研究分担者とし、*E. histolytica* PCR を担当することにした。以上の如く、HIV 診療を行う 5 カ所の大規模医療機関と原虫感染診断に対する高い技術を誇る研究機関が協力した研究体制を構築する。

・データ解析

研究デザインは、多施設による横断研究である。

解析対象となるデータは、直接検鏡検査 (*Entamoeba* の形態的な同定)、*E. histolytica* 抗原検査 (E. HISTOLYTICA QUIK CHEK カード式キットの検査結果)、*E. histolytica* 特異的プライマーを用いた PCR 法による核酸増幅検査の結果、である。解析方法は、PCR の結果を Reference データとし、PCR 陽性検体を *E. histolytica* 陽性例、PCR 陰性検体を *E. histolytica* 陰性例と定義する。直接検鏡検査と抗原検査の結果を PCR による reference データと

比較し、各々の検査の検査感度と特異度を算出し、日本の臨床現場における抗原検査の有用性を比較検証する。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言の精神に基づき、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(厚生労働省平成 29 年 2 月 28 日一部改訂)に従って実施される。本研究に關係する全ての研究者は、上記の倫理基準を遵守する責務を負う。倫理審査は、主任研究者の施設で倫理審査を受け、研究が承認された後、協力研究機関でも厳正なる倫理委員会審査を受け、当該施設の検体取扱い規約に従う。

C) 研究結果

多施設共同の横断研究について

本年度は、研究所年度であったため、年度前半は、研究計画の倫理審査などに研究準備期間となった。全ての施設で倫理審査が終了となった 2018 年 10 月から順次、全国 5 医療施設からの検体回収を開始した。2018 年 12 月現在、99 件の糞便検体の回収が完了している。これらの検体の直接検鏡検査で *Entamoeba* が検出された検体は、栄養型 1 件、シスト型 1 件であり、ジアルジア 3 件、原虫陰性 94 件であった。また、イムノクロマトグラフィ法による迅速抗原検査の結果は、陽性 2 件 (上述の *Entamoeba* 陽性便)、陰性 97 件であり、検鏡検査の結果とイムノクロマトグラフィ法による迅速抗原検査の結果は、完全に一致していた。また、PCR については、現在 63 検体の結果が暫定 (シーケンス未解析) に出ており、検鏡検査及びイムノクロマトグラフィ法の両検査で陰性であった検体のうち 2 件で *E. histolytica* 特異的な遺

伝子が検出されている。その2件を含めて、PCR 陽性検体に関しては、シーケンス解析、更には別の *E. histolytica* 特異的なプライマーによる定量 qPCR 検査を行い、遺伝子解析による病原体診断を確定させる予定である。また、PCR 未検査の検体検査も含めて、今後もデータ解析を行っていく。今後も、検体回収を継続し、検鏡、イムノクロマトグラフィ法の検査感度・特異度を、PCR 法を reference として検証していく予定である。

Reference data となる *E. histolytica* 検出のための PCR 法改良について

本研究で、イムノクロマトグラフィ法や直接検鏡法の検査感度、特異度についての検討を行うため、従来の PCR で用いられてきた定性的 conventional PCR に加えて、定量的 real-time PCR (qPCR) についても検査出来るように検査体制を整備している。従来から用いられている cPCR の検査系では、*E. histolytica* との顕微鏡的に判別不能な *Entamoeba* species (*E. dispar*, *E. moshkovskii*) を、一度の PCR で判別するプライマーセットによる方法を既に確立しているため、診断ツールとしては十分である一方、イムノクロマトグラフィの量的な診断感度を検証することは出来ない。一方、qPCR の系を確立することにより、どの程度の *E. histolytica* が含まれていれば、イムノクロマトグラフィ法での検出が可能なのか、その量的感度を検証することが可能となる。今年度の研究で、臨床検体への応用が可能なレベルに精度管理を行い、cPCR で *E. histolytica* 陽性になったにも関わらず、検鏡やイムノクロマトグラフィ法で陰性となった(偽陰性)となった検体に関する検証を進める予定である。

保存検体を用いた検証について

本研究の研究期間が2年間と限られており、検体の採取期間は1年強と短いこと、赤痢アメーバ症は全国で年間1000件(うち6-7割が腸炎)の稀少疾患であることを鑑みると、研究協力5施設において糞便検体で診断される赤痢アメーバ症の症例数(イムノクロマトグラフィ法による迅速抗原検査で陽性となることが期待される件数)は、少ない場合も想定される。そのため、効率よく本抗原検査の有用性を検証するために、既に採取済みの検体を用いた検証も行っている。現在のところ、48件の保存便検体(検鏡検査で、シスト陽性9件、栄養型陽性6件、*Entamoeba* 陰性33件)で検証を開始している。シスト陽性9検体でイムノクロマトグラフィ法4件陽性5件陰性、栄養型陽性6件でイムノクロマトグラフィ法2件陽性4件陰性、検鏡で *Entamoeba* 陰性33件でイムノクロマトグラフィ法1件陽性32件陰性となった。陽性検鏡法とイムノクロマトグラフィ法で一部結果の解離が見られる検体もあることから、cPCR 法、シーケンス解析による遺伝子同定(*Entamoeba* 種の特定)、*E. histolytica* 陽性検体については、qPCR による定量検査とイムノクロマトグラフィ法や検鏡検査の感度比較などを行う予定である。

D) 健康危険情報

該当無し

E) 研究発表

国内学会発表

柳川泰昭, 渡辺恒二, 永田尚義, 上村悠, 水島大輔, 青木孝弘, 木内英, 田沼順子, 塚田訓久, 照屋勝治, 菊池嘉, 湯永博之, 岡慎一.

赤痢アメーバ症に対する病原体診断法の感
度に関する検討. 第32回日本エイズ学会学
術集会・総会, 2018年12月, 大阪.

F) 知的財産権の出願・登録状況
該当無し