

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、腸管原虫赤痢アメーバ (*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、腸管原虫赤痢アメーバ (*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いる。確定診断例だけでも死亡例が最近 10 年間 (2008-2017) に 38 件報告されているが、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)」のみとなつた。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「赤痢アメーバ抗原検出法」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つた。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

HIV 感染者の診療を行っている全国の 5 医療施設 (北海道大学病院、都立駒込病院、

東京大学医科学研究所附属病院、国立国際医療研究センター、熊本大学医学部附属病院)を協力施設とし、寄生虫感染が疑われて糞便検鏡検査(寄生虫検査)が行われた糞便検体を回収した。検査体制としては、保険診療で行われる直接検鏡検査および赤痢アメーバ抗原検査(イムノクロマグラフィ法)は、各医療機関で速やかに実施された。また、残余検体を研究用検体として凍結保存した後、感染症寄生動物部に輸送し、核酸増幅検査(PCR)を含めた研究用検査を実施する研究体制を敷いた。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した。

・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)、赤痢アメーバ抗原検査(E. HISTOLYTICA QUIK CHEK カード式キットの検査結果)、赤痢アメーバ(*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陽性検体を赤痢アメーバ陽性例、PCR陰性検体を赤痢アメーバ陰性例と定義する。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した。

(倫理面への配慮)

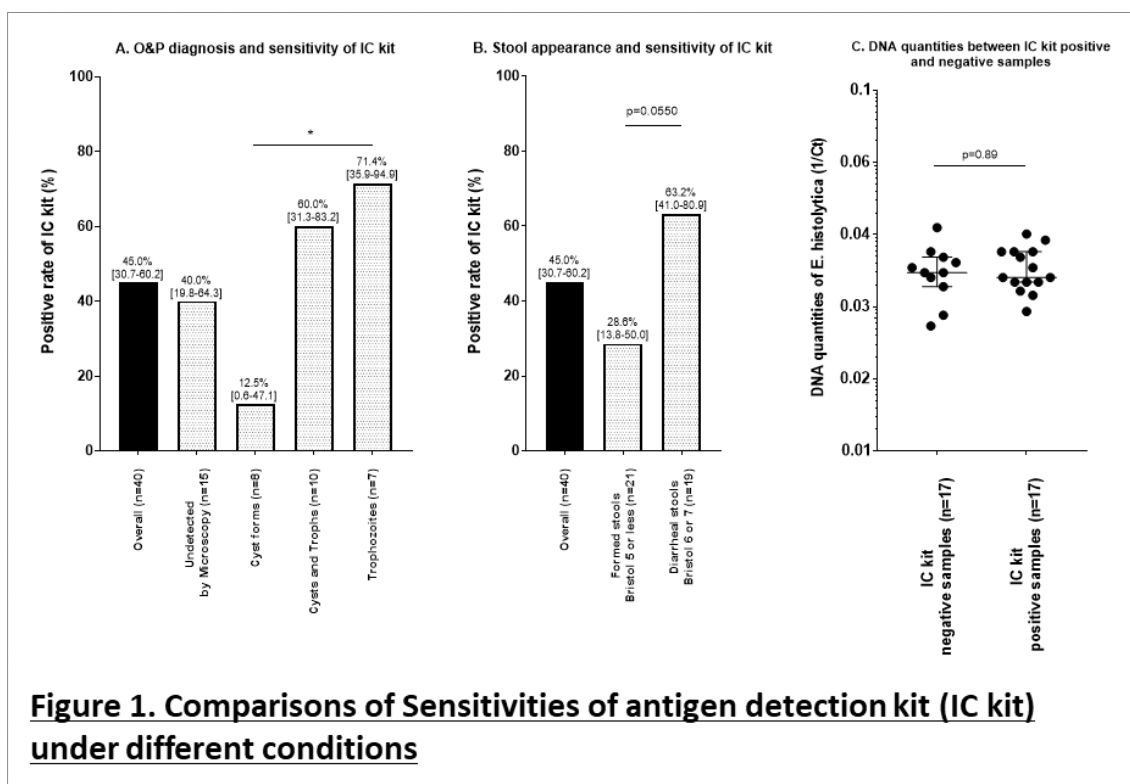
本研究は、ヘルシンキ宣言の精神に基づき、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(厚生労働省平成29年2月28日一部改訂)に従って実施される。本研究に關係する全ての研究者は、上記の倫理基準を遵守する責務を負う。倫理審査は、主任研究者の施設で倫理審査を受け、研究が承認された後、協力研究機関でも厳正なる倫理委員会審査を受け、当該施設の検体取扱い規約に従う。

C) 研究結果

抗原検出検査の感度に関する研究

2019年12月末までに、683件の糞便検体に対する検査を完了させた。683件のうち26件は、いずれかの検査が不能であったために、解析対象から除外した。除外理由

Table 1. Sensitivity and specificity to polymerase chain reaction tests.			
A. Sensitivity and specificity of Microscopic examination (O&P)			
	Entamoeba (+)	Entamoeba (-)	
PCR (+)	25	15	Sensitivity=62.5%
PCR (-)	1	616	Specificity=99.8%
B. Sensitivity and specificity of Antigen detection kit (IC kit)			
	IC kit positive	IC kit negative	
PCR (+)	18	22	Sensitivity=45.0%
PCR (-)	0	617	Specificity=100%



は、10 件が迅速な検鏡検査対応不能、16 件が検体不足による抗原検出検査・PCR 不能であった。すべての検査が行われた 657 件の検体に対して、解析を行った。657 件の糞便検体で、PCR により、赤痢アメーバの存在が確定できたのは 40 件であり、本解析集団での赤痢アメーバ有病率 6.1% [95%信頼区間 4.5-8.2] であった。赤痢アメーバ (PCR 陽性) 検体 40 件を赤痢アメーバ症とし、残りの 617 件を非赤痢アメーバとし、直接検鏡検査と赤痢アメーバ抗原検査の検査の精度を比較した (Table 1)。直接検鏡検査の病原体検出感度は 62.5% [47.0-75.8] であった一方で、赤痢アメーバ抗原検出検査の病原体検出感度は 45.0% [30.7-60.2] と抗原検出検査の感度が低い傾向 ($p=0.18$, 統計学的有意差なし) にあった。その傾向を詳しくみるために、検鏡所見と赤痢アメーバ抗原検出検査の結果の相関を見たところ (Fig. 1)、検鏡検査でシストのみが観察された検体では、赤痢アメーバ抗原検出検査の感度が

12.5% [0.6-47.1]、栄養型のみが観察された検体に対する感度 71.4% [35.9-94.9] や栄養型とシストの両方を含む検体に対する感度 60.0% [31.3-83.2] と比して、有意 ($p=0.046$) に検査感度が低いことが明らかになった (Fig.1A)。また、糞便の性状で赤痢アメーバ抗原検査の感度を比較したところ、有形便 (感度 28.6% [13.8-50.0]) では、下痢便 (感度 63.2% [41.0-80.9]) と比較して、感度が低い傾向にあることが明らかになった (統計学的有意差無し, $p=0.055$, Fig. 1B)。一方、定量 PCR による赤痢アメーバ (*E. histolytica*) 核酸量と赤痢アメーバ抗原検査結果の間に、相関は見られず、抗原検査の結果は、抗原量 (核酸量) には大きく左右されなことが示唆される結果となった (Fig. 1C)。以上より、糞便中に栄養型を有し、肉眼的にも下痢便を認めるような感染者では、比較的高い感度で赤痢アメーバ感染が診断される一方、比較的症状が軽く、シストのみを排出する感染者に対しては、赤痢アメーバ抗原検査では、高率に

偽陰性が生じることが判明した。一方、赤痢アメーバ抗原検査の特異度は非常に高く(100% [99.4-100])で他の原虫感染による偽陽性は1例も認めず、特異度の極めて高い検査であることが証明された (Table 1)。

以上の結果を以て、赤痢アメーバ抗原検出検査の臨床における有用性と検査時の注意点をまとめ、本抗原検査の薬事申請に対しての意見書をまとめ、情報提供した。また、臨床微生物学会との協議を持ち、保険収載に向けた提言作成にも貢献した。

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。本研究班で、定量 PCR の検出系を整備し、抗原検査や検鏡検査の感度と病原体量との関係を調査した。

D) 健康危険情報
該当無し

E) 研究発表
論文報告 (和文)

渡辺恒二 , 柳川泰昭, 脇本優司. アメーバ赤痢: 性感染症としての拡大と国内診療上の問題点について. 日本エイズ学会誌. 21:132-142, 2019.

国際学会発表

T. Kobayashi, S. Fujiwara, K. Fukushima, M. Tanaka, K. Yajima, A. Ajisawa, A. Imamura. Association between amoebiasis and sexually transmitted infections in Japan. 19th International Congress on Infectious Diseases. February 20-23, 2020, Kuala Lumpur, Malaysia.

国内学会発表

遠藤知之, 大塚梨沙, 鯉淵智彦, 古賀道子, 小林泰一郎, 坂井和巳, 渋谷真美, 下河原理江子, 新行内裕之, 土橋悦子, 中田浩智, 永田彩夏, 早坂かすみ, 福嶋理香, 宮川寿一, 八木田健司, 柳川泰昭, 渡辺恒二. (発表者は、あいうえお順. 本研究班結果を代表して報告) 腸管アメーバ赤痢に対する迅速抗原診断キットの有用性に関する検討. 第33回日本エイズ学会学術集会、2019年、熊本. 小林泰一郎、藤原翔、福島一彰、田中勝、矢嶋敬史郎、味澤篤、今村顕史. 赤痢アメーバ症と、HIV 感染症を含むその他の性感染症の関連. 第33回日本エイズ学会学術集会、2019年、熊本.

渡辺恒二. 腸管アメーバ赤痢に対する迅速抗原診断キットの有用性に関する検討. 感染症領域新規検査検討委員会、2020年、東京.

F) 知的財産権の出願・登録状況
該当無し