

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）  
（総合）研究報告書

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) があった「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「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

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 (イムノクロマトグラフィ法) 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。本研究に関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

研究初年度である平成 30 年度においては、研究計画の倫理審査など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。初年度から最終年度に掛けて、検体回収と解析を行い、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%

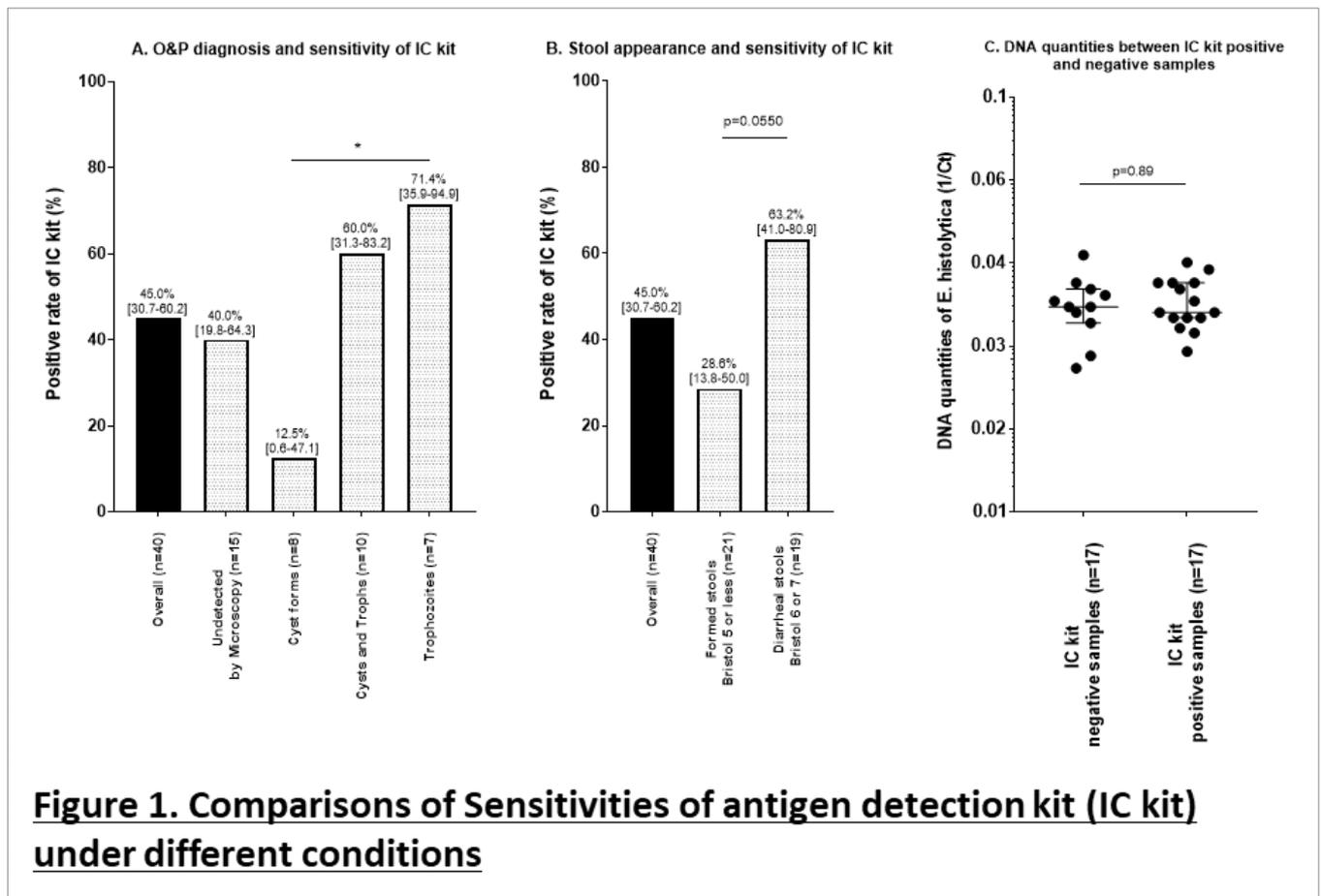
**Table 1. Sensitivity and specificity to polymerase chain reaction tests.**

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%



[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、初年度は、従来から用いられてきた *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* の 3 種を同時に同定できる conventional PCR を今回の研究用に精度チェックを行い、検体の感染判定に用いた。一方で、初年度から最終年度にかけては、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た。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) 考察

### 1. 抗原検出検査の臨床上的有用性と注意点

PCRを基準としたとき、抗原検出検査の感度は45.0%であり、検鏡検査の62.5%と比して低い結果であった。先行研究からは、検鏡検査の感度25-60% (アメーバ性腸炎)、10-40% (アメーバ性肝膿瘍)<sup>8)</sup>とされていることから、本研究に協力した研究施設 (エイズ拠点病院) で検鏡検査を行った検査技師の検鏡技術が、先行研究と比して極めて高かったことが示唆される。一方、より詳細な解析 (Figure 1) を行うと、抗原検出検査では、シスト排出者に対する検査感度が低いことが明らかとなった。本抗原検出検査は栄養型表面に発現されるアドヘシン (レクチンタンパク) を検出するためであると考えられた。本研究では、患者個人情報にあたる臨床情報の一切を排除してデータ収集を行ったため、臨床症状・重症度と検査一致率の検証は行っていない。しかし、一般的には下痢などの症状を有するアメーバ性腸炎発症患者の糞便検体からは栄養型が検出されること、シストは組織障害性を有さず、他者への感染源となり得る無症候性持続感染者で排出される。このことから、本抗原検査は有症状の侵襲性アメーバ赤痢の診断に対しては有効であるが、無症候性シストキャリアなどでは、偽陰性を示す可能性が懸念される。

アメーバ性腸炎が疑われる際には、本抗原検出検査が診断に有用である可能性が高い一方で、無症候性シストキャリアの検索または除外目的で検査が行われる場合には、本抗原検出検査のみによる除外診断は難しく、熟練した検査技師による直接検鏡検査を行うなど、シストに対する検査を行う必要があると考えられた。特異度については、抗原検出検査は100%と非常に高い値を示した。

以上より、アメーバ赤痢 (特にアメーバ性腸炎) の診断において本抗原検査の有用性が確認された。

### 2. 診断体制について

上述のように、本研究結果からは参加医療機関

の検査技師による直接検鏡検査の高い技術力が示唆される内容になったものの、本研究に参加した医療施設は、エイズ拠点病院の中でも、HIV感染者の診療実績があり、アメーバ赤痢の診断にも精通している。一方、アメーバ赤痢を始めとした原虫や寄生虫の直接検鏡検査による診断精度は、検査者の経験に依るところが多いため、全国すべての医療機関やクリニックで同じレベルの直接検鏡検査結果が得られる確証はない。原虫を含めた寄生虫診断に関する全国の医療均てん化は、大きな課題である。図1. に示した通り、エイズ拠点病院で実施された本研究であっても、2件では検査技師の迅速な対応が困難なために、検鏡検査の結果が得られないという結果が出ており、本研究で用いた迅速検査による抗原検出検査が他の寄生虫疾患においても徐々に広がっていくべきだと考えられた。

## E) 結論

検査者の技術や場所に依らず、迅速かつ安定した精度で、侵襲性のアメーバ性腸炎 (栄養型 *Entamoeba* 排出) を診断できる、抗原検出検査の有用性は極めて高い。一方で、無症候性持続感染者や肝膿瘍発症患者に対しては、検鏡検査や血清抗体検査などの検査を併用して診断する必要があり、赤痢アメーバ症の診断体制に関して、更なる整備が必要であると考えられた。

## F) 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

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, 瀧永博之, 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.  
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.

G) 知的所有権の取得状況

該当無し