

## 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<sup>®</sup>) の評価

奥沢英一 小林正規 竹内 勤

(掲載決定:平成5年3月31日)

### 要 約

間接赤血球凝集反応を利用した赤痢アメーバ症診断用キットの信頼性を検討した。

慢性経過例の診断に限って言えば、感度、特異性とも優れており信頼性が高い。また、いわゆる無症状キャリアー (非病原株の感染) との鑑別に用いた場合の信頼性も高い。急性期患者の診断に用いた場合でも陽性と判定された場合の結果は信頼に足りる。ただし、急性症状を呈するアメーバ症で陰性と判定された例が多かった。急性期に陰性と判定された場合には、ベア血清による確認が必要と思われる。

本キットは迅速な判定, 良好な再現性, 優れた特異性が利点である。一般の検査室におけるアメーバ症の血清診断に対して利用価値は高いと考える。

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, Amebiasis, Haemagglutination test, Serodiagnosis

### 緒 言

わが国における赤痢アメーバ症の1980年代からの増加傾向は著しく (高田ら, 1990), 臨床の現場においてもかなり頻繁に見る感染症の1つとなってきている。また起因原虫である赤痢アメーバの感染にかかわる因子も男性同性愛者間での性行為 (Takeuchi *et al.*, 1989) だけでなく, 最近では輸入感染や重症心身障害児収容施設における集団発生 (Nagakura *et al.*, 1989) など多様化しつつあり, 公衆衛生の面でも問題を提起している。このような事情を考えるに, 赤痢アメーバ症の診断の迅速化, 標準化は緊急の問題として重視されるべきである。

従来より行われてきた赤痢アメーバ症の診断法は3種類に大きく分類でき, それぞれが異なった意味, 特徴を有している。第1は大腸生検材料や肝膿瘍穿刺液など, 組織内のアメーバを証明する方法である。これには病理組織学的な同定, 免疫学的染色による同定等がある。いずれも虫体が見いだされれば確定診断につながり, この意味で確実性は高いが, 感度が検体採取部位に左右され, 材料採取における侵襲性も時に問題となる。DNAプローブ法を用いれば感度は改善されるが, このような材料に応用しようとなるとやはり侵襲性が問題となりうる。第2は糞便中の赤痢アメーバの栄養型, あるいは嚢子型を

検出するものである。診断目的にアメーバの培養 (Robinson, 1968) を実施できる機関は少なく, ほとんどの場合は糞便鏡検査によっている。この方法は簡便かつ無侵襲性であるため, 最初に実施すべき検査である。しかし, やはり感度が低く1回の検査では検出率が十分ではない。繰り返し6~7回実施すれば感度は上昇するが, それでも腸アメーバ症の半数近くは見逃される。また, 最近では病原株, 非病原株を同定 (Sargeant and Williams, 1979) する必要がある。しかし, 通常の検鏡法で両者を鑑別することは不可能である。3番目は血清抗体検出法である。用いる手法にもよるが, 明らかに血清中に抗赤痢アメーバ抗体が存在すると判定されれば, 組織内にアメーバ虫体が侵入している事と大略同義と考えられる。従って, 糞便中から赤痢アメーバ虫体が検出された場合, 血清抗体もあわせて陽性であれば, 多くの場合, 病原株の感染と判断する。ただし通常, 腸アメーバ症の場合に血清抗体価はそれほど高くない。これに対し, アメーバ性肝膿瘍では血清抗体価が高く, 診断において血清反応が重要な位置を占める (竹内, 1990)。

今回, 筆者らは赤痢アメーバ症の血清診断のために新しく開発された間接赤血球凝集反応キットの診断的価値に関して検討した。本法は特殊な器具を必要とせず, 迅速な判定 (約90分後) が可能である。このため, 一般の臨床検査室においても十分に実施可能である。Yama-

ura *et al.* (1990) は、本キットとはほぼ同じ手技を用いて赤血球凝集反応の信頼性を評価しており、特異性は99%以上、感度も95%と報告している。しかしながら、赤痢アメーバ症の血清反応において、「急性期」に偽陰性反応が頻発する現象（奥沢・竹内, 1992）が明らかとなってきた。本稿においては、現症、病日、既往など血清抗体価に影響を与えることが判明してきている各種パラメーターに着目し、この視点から本キットを評価することを試みた。

#### 材料および方法

評価したキットは「赤痢アメーバ HA<sup>®</sup>」（日本凍結乾燥研究所製、協和薬品工業発売）で、抗体測定の手順はキットに添付されているマニュアルに従った。手順は Yamaura *et al.* (1990) の報告に準じたもので、大略は以下の通りである。

- (1) U底にマイクロプレートにキット付属の希釈液を滴下し、患者血清の希釈系列（10倍希釈から始まり、2倍ずつ段階希釈を行う）を作成する。
- (2) 10倍希釈血清25  $\mu$ l には、赤痢アメーバ抗原を感作していないニワトリ血球浮遊液75  $\mu$ l を加える。（対照）
- (3) 20倍希釈血清25  $\mu$ l には、赤痢アメーバ抗原（HM-1: IMSS 株）を感作したニワトリ血球浮遊液75  $\mu$ l を加える（最終希釈倍率80倍）。さらに希釈した血清に対しても同様に行なう。
- (4) ミキサーで混和し、90分放置したのちに個々の穴について判定する。

非感作血球が凝集した場合は判定不能とする。非感作血球が凝集せず、感作血球も最終希釈倍率80倍で凝集しない場合は陰性と判定する。非感作血球が凝集せず、かつ感作血球が上記希釈倍率で凝集した場合に陽性とする。陽性と判定した場合には、凝集がみられる最終希釈倍率をもって抗体価とする。

以上の手技に基づいて、真陰性と思われる血清73検体を用いて特異性を評価した。この目的には、健康人対照51名（以下、健康群）、非病原株感染者14名（以下、キャリア群）、抗トキソプラズマ抗体陽性者（以下、トキソ群）8名の血清を使用した。健康群は海外渡航歴の無い健康人51人で、全例が20才前後の日本人。採血時および、それ以前数ヶ月以上に涉って、下痢や発熱などアメーバ症を疑わせる臨床所見を全く認めなかった。キャリア群は非病原性の赤痢アメーバ感染者で、赤痢アメーバの腸管内感染である。キャリア群14名の糞便からは、赤痢アメーバ嚢子が確認され、かつ Robinson 培地（Robinson, 1968）にて株が分離され、アイソザイム分析によって非病原株感染と確認されている。さらに、これらキャリア群の血清はゲル内沈降反応にて抗アメーバ抗

体が陰性であることも確認されている。なお、11株は Zymodeme I、残りの3株は Zymodeme VIIIであった。コントロール群として、組織内に赤痢アメーバ以外の原虫感染がおこなっている例も用いた。トキソ群はリンパ節腫脹からトキソプラズマ症が疑われラテックス凝集反応にて陽性と判定された日本人、あるいは妊娠時のスクリーニングで抗トキソプラズマ抗体陽性であることが判明した8例である。8例とも抗アメーバ抗体陰性であることは、ELISA法によって確認されている。

さらに、感度を評価するため、真陽性と思われる血清100検体を用いた。この目的には、アメーバ性腸炎患者血清58検体、アメーバ性肝膿瘍患者血清42検体を採用した。いずれもゲル内沈降反応あるいはELISA法にて抗アメーバ抗体陽性と判定されたものである。アメーバ性腸炎のうち、32検体は腹痛、1日10回以上の下痢など急性症状で発症した症例から病日3ヶ月以内に採血された血清で、筆者らの分類（奥沢・竹内, 1992）に従えば急性アメーバ性腸炎と分類できる。残りの26検体は血便主体の症状を示し、慢性に経過し病日3ヶ月以降に採血されたもので、慢性アメーバ性腸炎と分類できるものである。アメーバ性肝膿瘍のうち、28検体は高熱（最高体温39°C以上）、白血球増多（2万以上）、多発性膿瘍、肝機能障害（GOT 50以上）、肺炎症状、腎炎症状などを伴い急性発症した患者（Katzenstein *et al.*, 1979）から採血された血清で、上記の筆者らの分類に従えば、急性アメーバ性肝膿瘍に属するものと思われる。残りの14検体は39°C未満の発熱で緩徐に発症し、右葉の単発膿瘍が確認された患者の血清で、慢性アメーバ性肝膿瘍と分類できるものである。

これらの検体は血清学的診断を目的として筆者らの研究室に寄せられたもので、結果判定後に凍結保存されていたものを用いた。患者の臨床経過に関するデータは、検査依頼時に添付された病歴、および結果連絡時に担当医から得た情報が主体である。

#### 成績

まず、Table 1 に本キットの感度および特異性に関する結果をまとめた。健康群51例の血清はすべて陰性と判定された。トキソ群の血清では後述のように判定不能例があったが、陽性と判定されたのは無かった。キャリア群のうち1例は陽性と判定されたが、ゲル内沈降反応より感度の高いことが判明しているELISA法（Takeuchi *et al.*, 1988）によって確認した結果、抗アメーバ抗体が検出された。つまり、この1例は非病原株が分離された例ではあるが組織内感染が疑われ、偽陽性では無く真陽性の可能性が濃厚である。以上の結果から、本法の特異性は優れたものと判断された。

非感作血球凝集に関しても、健康人では皆無であった。

Table 1 Sensitivity and specificity of the present HA test for amebiasis

	(-)	N.A.	(+)	total
healthy controls	51	0	0	51
non-invasive amebiasis	13	0	1	14
Toxoplasma seropositive	6	2	0	8
invasive amebiasis	14	4	82	100

N.A.: Agglutination of unsensitized RBC

non-invasive amebiasis: Non-pathogenic *E. histolytica* isolated from stool and negative gel diffusion precipitin test (GDPT) for amebiasis.

Toxoplasma seropositive: Positive Latex agglutination test for toxoplasmosis (some with lymphadenopathy) and negative ELISA for amebiasis.

Invasive amebiasis: *E. histolytica* detected in stool or tissue and positive GDPT or ELISA for amebiasis.

ただし、トキソ群8例中2例、真陽性群100例中4例では非感作血球の凝集がみられ、判定不能に終わった。

真陽性群は100名中82名が陽性と判定され、偽陰性は14例であった。感度に若干の問題があると思われたので、赤痢アメーバ症の各病型別に抗体価の分布を調べた。この結果を Table 2 に示す。従来の方法によると、アメーバ性肝膿瘍では高い抗体価が、アメーバ性腸炎では低い抗体価が得られるのが通常である(竹内, 1990)が、本キットでは両者の間に大差無かった。注目されるのは、急性アメーバ症と慢性アメーバ症の間で鋭敏度に違いがみられる点である。慢性アメーバ性腸炎26例全て、慢性アメーバ性肝膿瘍は14例中12例が陽性と判定されており、慢性アメーバ症に対する感度は95%であった。しかし、急性アメーバ性腸炎32例中7例、急性アメーバ性肝膿瘍

28例中6例は陰性と判定されており、急性アメーバ症に対する感度は78%となった。本キットで陰性と判定された13例中9例はゲル内沈降反応法で陽性と判定されたものである。残り4例も組織あるいは糞便から赤痢アメーバが検出されており、かつ IgG-ELISA 法で陽性と判定されたものである。つまり、急性症状を呈する症例に関する限り、本法の感度はゲル内沈降反応に劣ると結論される。

慢性という概念は、現症が軽度という意味の他に、感染後の経過が長いという意味も含む。後者の意味で比較検討するには、輸入例と再燃例を比較すれば良いと考えられる。その結果を Table 3 に示した。アメーバ症は基本的に慢性感染症であり輸入例といっても、潜伏期は3ヵ月以上のことが多い。ただし、発症前2年以上に遡

Table 2 Antibody titers in various types of amebiasis by the present HA kit

	(-)	×80-160	×320-640	×1280-	N.A.	total
colitis (total)	7	10	15	25	1	58
acute cases	7	5	6	13	1	32
chronic cases	0	5	9	12	0	26
liver abscess (total)	7	7	7	17	3	42
acute cases	6	7	5	8	2	28
chronic cases	1	1	2	9	1	14

acute cases: (1) sudden onset with acute symptoms like severe diarrhea or high grade fever and (2) presence of at least one of the following signs; leukocytosis, diffuse erosion in colonic mucosa hepatomegaly, GOT elevation, rale, hematuria

chronic cases: (1) gradual onset with mild symptoms; mild diarrhea and/or moderate fever and (2) presence of at least one of the following signs; bloody stool, focal ulcer in colonic mucosa solitary liver abscess

Table 3 HA titers in imported or recrudescence cases of amebiasis by the present HA kit

	(-)	×80-160	×320-640	×1280-	N.A.	total
imported cases (total)	7	7	7	2	2	25
colitis	3	4	4	1	1	13
liver abscess	4	3	3	1	1	12
recrudescence (total)	2	0	8	18	0	28
colitis	1	0	5	12	0	18
liver abscess	1	0	3	6	0	10

imported: history of oversea travel in endemic areas within two years before onset of present illness

recrudescence: history of bloody stool or liver abscess of unknown aetiology, more than two years ago

る渡航歴については除外した。その理由は、第1に感染との関連が不明瞭であり担当医によっては「渡航歴なし」とみなす可能性があること、第2にたとえ滞在中に感染していたとしても、過去に発症経験があり再発時に発見された可能性があること、の2点である。真陽性群100例中、発症前2年の間に流行地滞在の記載があったものは、腸炎と肝膿瘍をあわせて25例であった。本キットによる判定は、2例が判定不能、7例が陰性、16例が陽性であった。陽性と判定されたものも抗体価は低く、320倍以上を示したものは9例のみであった。一方、過去に血便等の既往があり2年以上の間隔をおいて再び症状が出現したものを再燃例とみなしたところ、真陽性100例中28例が該当した。短期間に再燃したものを除外した理由は、間欠期の詳細が不明確で、更にこの場合むしろ抗体価が低い傾向があったためである。無治療で軽快したのち症状が再度出現したという意味で再燃という用語を用いた訳で、無症状の間欠期に組織内侵入があったか否かは不明である。上記28例を本キットにて判定した結果は、陰性が2例、陽性が26例であった。そして、陽性と判定されたものは全て抗体価320倍以上であった。

これらの結果は全体として本キットを用いた場合、初発早期に偽陰性が出現することを示唆している。この事実を更に確認するため、ペア血清を用いて評価することを試みた。本キットで判定不能あるいは陰性と判定された血清で、かつペア血清が入手できたものが5例、これにフォローアップ中に再発した1例を加え、計6症例の結果をTable 4に示した。初回検査で判定不能であった1例は、再検時も同様であった。初回検査で陰性と判定された4例のうち3例はペア血清で陽性化し、残りの1例も陽性とは判定されないまでも凝集輪の拡大が観察された。初回検査時に低い抗体価を示し途中で再発をおこした1例は、予想通り抗体価の上昇が確認された。抗

体価上昇は再発9日目に確認され32日目まで、同じ抗体価が維持されていた。

## 考 察

本キットでは非感作血球の凝集がおこらないことを前提に判定を行っている。このため、キットによる判定の結果は、判定不能、陽性、陰性の3つの判断にわかれる。評価すべき第1点は判定不能の出現頻度である。Yamaura *et al.* (1990)の報告では、「40倍希釈血清で非感作血球が凝集しないことを確認した」と記載されている。今回の解析でも、健康人において判定不能は皆無であったが、抗トキソプラズマ抗体陽性血清およびアメーバ症患者血清の一部で判定不能となるものが出現した。この原因として、炎症による非特異的な影響が疑われるが、今回の主目的から外れるため詳細な解析は行っていない。第2の評価点は偽陽性の出現率である。この点に関して、Yamaura *et al.* (1990)は多くの検体を評価し、偽陽性は1%以下と評価している。今回の結果でも、健康人のみならず、抗トキソプラズマ抗体陽性血清およびアメーバ症患者血清においても偽陽性は皆無で、先の報告に一致する結果である。第3の評価点は偽陰性の出現頻度である。Yamaura *et al.* (1990)は偽陰性5%と報告したが、今回の結果では14%と、やや高い値が得られた。この理由は真陽性群が質的に異なるためと推定される。慢性のアメーバ症では偽陰性2.5%であったが、急性症状を呈する例では偽陰性は22%にも達した。そして、今回検討した限りではペア血清で陽転する事実も確認された。つまり、病日とともに抗体検出率が上昇するものと考えられる。Yamaura *et al.* (1990)の報告では患者の経過による区別が行われておらず、かつ大学病院の検体が対象で病日が経過したのことが多いと推定され、結果として偽陰性は少ないものと思われる。一方、

Table 4 Changes of HA titers utilizing pair sera, in acute or recrudescent amebiasis

case	date of examination	IHA titers	other data
liver abscess	0	N.A.	general fatigue, stool positive
	240	N.A.	GDP test converted to positive
colitis	0	(-)	stool positive
	?	*( $\pm$ )	GDP test converted to positive
colitis	0	(-)	appendicitis, multiple ulcer
14	$\times 640$		
liver abscess	0	(-)	fever (39°C), rale, GOT elevation
	14	$\times 160$	
liver abscess	0	(-)	rale, hypoxia, stool positive
	3	(-)	liver rupture, perforation of ileo-cecal lesion
	30	$\times 160$	
	90	$\times 160$	
liver abscess	0	$\times 160$	high-grade fever, abdominal pain
	30	$\times 160$	
	360	$\times 640$	recrudescence (fever, abscess enlargement)
	362	$\times 320$	
	369	$\times 2560$	
	376	$\times 2560$	
	392	$\times 2560$	

\* Judged as negative, although the ring enlarged after treatment

今回の対象は急性期に一般病院で採取された検体を多数含むため、偽陰性が多いものと考えられる。剖検例を対象とした場合には、偽陰性が更に増加する (Aikat *et al.*, 1979)。

本キットを用いる状況として3つの場面が想定される。第1の状況は症状が無い人の糞便から赤痢アメーバが検出され、組織内侵入の有無を確認したい場合である。こ

の場合に本キットの信頼性は高い。なぜなら、慢性のアメーバ症に対する鋭敏度は高く、かつ非病原株感染者は陰性と判定されるからである。第2の状況は慢性に経過した腸炎あるいは肝膿瘍の原因を探索する場合である。この場合にも本キットの信頼性は高い。なぜなら、慢性アメーバ症に対する鋭敏度は高く、アメーバ症以外の疾患における偽陽性も少ないからである。第3の状況は、

Table 5 Proposed applicability of the present HA test for serodiagnosis of amebiasis

judgement	suggested possibility	
positive	invasive amebiasis	→ detection of tissue parasites
negative	acute amebiasis	→ test of pair sera
	non-invasive amebiasis (cyst in stool)	→ zymodeme anlysis
Agglutination of unsensitized RBC	non-specific reaction	→ other serologic test for amebiasis

急性症状を呈する腸炎あるいは肝膿瘍の治療にあたって、アメーバ症か否かを確認したい場合である。この場合、ペア血清で判断するという前提なら、抗体価の上昇をもって赤痢アメーバ症と判定できる。逆に、初回の検査で判定することが前提なら、本法の鋭敏度はゲル内沈降反応にも劣る。アメーバ症急性期が疑われる場合には、本法で陰性と判定されても、場合によっては化学療法を開始する必要がある。そして治療後のペア血清で再確認すべきである。以上をまとめ、本キットを診断に用いる場合の考え方を Table 5 に示した。

一般に赤痢アメーバ症の診断において血清反応の占める割合は次第に高くなりつつある。たしかに内視鏡下生検によるアメーバ検出も広く普及してきたが、血清反応の簡便さには及ばない。アメーバ症の血清反応に用いられる術式としては既に多くのものが発表されてきており、それぞれが異なる特徴を有している。筆者らは通常、やむを得ない場合を除き、特性の異なる血清抗体検出法を2種類以上組み合わせで結論を出すようにしている。本キットは特異性が高く、陽性の判定は信頼性が高いが、陰性の判定は信頼性が低いという特性を持つ。これと、筆者らが試みているフェノール抽出抗原による ELISA (奥沢・竹内, 1992) 等を併用することによって、より正確な判定が可能となろう。フェノール抽出抗原を用いた系は急性アメーバ症に鋭敏に反応するため除外診断に適するが、同時に自覚症状が無い感染者にも反応するため積極診断には適さないという特性を有する (奥沢, 竹内, 1992)。

本キットは、迅速な判定、良好な再現性、そして積極診断に足る特異性が長所である。検査の迅速化、標準化が重視される我が国において、本キットの利用価値は高いと思われる。

#### 文 献

1) Aikat, B. K., Bhusnurmath, S. R., Pal,

A. K., Chhuttani, P. N. and Datta, D. V. (1979) : The pathology and pathogenesis of fatal hepatic amoebiasis—a study based on 79 autopsy cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73, 188–192.

- 2) Katzenstein, D., Rickerson, V. and Braude, A. (1982) : New Concept of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine*, 61, 237–246.
- 3) Nagakura, T., Tachibana, H., Kaneda, Y., Suzuki, H., Sasaoka, K., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1990) : Amebiasis in institution for the mentally retarded in Kanagawa Prefecture. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 43, 123–131.
- 4) Robinson, G. L. (1968) : The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 285–294.
- 5) Sargeant, P. G. and Williams, J. E. (1979) : Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73, 225–227.
- 6) Takeuchi, T., Matsuda, H., Okuzawa, E., Nozaki, T., Kobayashi, S. and Tanaka, H. (1988) : Application of a micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detection of anti-amebic antibody in various forms of amebic infection. *Jpn. J. Exp. Med.*, 58, 229–232.
- 7) Takeuchi, T., Okuzawa, E., Nozaki, T., Kobayashi, S., Mizokami, M., Minoshima,

- N., Yamamoto., M. and Isomura, S. (1989) : High Seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection. *J. Infect. Dis.*, 159, 808.
- 8) Yamaura, H., Shirasaka, R., Sato, J., Odagiri, Y., Iseki, M., Kimata, I., Maeno, Y., Nakamura, O. and Totani, T. (1990) : Application of the Indirect Hemagglutination Test Using Glutaraldehydefixed Chicken Red Blood Cells to Serologic Diagnosis of Amebiasis *Jpn. J. Parasitol.*, 39, 468-474.
- 9) 奥沢英一・竹内 勤 (1992) : アメーバ症の血清診断. *臨床検査*, 36, 480-485.
- 10) 高田季久・竹内 勤・大友弘士 (1990) : わが国の赤痢アメーバ症に関する疫学的調査. 厚生省新薬開発研究事業「熱帯病治療薬の開発研究」平成2年度報告書. 164-171.
- 11) 竹内 勤 (1990) : 赤痢アメーバ症. *臨床と微生物*, 17, 513-517.

[*Jpn. J. Parasitol.*, Vol. 42, No. 3, 227-233, June, 1993]

**Abstract**

**EVALUATION OF A COMMERCIAL KIT OF  
INDIRECT HAEMAGGLUTINATION TEST FOR  
SERO-DIAGNOSIS OF AMEBIASIS**

**EIICHI OKUZAWA, SEIKI KOBAYASHI AND TSUTOMU TAKEUCHI**

*Department of Tropical Medicine and Parasitology,  
Keio University School of Medicine, Tokyo 160, Japan*

A commercially available kit of indirect haemagglutination test for serodiagnosis of amebiasis was evaluated.

Its sensitivity and specificity against chronic cases seemed satisfactory. The kit was also judged useful to distinguish asymptomatic carriers from chronic invasive amebiasis. The positive reaction was reliable also in acute cases. But it should be noted that the negative reaction required examination on paired sera, because acute cases of amebiasis were sometimes judged negative.

This commercial kit seems to have a great value for laboratory diagnosis of amebiasis, because of rapid manipulation as well as good reproducibility and specificity.