

アメーバ赤痢

目次

- I. アメーバ赤痢の概説
- II. アメーバ赤痢検査に関する一般的注意事項
- III. 検査材料の採取・輸送及び保管
 - 1. 便
 - 2. 膿瘍液
 - 3. 病変組織・臓器
 - 4. 血清
 - 5. 検査材料の輸送上の注意
- IV. 検査の進め方
 - 1. 検査準備
 - 2. 検査結果の報告
- V. 形態学的（顕微鏡的）診断
 - 1. 直接塗抹法
 - 2. ホルマリンエーテル法
 - 3. 染色法
 - A. ヨード染色法
 - B. コーン染色変法
 - C. その他の染色法
- VI. 病原学的検査
 - 1. 病原体の検出
 - 2. ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR)
 - A. DNA の抽出
 - a. キットを使った抽出法
 - b. キットを用いない糞便からのDNA抽出法
 - c. DNA抽出・保存のためのシスト濃縮法
 - B. PCR
 - a. 29-kD システインリッチタンパク質遺伝子のPCR
 - b. リボゾーム小サブユニットrRNA 遺伝子のPCR
 - c. 種鑑別のためのPCRの実際
 - 3. 抗原捕捉法 (antigen capture ELISA)

A. E. histolytica II

B. Triage Micro Parasite Panel

VII. 血清学的検査

1. ゲル内沈降反応(gel diffusion precipitin test)
2. Dot ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)
3. 赤血球凝集試験(hemagglutination assay)
4. 間接蛍光抗体法(indirect immunofluorescence assay)
5. プレートELISA 法

VIII. アメーバ赤痢の診断基準

IX. 感染症法の中でのアメーバ赤痢の取り扱い

X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関

XI. 引用文献

I. アメーバ赤痢の概説

アメーバ赤痢は寄生性の原生動物である赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)の感染により引き起こされる。主に熱帯の開発途上国を中心に年間5000万人の感染者が存在し、年間の死亡数は約10万人と推定される(World Health Organization, 1995)。我が国では浸淫地からの輸入感染例だけでなく、主として男性同性愛者間(例えば(Takeuchi *et al.*, 1989))及び知的障害者施設(例えば(Kaneda *et al.*, 1988))において国内感染例が多く見られる(総説は(Nozaki, 2000)を参照のこと)。赤痢アメーバは通常栄養型(trophozoite)として大腸に寄生する。感染者の5-10%においてこれら栄養型が大腸上皮細胞を傷害し、赤痢様症状・腸穿孔を起こしたり、門脈を経て転移し、肝臓・肺・脳・皮膚など大腸以外の組織・臓器に膿瘍を形成し、重篤な症状を呈する。また、大腸内で、嚢子(シスト)化し、糞便中に排出され、これを別のヒトが経口摂取することにより、感染が成立する。ヒトの腸管に感染するその他のアメーバには大腸アメーバ、小型アメーバ、ヨードアメーバ、*Entamoeba dispar*などがあるが、このうち*Entamoeba dispar*は形態学的にも系統発生的にも赤痢アメーバと非常に近く、形態学的鑑別は不可能である。治療は通常メトロニダゾールの経口投与により行われるが、シストキャリアに対してはジロキサニドフロエイトが使用されるが、治療効果は低いとされる。前述の*E. dispar*はヒトに病原性を示さないため変異原性をもつメトロニダゾールを投与すべきではなく、下記に詳述する鑑別診断が重要である。

II. アメーバ赤痢の検査に関する一般的注意事項

赤痢アメーバの取り扱いはP2 実験施設でBSL2 の取り扱い基準に従う。したがってアメーバ赤痢患者又は疑わしい患者由来の検査材料並びに赤痢アメーバに汚染した可能性のある検査材料を取り扱う際にはレベル2 の施設を備えた検査室で行う。なお、アメーバ赤痢の感染集団の一部は男性同性愛者でありHIV、肝炎ウイルス、梅毒の感染が通常検査集団より高頻度に見られることに特に留意すべきである。

III. 検査材料の採取・輸送及び保管

1. 便

粘血便を伴うような症例の多くでは栄養型が見られる。ただし、赤血球を取り込み活発に運動する栄養型を検出するためには、糞便が排出された後1-2時間以内に鏡検する必要がある。更に以下に述べるようになるべく37°Cに近い状態で(37°Cを越えてはならない)輸送する必要がある。一度でも凍結・融解した糞

便中には栄養型は確認できない。糞便中のシストは4° Cでも数日間安定して保存できる。更に、シストは下記のホルマリンエーテル法にて1年以上の長期保存に耐える。糞便中の原虫の抗原並びに核酸の検出のためには採取された糞便を即時凍結し必要時まで-20° C 或いは-80° C の冷凍庫に保存するのが望ましい。この方法での赤痢アメーバ抗原並びに核酸の検出は、少なくとも数ヶ月は可能である。

2. 膿瘍液

まず、アメーバ性肝膿瘍は腸アメーバ症を伴わないことが多く、超音波やCT検査による膿瘍の部位並びに形態で示唆されることが多いことを留意すべきである。肝或いは肺膿瘍内容を超音波ガイド下での穿刺又はドレナージによって採取する。栄養型の証明は上記1. 便の場合と同様の注意が必要である。光学顕微鏡による原虫の検出率は半分程度であり効率の良い診断法とは言えない。

3. 病変組織・臓器

大腸内視鏡下の生検により得られた組織片は固定せず、生理食塩水に浸したガーゼの上に置き、-20° C で冷凍保存する(Sanuki et al., 1995)。外科手術の適応例、死亡例に関しては病変部を病理学的検査に供し、原虫を証明する。

4. 血清

血清診断に用いるサンプルは分離後4° C 或いは凍結する。

5. 検査材料の輸送上の注意

検査材料の輸送に際しては、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則（平成12年12月22日号外郵政省告示823号）第413条に規定する容器及び包装を用いた方法によらなければならない。

検査材料を凍結して輸送する場合、「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス(WHOガイダンス)」に従って扱うこと。特にドライアイスを密封容器内に梱包していないことを確認する。

IV. 検査の進め方

1. 検査準備

検査順序の概略は図1のとおりである。大きく分けて3つの検査法がある。形態学的（顕微鏡的）検査、病原学的検査、血清学的検査である。前2者は糞便並びに膿瘍液、感染組織検体を対象とし、原虫自体の存在を証明する方法である。一方、後者は感染者の血清を対象とし、感染者の赤痢アメーバ感染に対する免疫応答の結果を間接的に検出するものである。

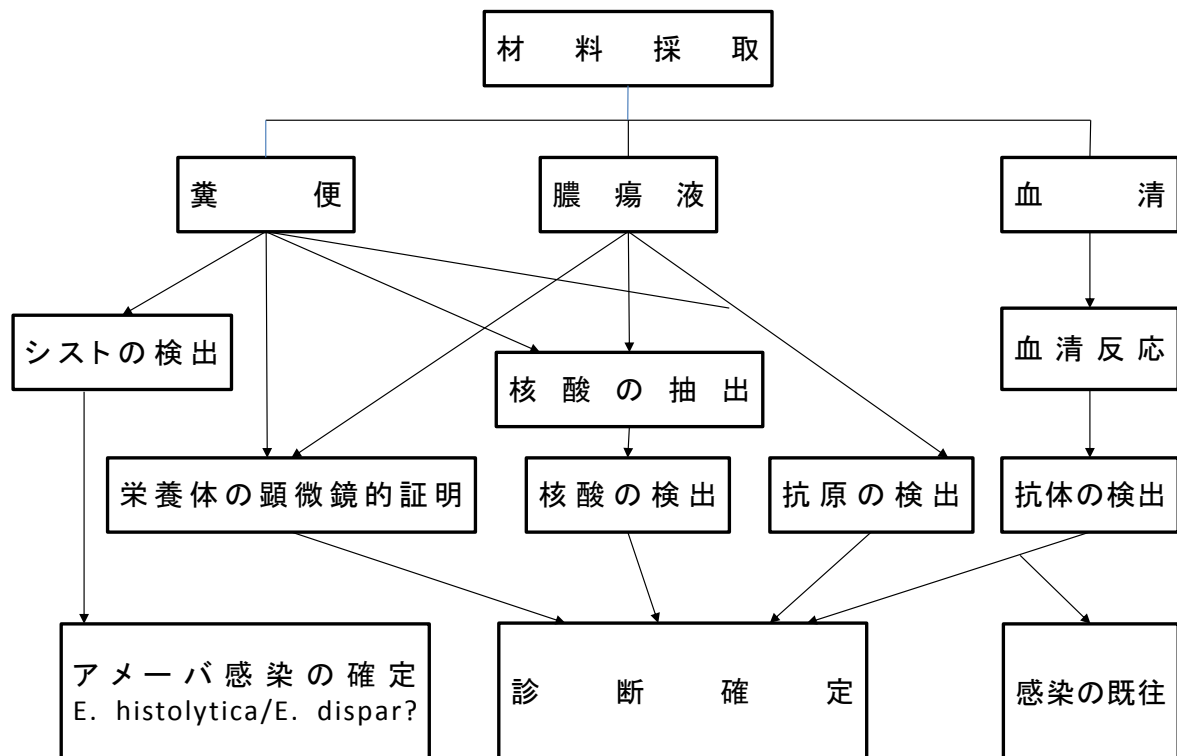


図 1 : アメーバ症の検査の順序

2. 検査結果の報告

検査結果については「アメーバ赤痢の診断基準（21-22頁）」の事項等に基づいて速やかに関係者等に報告する。

V. 形態学的（顕微鏡的）診断

糞便及び膿瘍液などの生鮮材料は迅速に鏡検しなくてはならない。検便による検査は場合によって1回の検査に留めず、連続3日間程度の集中検査で検出精度を高めることが推奨される。通常粘血便及び膿瘍液は直接塗抹法により観察する。一方、固形便はシストを含むことが多く遠心沈殿法で集卵・集嚢子した後に観察する。遠心沈殿法は他の原虫のシスト及び蠕虫の虫卵も集卵されるため汎用性が高い。組織学的染色が行える検査室では下記の染色法を併用しても良い。以下、小林らの論文（小林正規, 1994）を改変し、転載する。

1. 直接塗抹法

生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) 1 滴をスライドガラス上におき、少量の便を楊枝でとってよく混ぜ、カバーグラスをかけて鏡検する。膿瘍液はそのまま観察する。通常赤血球を貪食し、偽足を伸ばして活発に運動する栄養型が見られる。

2. 遠心沈殿法 (変法) ^{注1}

- ① 糞便検体を少量 (≤ 1 g) スピッツ管に取る。
- ② ホルマリン水を 1 ml 加えて竹串で糞便塊を充分ほぐす。
- ③ 全量が 5 ml となるようにホルマリン水を加え、ボルテックスミキサーで充分攪拌する。
- ④ 攪拌後、室温に 20 分間以上放置して固定する。
- ⑤ 再度、よく攪拌してからロートに 4 枚重ねのガーゼを敷き、試料液をろ過する。
- ⑥ ホルマリン水でガーゼ上のろ過残渣を軽く洗浄し、全量で 8 ml のろ液をスピッツ管に回収する。
- ⑦ ろ液に 2 ml の酢酸エチルを加え、密栓をして短時間激しく振盪・混和する。
- ⑧ 速やかに $1,050 \times g$ (通常の卓上遠心機で $2,500 \sim 3,000$ rpm 程度に相当)、5 分間遠心する。
- ⑨ 液層は上から酢酸エチル層、浮遊糞便層、希釈液層、沈渣の 4 液層に分離する。
- ⑩ 予め浮遊糞便層を竹串等で管壁から離し、上部の 3 液層を捨て、沈渣を回収する。さらに、スピッツ管内壁の付着物を綿棒で拭き取る。
- ⑪ 得られた沈渣を直接顕微鏡観察 (400 倍以上の倍率)、又は密度勾配遠心法等の試料に供する。

注1: 本変法では、1) バイオハザードの観点から、生理食塩水での洗浄工程を省略している。また、2) エチルエーテルに替えて、引火性の低い酢酸エチルを用いている。

3. 染色法

A. ヨード染色法

赤痢アメーバのもつグリコーゲンを確認するためにヨード染色法を用いても良い。

・染色液 (ヨード・ヨードカリ液)

ヨウ素 1g

ヨウ化カリウム 2g

蒸留水 50ml

ヨウ化カリウムを完全に溶解させた後、ヨウ素を加えて溶かす。蒸留水を100ml とする方法もあるが、染まり具合を見て薄めるほうがよい。暗褐色瓶に密栓して冷暗所に保存し、これを保存液とし使用時に少量滴瓶に移して使用する。

ヨウ素は上記の方法によっても完全には溶けず少量の結晶が沈澱する。このヨウ素の結晶が認められる間は使用可能である。しかし少なくとも2-3 ヶ月で作りかえるのがよい。

方法:生理食塩水を混和した糞便、或いは直接糞便に上記のヨード・ヨードカリ液を1滴加え楊枝又はカバーガラスの角でよくかき混ぜた後、カバーガラスをかけて鏡検する。赤痢アメーバ栄養型と白血球とは粘血便などでは双方見誤りやすいので注意を要する。

B. コーン染色変法

糞便中のアメーバ類の嚢子及び栄養型の固定法は湿潤固定とするのが原則となっている。このため固定が速やかで糞便材料を塗抹したガラス面へ吸着させる力の強いSchaudinn液が従来用いられていた。しかし、昇汞(塩化第二水銀)の廃液処理の問題から、現在はアルコールを主成分とする固定液を用い固定と染色を同時に行うコーン染色法が推奨されるようになってきている。糞便が適度に軟便で原虫数が多数存在する場合はコーン染色液の固定力で問題となることはないが、下痢便では染色中に原虫嚢子や栄養型が塗抹されたガラス面からかなりの数が剥がれ落ちることに留意しなければならない。染色液は以下の通り。

・基本液

90% エタノール 170ml

100% メタノール 160ml

酢酸 20ml

液状石炭酸 20ml

1% リンタングステン酸 12ml

蒸留水 618ml (合計1,000ml)

・クロラゾール・ブラックE 溶液

クロラゾール・ブラックE 粉末 5g

基本液 1,000ml

クロラゾール・ブラックE 粉末は乳鉢で磨砕した後、少量の基本液を加えペースト状になるまで磨砕する。更に基本液を加え磨砕し、数分間静置して不溶粉末が沈澱した後に得られた溶液部分を回収する。更に、不溶粉末に基本液を加え磨砕し、静置、溶液部分を回収するという操作を繰り返し、完全にクロラゾール・ブラックE 粉末を溶解させる。4-6 週間室温で色素溶液を熟成させる。

方法

便材料を直接塗抹してもよいが、ここではカバーガラスに塗抹する方法を記す。楊枝でカバーガラスに糞便材料を薄く引き伸ばす(下痢便の場合は糞便が垂れない程度にまで便液を濾紙で吸い取る)。

① 固定、染色。

カバーガラスの塗抹面を下に向けシャーレに入れた染色液面と平行になるように親指と人差し指で保ち、液面に近づけ静かに指を離し染色液面に浮かせる。糞便材料をカバーガラスによく固定、吸着させるため2分程度表面張力により浮かせた後、ピンセットで塗抹面を上向きに修正し染色液中に沈める。そのまま浮かせて染色してもよい。

② 染色時間。

2-4 時間が染色時間の目安となるが、嚢子と栄養型では染色時間が異なる。栄養型では過染する傾向があるので、基本液で染色液を希釈したり、或いは染色時間を短縮することで調節する。

③ 脱色・脱水・透徹。

カバーガラスの角を濾紙に接触させ、余分な染色液を吸い取った後、95% エタノールの入ったシャーレに塗抹面を上にして沈める。10-15 秒浸し脱色することで通常分別が完了する。100% エタノールに移し脱水を行う。この時点で鏡検し染色具合を観察する。この操作でも分別ができないものは染色液の濃度或いは染色時間を調節する。分別が良好であれば、100% エタノールの入ったシャーレに5 分ずつ2 回通過させ脱水した後、キシレンに5 分ずつ2 回、同様に通し封入剤で封入する。

C. その他の染色法

詳細は示さないが4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)又はpropidium iodide (PI)での簡便な染色法もある(Kawamoto *et al.*, 1987)。観察には蛍光顕微鏡が必要である。

VI. 病原学的検査

1. 病原体の検出

検便による検査は場合によって1 回の検査に留めず、連続3 日間程度の集中検査で検出精度を高めることが推奨される。更に、膿瘍液及び糞便中の栄養型の培養により原虫数を高め、その後上記の形態学的検査、アイソエンザイム解析及び下記のいずれかの方法で赤痢アメーバの存在を確認することも可能である

が、培養、アイソエンザイム解析は一般の検査室では通常不可能である。赤痢アメーバの分離同定及び培養(Kobayashi and Takeuchi, 1983)を専門としている研究機関(慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室、電話03-3353-1211)に相談されたい。培養は通常Robinson培地で行うが、詳細については省略する。

2. ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)

患者から採取した糞便、膿瘍液又は組織からDNAを分離・抽出し、このDNAを鋳型として、赤痢アメーバ特異的プライマーを用いてPCRを行う。感度は上記の形態学的同定法よりもずっと高く、下記の抗原捕捉法と同等或いはやや良好な感度が得られる。

A. DNAの抽出

a. 最も簡便で再現性の高い方法は市販されているDNA抽出キットを用いる方法である。キアゲン社(電話03-5547-0811; techservice@jp.qiagen.com, www.qiagen.com)のQIAamp DNA stool mini kit(カタログ番号51504)は糞便検体からのDNA抽出時に良い成績を生む。その他生体材料からのDNA抽出にはキアゲン社のQIAamp DNA mini kitや相当品が使用できる。また、以下の方法でも抽出は可能である。

b. キットを用いない糞便からのDNA抽出法(Sanuki *et al.*, 1997)

- ① ホルマリンエーテル法で1g見当のサンプルを処理し、900xgで3分遠沈回収する。
- ② ペレットに1mlのリン酸緩衝液(PBS)を入れ、遠沈で4回沈渣を洗う。
- ③ 凍結融解を3回繰り返した後、1%Triton X-100を200 μ l加え、90°Cで10分インキュベートする。
- ④ これに10mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 0.5% NaSarcosinate, 0.5mg proteinase Kを200 μ lを加え、60°Cで2時間インキュベートする。
- ⑤ 等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)混合液を入れ、攪拌後、遠沈し、上清を5 μ gグリコーゲンとともにエタノール沈殿する。上清を除いた後適当量のTEでペレットを溶解する。

c. DNA抽出・保存のためのシスト濃縮法

シストが確認された糞便検体量に余裕があれば以下の方法にてシストを回収し、DNA抽出・保存することができる。すなわち、糞便からの寄生虫卵などの簡易濃縮キット(VERITAS, Parasep; EVERGREEN, FECAL PARASITE CONCENTRATOR)に含まれる遠心チューブに、糞便約1g(小指頭大)と蒸留水を適量加えボルテックスミキサーで十分攪拌後に遠心ろ過する。この操作で糞便中の夾雑物がキットの

メッシュで除去され、シストは沈澱物中に回収される。沈澱物に少量のPBSを加え使い捨てピペットを用いてピペッティングしその0.5~1mlを15mlの目盛りつきプラスチック製遠沈管に入れ、さらに比重1.2のショ糖溶液を10mlまで加えピペッティングする。キャップを外し、遠沈管を少し傾けて蒸留水を13目盛り程度まで使い捨てピペットを用いてゆっくりと重層する（ショ糖層に直接蒸留水を滴下すると界面層が乱れるので、ピペット先端を管壁につけて蒸留水が管壁をつたってショ糖層に流れるようにする）。2000回転10分間遠心するとシストなど寄生虫卵を含む層がショ糖層と水層の境界にできるので、水層を吸引しながらその層を回収し蒸留水を入れた別の15ml遠沈管に入れる。攪拌後に2500回転10分間遠心し、沈澱物を1.5mlのエッペンチューブに採取して再度蒸留水で遠心洗浄後、2.5%重クロム酸カリウム液などの保存液中で冷蔵保存する。シストとして保存しておくことで、後日迅速に形態観察を行うことが可能であり、またDNAを再分離する上でも都合が良い。

B. PCR

現在市販されているTaqポリメラーゼは原則としてどれも使用可能であると思われる。酵素に付属する標準的な緩衝液、標準的Mg²⁺イオン（1-2.5mM）及びdNTP濃度（0.1-0.5mM）で推奨される条件で増幅を行えば問題ない。ただし、陽性コントロール（培養された原虫から得られたDNA）及び陰性コントロール（ヒト或いは大腸菌のDNAなど）を必ず併せて使用しなくてはならない。クロスコンタミネーションによる偽陽性を避けるためにすべての試薬を小分けにして保存する、エアロゾルフリーのピペットチップを用いるなどの注意は通常のPCRと同様であることは言うまでもない。様々な種類の赤痢アメーバ特異的プライマーが存在する。29-kD システインリッチタンパク質（ペルオキシレドキシシン）或いはリボゾーム小サブユニットrRNA 遺伝子を標的とした方法が一般的である。

a. 29-kD システインリッチタンパク質遺伝子のPCR (Tachibana *et al.*, 1991)

使用するプライマーは以下のとおりである。P11/P12 は赤痢アメーバのDNA を特異的に増幅し、P13/P14 は近縁種*E. dispar* のDNA（いずれも約100bp）を特異的に増幅する。

P11, 5' GGAGGAGTAGGAAAGTTGAC 3'

P12, 5' TTCTTGCAATTCCTGCTTCGA 3'

P13, 5' AGGAGGAGTAGGAAAATTAGG 3'

P14, 5' TTCTTGAAACTCCTGTTTCTAC 3'

PCR は通常0.1 μ g の精製DNA を用い、以下の条件で行う。

(1) denaturation 94° C 30 sec

- (2) annealing 45° C 30 sec
- (3) elongation 72° C 1 min
- (4) 35 cycles

b. リボゾーム小サブユニットrRNA 遺伝子のPCR (Haque *et al.*, 1998)

E1, E2 を一回目のPCR にE3, E4 を2 回目のPCR に使用してnested PCR を行う。使用するプライマーは以下のとおりである。E1/E2 は赤痢アメーバ、*E. dispar* 両者のDNA を増幅し、2 回目のPCR でEH1/EH2 が赤痢アメーバDNA を、ED1/ED2が *E. dispar* のDNA を特異的に増幅する。いずれも約0.9kbp の断片が得られる。更にDraI とSau96I とで消化すると赤痢アメーバでは0.5 と0.35kbp の断片が、*E. dispar* では0.55、0.2、0.15kbp の断片が確認される。

E1, 5' TTTGTATTAGTACAAA 3'

E2, 5' GTA(A/G)TATTGATATACT 3'

EH1, 5' AATGGCCAATTCATTCAATG 3' (赤痢アメーバ用E3)

EH2, 5' TTTAGAAACAATGCTTCTCT 3' (赤痢アメーバ用E4)

ED1, 5' AGTGGCCAATTTATGTAAGT 3' (*E. dispar* 用E3)

ED2, 5' TTTAGAAACAATGTTTCTTC 3' (*E. dispar* 用E4)

PCR は通常0.1 μg の精製DNA を用い、以下の条件で行う。

- (1) denaturation 94° C 30 sec
- (2) annealing 43° C (first cycle) 62° C (second cycle) 30 sec
- (3) elongation 72° C 1 min
- (4) 35 cycles

以上の方法で糞便(Haque *et al.*, 1998; Sanuki *et al.*, 1997)、肝膿瘍液 (Tachibana *et al.*, 1992)、生検試料(Sanuki *et al.*, 1995)からの赤痢アメーバDNA の検出が可能である。

c. 種鑑別のためのPCRの実際 (SSUrDNAをターゲットとしたPCR法、Hamzah *et al.*, 2006))

*E. histolytica*と*E. dispar*を鑑別するPCRでは、SSUrDNA (小亜粒子リボソームRNA遺伝子)、29-kD システインリッチタンパク質、actin、cysteine proteinase 遺伝子などをターゲットにしたプライマーが用いられている (上記参照、Fotedar *et al.*, 2007)。ここではHamzahらが報告したSSUrDNAを増幅させるPCRプライマーを用いた実験例を示す。反応条件を表1に示した (Hamzah *et al.*, 2006)。forward プライマーEntaFは*E. histolytica*、*E. dispar*に共通で、さらにバングラディッシュ、オーストラリア、トルコなどでヒト寄生例がある*E. moshkovskii*

にも共通である。*E. moshkovskii*は自由生活性のアメーバで、そのシストの形態は*E. histolytica*、*E. dispar*と区別できない。日本国内での*E. moshkovskii*の感染実態は不明であるが、流行地からの帰国者や旅行者などから検出されることも予想されるため、*E. moshkovskii*を念頭においた検査も必要である。Reverseプライマーは各種に特異的であり、*E. histolytica*では166-bp（表1、図2）、*E. dispar*では752-bp（表1、図2）、*E. moshkovskii*では580-bpの産物が増幅される（表1）。反応サイクル数は35回で行う。DNA polymeraseはTaKaRa Ex Taq Hot Start Version (HS)を使用し、PCR BufferとdNTPは同Taqに添付されているものを使用する（表2）。電気泳動ではTAE（Tris-acetate、EDTA、50×濃度のものが市販されているのでその希釈使用が便利である）をバッファーとし、そのバッファーで作製したゲルを用いる（図2の泳動像は3%ゲル濃度）。各特異的プライマーにより*E. histolytica*、*E. dispar*DNAが特異的に増幅されていること、赤痢アメーバ臨床検体では*E. histolytica*特異的プライマーでのみバンドが検出されることが確認できる（図2）。

表1 Entamoeba種鑑別に用いられるPCRプライマーとその反応条件

遺伝子領域	種	プライマーの名称	プライマーのシーケンス	増幅産物のサイズ(bp)	サイクル反応
SSUrDNA		EntaF (forward)	5'-ATG CAC GAG AGC GAA AGC AT-3'		95°C5分, 94°C30秒→58°C30秒→72°C1分 を35サイクル, 72°C7分
	<i>E. histolytica</i>	EhR (reverse)	5'-GAT CTA GAA ACA ATG CTT CTC T-3'	166-bp	
	<i>E. dispar</i>	EdR (reverse)	5'-CAC CAC TTA CTA TCC CTA CC-3'	752-bp	
	<i>E. moshkovskii</i>	EmR (reverse)	5'-TGA CCG GAG CCA GAG ACA T-3'	580-bp	

文献 Hamzah et al., 2006.

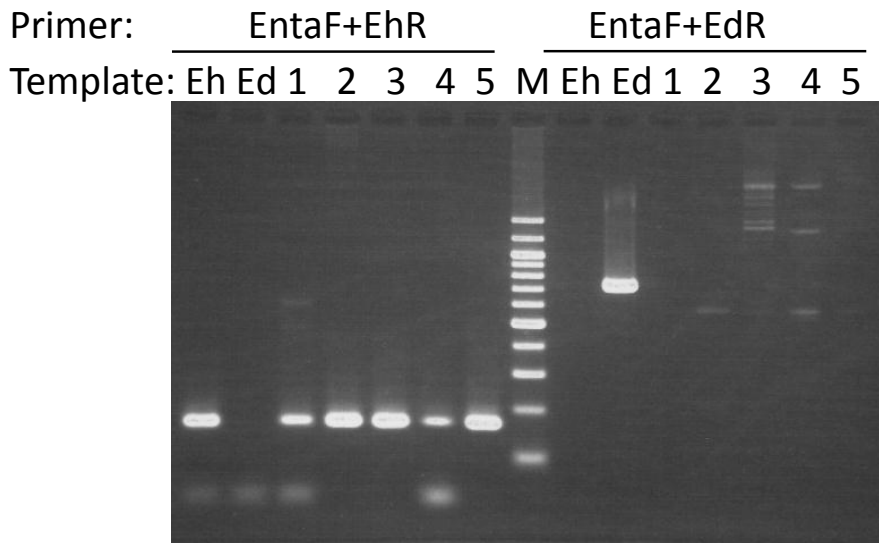


図2 : *E. histolytica*と*E. dispar*を鑑別するSSUrDNAをターゲットとしたPCRの電気泳動像。

*E. histolytica*特異的reverseプライマーEhRまたは*E. dispar*特異的reverseプライマーEdRを各々共通forwardプライマーEntaFと組み合わせて行ったPCRの泳動像。Eh, *E. histolytica* DNA ; Ed, *E. dispar* DNA ; 1~3, アメーバ赤痢患者由来株DNA ; 4~5, シストキャリアー由来株DNA ; M, サイズマーカー (100-bpラダー) 。ゲル濃度3%。

表2 PCR反応液の調整

	First PCR
精製水	28.75 μ l
10XEx Taq Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ l
Forward primer (5 μ M)	5 μ l
Reverse primer (5 μ M)	5 μ l
Template	2 μ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.25 μ l
反応液総量	50 μ l

d. *E. histolytica* 遺伝子型別のための PCR

日本での赤痢アメーバ症は輸入症例のみならず国内感染例も半数以上存在し、特に知的障害者施設などでの集団感染が深刻な問題である。最近では施設間や施設内での伝播の解明に分離株の遺伝子型別が試みられており、SREHP (セリンリッチ *E. histolytica* タンパク質)、chitinase、Locus 1-2、Locus 5-6、tRNA コード領域などの多型遺伝子座を用いた *E. histolytica* の遺伝子型別が行われている (Haghighi et al., 2002; 野崎 et al., 2003; Ali et al., 2007; Fu et al., 2010)。ここでは詳細は省略するが、遺伝子型別により疫学調査が可能となり、さらに病原性と関連する遺伝子型の発見が期待される。

3. 抗原捕捉法 (antigen capture ELISA)

糞便並びに膿瘍中の赤痢アメーバ抗原を検出するサンドイッチELISA 法があり、既にいくつかのキットが販売されている

A. *E. histolytica* II (TECHLAB, Blacksburg, Virginia, USA, 国内代理店 関東化学、03-3279-1751、info@gms.kanto.co.jp)

E. histolytica II のキットはサンドイッチELISA (酵素抗体法) の原理に基づき、マイクロタイタープレートに固着させた赤痢アメーバ・*E. dispar* の細胞表面レクチン (adhesin 又はガラクトース・N アセチルガラクトサミン阻害レクチン) 抗原の共通エピトープに反応する特異的ポリクローナル抗体と、検体中に存在するアメーバのadhesin をまず結合させる。次に赤痢アメーバadhesin 特異的モノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識したものを反応させ、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定する。結果判定までには約2.5時間必要である。

B. Triage Micro Parasite Panel (Biosite Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA.; 国際試薬, 神戸)

Triage Micro Parasite Panel キットは *E. histolytica* II キットと同様に、サンドイッチELISA の原理に基づいている。A のキットとの相違点は特異抗体をELISA 用のマイクロタイタープレートのウエルに固着させるかわりに、ニトロセルロース膜を用いていること。膜に固定されている抗体とアルカリフォスファターゼ (酵素) 標識した抗体が同一であること。判定が肉眼に依るため定性的であること。赤痢アメーバと *E. dispar* の共通抗原を認識するため両者の鑑別が不可能であることである。このキットの大きな利点は1 検体につき1 つのパネルを使用するため無駄がないことである。また、15-20 分と短時間で結果がでる。更に、膜の特定の位置に抗体を固着させることが可能なため、赤痢アメーバ以外に下痢症の病原体として重要なランブル鞭毛虫やクリプトスポリジウムの特異抗体も

同一パネルの膜上に固着させることができ、これらの原虫の抗原を同時に検出でき汎用性が広いなど、利点が多い。更に、同一パネルに抗原と抗体をあらかじめ結合させ、固着した陽性コントロール、及び抗体を作製した同種動物の非免疫血清の陰性コントロールが設けてあり、これらとの反応を同じ反応条件下でチェックすることで使用したキットの信頼性も同時に1 検体ごとに確認することができる。一方、欠点としては赤痢アメーバと*E. dispar* の区別ができないこと、アメーバのシストとは反応しないことなどがあげられる。

VII. 血清学的検査

血清抗体の検出は、現在或いは過去のある時点での赤痢アメーバによる組織侵入に対するヒトの免疫応答を検出することを目的とする。したがって、すべての血清反応に共通した特徴であるが、しばしば感染の時期を特定化できない。したがって、陽性反応が現在の感染によるものか過去の感染によるものかの厳密な鑑別は不可能である。また、下記の赤血球凝集試験にみられるように、慢性期のアメーバ赤痢では比較的血清抗体価が高く、検出率が高いのに対して、急性期のアメーバ赤痢においてはいくらかの偽陰性がみられる。したがって、上記の病原学的診断、特にPCR及び抗原検出法による積極診断を併用することが強く推奨される。なお、血清反応を行う際には陽性コントロール(陽性血清)並びに陰性コントロールの入手が不可欠である。入手先は下記X を参照されたい。

1. ゲル内沈降反応(gel diffusion precipitin test)

赤痢アメーバ虫体、粗抽出液、或いはその凍結乾燥したものが入手できれば、最も安価で簡便な方法である。アガロースゲルの中で特異的抗原抗体反応をさせ、沈降線を検出する。アガロースゲルは数ヶ月の保存に耐える。沈降線を形成後にゲルを染色し乾燥させた状態で結果を長期保存できる。一般的な方法を示す(荒木国興, 1991)。試料の量等によって様々な変法が可能である。

• Ouchterlony 法

pH8.6 のベロナール(バルビタール)緩衝液に1% アガロースを加えて水浴上で加熱溶解させてから7.6×2.6 cm 大のスライドグラス上に3ml 相当量のゼラチン板を作る。スクリーニングの段階では、直径6 mmの血清孔と直径2 mmの抗原孔を3 mm 間隔であけ、それぞれに患者の血清と6 mg/ml タンパク質量の赤痢アメーバ粗抽出抗原を5 μ l 入れる。ゼラチン板を湿润状態の箱に入れ、室温で12-24 時間、4-6 $^{\circ}$ C で24-48 時間静置した後に判定する。また、生理食塩水で3 日間洗浄した後、濾紙で包んで乾燥しアミドブラック10Bで染色、2%酢酸で脱色、自然乾燥すると沈降線が青く染まり判定が容易になる(荒木国興, 1991)。赤痢アメーバの粗抽出

液を更に、フェノール抽出により分けられたタンパク質分画並びに除タンパク質した多糖・核酸分画を用いてOuchterlony法を行うことも可能であるが、一般で用いられるのに必要な標準化が行われていない（奥沢英一, 1992）。

2. Dot ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)

原理は酵素抗体法(ELISA)に準ずるが、抗原をニトロセルロース膜に固着させる点がマイクロプレートのウェル内で反応させるELISAと異なる。この方法の利点は、ニトロセルロース膜に固着させた抗原が長期(冷蔵保存;4-10°Cで約2年)にわたり安定して保存できること、また判定は呈色の有無を肉眼的に判定するため、簡便で定性的な抗体のスクリーニングに適していること、などである。現在、国内ではDot ELISAのキット製品を扱っている業者はみられないが、その最適な反応条件についての詳細はすでに検討・報告されており(天野優子, 1998)、赤痢アメーバの抗原についても、下記(X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関)から分与が可能であることから、抗原を入手し自前でアメーバ赤痢診断のためのDot ELISAのシステムを作ることは可能である。以下に一般的な方法を示す(天野優子, 1998より改変、荒木国興、小林正規、論文未発表)。

方法

i. Dot-ELISA 法ニトロセルロース膜への吸着

寄生虫に感染していない人の500倍希釈血清0.5 μ l及び赤痢アメーバ粗抗原1 μ g量(2mg/mlに調製した抗原液0.5 μ l)をニトロセルロース膜に吸着させてから37°Cで30分間乾燥させる。

ii. 膜のブロック

ELISA法で使用している血清希釈液(BSA/T、下記の「プレートELISA法」の項を参照)に30分浸してから室温で乾燥しないように蓋付きの容器に入れ使用時まで冷蔵庫内で保管する。1週間以上の長期保存には乾燥しないようにプラスチックラップに包むか、チャック付きのプラスチック袋に入れて冷凍する。凍結した場合、最低2-3年間は使用可能。

iii. 一次反応(患者血清との反応)

パラフィルムを紙と一緒に40mm \times 25mm程の大きさに切り、四辺を5mm程折り畳んでから紙を取り除き、四隅をつまむようにして箱船のような形にする。このパラフィルムを湿潤箱に入れ、パラフィルムの上に血清希釈液で湿らせてから水切りしたニトロセルロース膜を置く。膜の上に200倍に希釈した患者血清を70 μ lのせた後、湿潤箱の蓋をして37°Cで40分間反応させる。

iv. 洗浄

パラフィルムの一部をピンセットでつかみ、スポイト或いは洗浄ビンを用いて洗浄液の入っている容器内で3回洗浄する。

- v. 二次反応(POD 標識抗ヒトIgG との反応)水切りをした膜上に血清希釈液で750倍に希釈したPOD 標識抗ヒトIgG 抗体 (CAPPEL, CodeNo. 55221)を70 μ l 載せ
iii.と同様に37° C で40 分間反応させる。

vi. 洗浄

iv. 上と同様に洗浄する。

vii. 発色

水切り後ニトロセルロース膜を4-クロロ-1-ナフトール液に7分間浸す。枚数が多いときはニトロセルロース膜を容器の底に並べ、発色液を加える方が簡単である。適当な発色がえられたら、発色液を捨て、素早く蒸留水を加え軽く揺すってから反応を停止する。再度蒸留水を加え、4-5分放置してから取り出し室温で乾燥させて保存する。ある程度の期間は冷蔵庫内で保管できるが、多少脱色するので写真結果を記録しておく方がよい。

・発色液

4-クロロ-1-ナフトール30mg

エタノール12ml

リン酸緩衝液(pH7.4) 63ml

30% 過酸化水素37.5 μ l

注意 4-クロロ-1-ナフトールをエタノールで完全に溶かしてからリン酸緩衝液を加える。

3. 赤血球凝集試験(hemagglutination assay)

数年前まで協和薬品工業より赤痢アメーバHA というキットが発売されていたが、平成13年11月現在は発売されていない。特異性は優れているものの、急性期の腸並びに肝赤痢アメーバ症において偽陰性が多く(20% (Okuzawa et al., 1993))、緊急の確定診断が不可欠な急性赤痢アメーバ症においてゲル内沈降反応に劣るのが致命的欠陥と考えられる。しかしながら、陽性と判定されれば誤りの可能性は低い。

4. 間接蛍光抗体法(indirect immunofluorescence assay)

固定した虫体を抗原として患者血清中のIgG と反応させた後、蛍光ラベルした2次抗体で反応させ蛍光を観察する方法である。

・アメーバスポットIF(日本ビオメリュー・バイテック)

現在唯一国内で診断用として認可され使用されているキットである。原理は間接蛍光抗体法(IFA)に基づいている。方法は無蛍光スライドガラスの10カ所の

サークル内に無菌培養した赤痢アメーバ栄養型を固定・吸着させたものを抗原（主として膜抗原）とし、これらと段階的に希釈した赤痢アメーバに感染した患者血清を個々のサークル内でまず反応させる。次に蛍光色素で標識した抗免疫グロブリン血清（2次抗体）と反応させ、蛍光顕微鏡下で赤痢アメーバ細胞に反応した抗体の蛍光を観察する。これによって、抗赤痢アメーバ抗体を定量的に検出する。

5. プレートELISA 法

96 穴プレートに固相化した粗抽出抗原、或いは精製した抗原に対する患者血清中の抗体の反応性を見る検査である。商業レベルの検査キットは存在せず、試薬の調製、検査手技ともに煩雑である。念のため方法を示す。

方法

i. 抗原の吸着

赤痢アメーバ粗抽出抗原液を2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように炭酸緩衝液で希釈し、ポリスチレンプレートに100 μl ずつ入れ、湿潤箱に移して37° C で2時間吸着させる。プレートを洗浄液で3回洗浄し、ペーパータオルで水切りした後、蓋をかぶせてからビニール袋に入れ、使用時までフリーザーに保管する。

ii. 一次反応

血清希釈液（PBS/T）で1:200に希釈した血清を100 μl 加え、湿潤箱に移して37° C で40分間反応させる。反応終了後、洗浄液で3回洗浄後、ペーパータオルで水切りする。

iii. 二次反応

POD 標識抗ヒトIgG ウサギ血清（CAPPEL, CodeNo. 55221）希釈液で

1:8,000-1:10,000に希釈し、100 μl ずつ入れ37° C で35分間反応させる。終了後、洗浄液で3回洗浄し、ペーパータオルで水切りする。標識抗体は製造者血清の動物種（ウサギ、ヤギ）により反応の強さが異なるので予備実験が必要である。

iv. 基質液を100 μl ずつ入れ、室温で発色状態を観察する。7分後に1.25% フッ化ナトリウムを加えて反応を停止する。波長414nmで吸光度(OD)を測定する。

ELISA 用試薬

- 炭酸緩衝液 (抗原希釈液)
 - 1M 炭酸水素ナトリウム液 43.3ml (4.2g/50ml)
 - 1M 炭酸ナトリウム液 6.7ml (5.3g/50ml)
 - アジ化ナトリウム 0.2g
 - 蒸留水 950ml
- 洗浄液 (PBS/T)
 - 塩化ナトリウム 68g
 - 0.15M リン酸二ナトリウム液 1500ml (21.3g/1000ml)
 - 0.15M リン酸一カリウム液 500ml (10.2g/500ml)
 - Tween20 5ml
 - 蒸留水 8500ml
- 血清希釈液 (BSA/T)
 - BSA (SIGMA, FractionV) 1g
 - PBS/T 100ml
- 基質
 - 0.1M リン酸二ナトリウム液 25ml
 - 0.1M クエン酸液 25ml
 - ABTS 15mg
 - 30% 過酸化水素 5 μ l

VIII. アメーバ赤痢感染の診断基準

言うまでもなく病原体自身或いは病原体由来のDNA、抗原の証明が最も推奨される診断基準となる。赤血球を貪食した栄養型の証明がアメーバ赤痢診断の” Gold standard” と一般に言われるが、便中の白血球、便中の植物・孢子などの誤認も多く見られるため、顕微鏡による証明は一般に考えられているほど確実とは言えない。発展途上国における糞便検査、培養並びにアイソエンザイム解析、PCR、抗原検出の検査成績の比較でも (Haque *et al.*, 1998; Haque *et al.*, 1997)、顕微鏡的にアメーバ赤痢と診断された (すなわち「赤血球を貪食した栄養型が確認された」と報告された) 検体の僅か40%が、培養などの病原学的診断により真の赤痢アメーバによる感染と確認されるにとどまっていることから、

形態学的同定の難しさが理解されよう。アイソエンザイム解析、PCR、抗原検出の検査成績はお互いに良く相関し、特に後の2者は93%もの相関を示す。したがって、一般検査室レベルではどちらを用いても良いと考えられる。価格は再検討の余地があるものの、検査技術の簡便さ、迅速さにおいては抗原検出が優れている。平成13年11月現在少なくとも抗原検出キット(E. histolytica II)は国内に在庫もあり、一般検査室レベルで最も使いやすいと考えられる。しかしながら、現在は名目上、研究目的のみに使用が制限されていることを指摘しておく必要がある。

一方、病原体自身或いはDNA、抗原の証明が不可能な場合、血清反応により現在の感染を推定することも可能である。この場合、臨床学的診断法（粘血便など理学的所見、画像診断、内視鏡などの所見を含む）と併せて総合的に診断する必要がある、往々にして、メトロニダゾール投与による症状の改善により間接的にアメーバ赤痢と診断される場合もある。血清反応は一般に平易であり、アメーバスポットIFはキットで購入可能である。また、ゲル内沈降反応、Dot ELISAはキットとして購入することができないが、一般検査室でも作製及び長期保存が可能である。しかしながら、前述のとおり、血清反応の陽性反応は現在或いは過去の感染を示すものであるため、除外診断には有効であるが（例えば慢性の腸炎の原因からアメーバ赤痢を除外するなど）、病原学的診断法を併用して積極的な診断を目指す必要がある。

IX. 感染症法の中でのアメーバ赤痢の取り扱い

アメーバ赤痢は5類感染症に定められており、全数把握のため診断した医師は7日以内に保健所に届け出る必要がある。報告のための基準を以下に示す。診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清診断がなされたもの。

1. 病原体の検出

例：

糞便からの赤痢アメーバ栄養体または嚢子の顕微鏡による検出
病原部位（肝膿瘍吸引液、組織切片など）からの本原虫の検出

2. 病原体の遺伝子或いは抗原の検出

例：

赤痢アメーバ特異的PCR 法による本原虫の核酸の検出

赤痢アメーバ抗原検出法による本原虫虫体成分のELISA法による検出

3. 病原体に対する抗体の検出

例：

患者血清からの赤痢アメーバに対する特異抗体の検出

X. 赤痢アメーバの検査が可能な機関

1. 慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室、電話03-3353-1211
2. 東海大学医学部基礎医学系生体防御学、電話0463-93-1121
3. 東京慈恵会医科大学、熱帯医学教室、電話03-3433-1111（内線2286）
4. 国立感染症研究所、寄生動物部、電話03-5285-1111

XI. 引用文献

- Ali, I., Mondal, U., Roy, S., Haque, R., Petri, W.A., Jr. and Clark, G. C. (2007) Evidence for a Link between Parasite Genotype and Outcome of Infection with *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 45, 285-289.
- Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., and Harkness, J. (2007) Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev*, 20, 511-532.
- Fu, Y. F., Nagakura, K., Cheng, X. J., and Tachibana, H. (2010) Comparison of serine-rich protein genes of *Entamoeba histolytica* isolates obtained from institutions for the mentally retarded in Kanagawa and Shizuoka Prefectures, Japan. *Parasitol Res*, 107, 999-1002.
- Hamzah, Z., Petmitr, S., Mungthin, M., Leelayoova, S., and Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. (2006) Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J Clin Microbiol*, 44, 3196-3200.
- Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J Clin Microbiol*, 40, 4081-4090.

- Haque, R., Ali, I.K., Akther, S. and Petri, W.A., Jr. (1998) Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 449-452.
- Haque, R., Faruque, A.S., Hahn, P., Lyerly, D.M. and Petri, W.A., Jr. (1997) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *Journal of Infectious Diseases*, 175, 734-736.
- Kaneda, Y., Nagakura, K., Tachibana, H., Tanaka, T. and Sasao, M. (1988) *Entamoeba histolytica* infection in a rehabilitation center for mentally retarded persons in Japan [letter]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 20, 687.
- Kawamoto, F., Mizuno, S., Fujioka, H., Kumada, N., Sigiya, E., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Iseki, M., Yamada, M., Matsumoto, Y., Tegoshi, T. and Yoshida, Y. (1987) Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba* cysts and other protozoans with fluorochromes. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 40, 35-46.
- Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1983) Establishment of an axenic strain of *Entamoeba histolytica* from cysts in stool, bypassing bacteria-associated cultivation. *Japanese Journal of Parasitology*, 32, 475-480.
- Nozaki, T. (2000)
Current problems of amebiasis in Japan and recent advances in amebiasis research. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53, 229-237.
- Okuzawa, E., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1993) Evaluation of a commercial kit of indirect haemagglutination test for sero-diagnosis of amebiasis. *Japanese Journal of Parasitology*, 42, 227-233.
- Sanuki, J., Asai, T., Okuzawa, E., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. (1997) Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 83, 96-98.
- Sanuki, J., Asai, T., Okuzawa, E., Takeuchi, T., Ohnishi, K. and Murata, M. (1995)
Detection of *Entamoeba histolytica* DNA from colon-biopsied specimen by PCR. *Clinical Parasitology*, 6, 114-115.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Okuzawa, E. and Masuda, G. (1992)

- Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology*, 22, 1193-1196.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M. and Ihara, S. (1991)
Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction letter. *Journal of Infectious Diseases*, 164, 825-826.
- 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 letter. *Journal of Infectious Diseases*, 159, 808.
- World Health Organization. (1995)
The World Health Report 1995: Bridging the Gaps. Vol. 16, pp. 377-385, World Health Organization, Geneva.
- 天野優子、渡辺純一、荒木国興 (1998)
寄生虫疾患診断法としてのdot-ELISA法とELISA法の比較 肺吸虫症134例、マ
ンソン孤虫35例についての検討病態生理、31、48-54
- 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
- 小林正規、関口恒存、竹内勤 (1994)
知っておきたい基本的な原虫検査法 メディアサークル 39、9-19
- 野崎智義、Haghighi, A.、竹内勤、増田剛太、今村顕史. (2003)
赤痢アメーバ原虫の遺伝子タイピングと感染経路の特定化 病原微生物検出情報
24、7-8.
- 荒木国興 (1991) 寄生虫症の血清学的診断法の発達 in 寄生虫疾患の診断法の開発
と症例検討 医薬ジャーナル 140-157

執筆者一覧

野崎 智義 : 国立感染症研究所 寄生動物部*
大友 良光 : 青森県環境保健センター 微生物部
赤見 正行 : 群馬県衛生環境研究所 ウィルス課
竹部 久勝 : 奈良県保健環境研究センター ウィルス・細菌担当
阿部 仁一郎 : 大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当
黒木 俊郎 : 神奈川県衛生研究所 企画情報部
津久井 久美子 : 国立感染症研究所 寄生動物部
栃木県保健環境センター
堺市衛生研究所

*〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
TEL : 03-5285-1111 FAX : 03-5285-1173