

アメーバ症の血清学的診断法に関する基礎的研究

2. 市販 Complement Fixation 用抗原の向流免疫電気泳動法 (CIE) への適用と血清学的診断法の臨床的検討

岐阜大学医学部寄生虫学教室

長野 功 大友 弘 士

都立駒込病院感染症科

増 田 剛 太

(平成2年3月19日受付)

(平成2年4月16日受理)

Key words : amoebiasis, counter immunoelectrophoresis (CIE), clinical study, serological diagnosis

要 旨

市販の complement fixation (CF) 用アメーバ抗原を向流免疫電気泳動法 (CIE) に適用し, 同抗原を用いた CF 反応および ELISA との比較を行った。また, 各血清学的診断法の抗体価の変動と臨床像との関連についても検討を加えた。

CIE は CF 反応および ELISA に比べるとかなり感度が低いが, 陰性例は CF および ELISA 抗体価の低い検体に集中する傾向がみられた。しかし, 高い抗体価の検体でも陰性となる例も若干みられた。一方, 特異性は三法ともに十分高いものと思われた。

患者5例について, 急性期と発症約半年後の治療による軽快時との抗体価を比較すると, 全例に抗体価または吸光度の低下が認められた。しかし, なお陽性域内であった。ただ, CIE については1例のみ陰性化が認められた。

病型別にみた場合は, ELISA 吸光度, ELISA 抗体価および CF 抗体価の各平均値すべてにおいて, 腸アメーバ症は肝膿瘍ならびに両者の合併型に対して有意に低かった。

以上の成績から, ELISA および CF 抗体価と臨床像との相関性はかなり高いことが示された。しかし, CIE については感度などの問題もあり, さらに検討を行うことが必要であることが示唆された。

序 文

近年, アメーバ症の診断に血清学的検査法が広く用いられるようになってきた。前報¹⁾において我々は, 市販 CF 用抗原を ELISA に適用する場合の条件を検討し, その設定条件によっては有用性がかなり高いことを報告した。また, CF 反応も感度, 特異性ともに優れていることを示し, 両者

の併用によって診断はより確実になると考察した。一方, CIE は間接赤血球凝集反応 (IHA) に比べて, 感度は低いが特異性は高く, 迅速性にも優れていると報告されている²⁾³⁾。しかし, 電気泳動装置, 高濃度の抗原を要するなどの問題点もみられる⁴⁾。そこで今回我々は, CF 用抗原を用いての CIE の有用性について検討を加えた。

一方, 最近では血清反応における抗体の消長により治癒判定が試みられるようになったが, 治療後の抗体の持続期間は検査法により大きく異なるこ

別刷請求先: (〒500) 岐阜市司町40

岐阜大学医学部寄生虫学教室

長野 功

とが報告されている^{5)~7)}。また、検査法によっては抗体が検出される期間が長いために、既往の抗体を検出し、その場合は誤診の原因となる可能性がある⁸⁾。また、アメーバ症の病型はその病巣部位により、腸アメーバ症と腸管外アメーバ症とに大別されるが、一般に前者では後者に比べて血清抗体価、陽性率ともに低いことも報告されている⁹⁾¹⁰⁾。以上の点より、我々はCIEの有用性の検討とともに、ELISA、CF反応およびCIEによる血清抗体の消長の検討ならびに病型による抗体価の比較を行った。

材料および方法

1) 抗原

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 抗原はVirion社製CF用抗原(日水製薬, lot No. 10279.03)を使用し、1アンブル分を1mlの精製水で溶解し、原液とした。

2) 被験血清

患者の臨床症状ならびに検査材料からの原虫の証明によってアメーバ症と確定した前報¹⁾と同一の患者血清を用いたが、経過の詳細不明な血清を除外したため、患者44名の60検体とした。その内訳は、Table 1に示したように、腸アメーバ症17検体、肝膿瘍31検体、および両者の合併型12検体であった。また、健常者の血清は100検体を用いた。

3) CIE

Krupp(1974)の方法²⁾を若干変更して実施した。すなわち、100mm×100mmのガラスプレートにペロナール緩衝液(pH 8.5, イオン強度0.025)で1%に溶解したアガロースを15ml注いだ後、凝固させた。次に、その寒天板に直径4mm, 8mm間隔のペアの穴を10ペア2列ずつあけた。陰極側の穴には被験血清を、陽極側には抗原をそれぞれみだし、ペロナール緩衝液(pH 8.5, イオン強度0.05)中で20mA通電した。プレートは生理食塩水中で2日間洗浄し、乾燥後1%アミドブラック10Bで染色、3%酢酸で脱色した。判定は明瞭な直線の沈降線を形成しているものを陽性とし、それ以外は陰性とした。

4) CF反応

マイクロプレートを用いた50%溶血法で常法¹¹⁾

通り実施し、指示書に従って10倍以上を陽性と判定した。

5) ELISA

前報¹⁾通り実施した。要約すると、400倍希釈した抗原と100倍から2倍段階希釈した被験血清を反応させた。二次抗体は2,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H and L)血清(ICN Immunobiologicals)を用い、基質としてABTSを加えた後、microplatephotometer(Corona MTP-22)にて405nmでの吸光度を測定した。cut off値は前報と同様に0.068とし、cut off値以上を示す血清希釈をELISA抗体価とした。

成績

1) CIEの適用条件ならびにCIE、CF反応およびELISAの感度と特異性の検討

抗原の至適濃度の検討のため、抗原を希釈して血清原液と反応させた。抗原原液では沈降線を形成するが2倍希釈では形成しない被験血清がCIE陽性53検体中23検体を占めたため、抗原は原液が至適であると考えられた。

全160検体についてCF反応、ELISAおよび上記の条件によるCIEを実施し、各病型別に感度および特異性の比較を行った(Table 1)。健常者血清ではELISAおよびCIEは全検体が陰性であった。一方、CF反応は2検体が陽性を呈したが、抗体価は10倍、20倍と低値であった。患者血清においては、腸アメーバ症の1検体がCIE、CF反応およびELISAともに陰性であったが、その他の検体はCF反応およびELISAではすべて陽性を呈した。一方、CIEでは腸アメーバ症17検体中3検

Table 1 Comparison of CIE results with CF test and ELISA using sera from patients with amoebic disease and from uninfected persons

Clinical diagnosis	No. of sera	Serological test					
		CIE		CF		ELISA	
		-	+	-	+	-	+
Uninfected	100	100	0	98	2	100	0
Colitis	17	3	14	1	16	1	16
Liver abscess	31	4	27	0	31	0	31
Colitis + Liver abscess	12	0	12	0	12	0	12

体、肝膿瘍31検体中4検体が陰性であった。また、泳動後すぐに沈降線が確認できたものはCIE陽性の53検体中12検体のみであった。

2) CIE陰性例におけるCF抗体価およびELISA抗体価の検討

CIE陰性例のCF抗体価とELISA抗体価の検討を行った(Table 2)。CF抗体価はCase 1~5ではすべて20倍以下であったが、Case 6では80倍、Case 7では160倍と高かった。ELISA吸光度は0.2以下のものが5検体を占めたが、0.519と高いものもみられた。ELISA抗体価は200倍が2検体、400倍が3検体で1,600倍と高い抗体価を示したのも1検体に認められた。全体としては、腸アメーバ症の3例、肝膿瘍の4例がCIE陰性であった

Table 2 CF and ELISA-antibody titers in CIE-negative sera

Case	Clinical diagnosis	CF-titers	ELISA	
			Absorbance	Titers
1	Colitis	<10	0.034†	<100
2	Colitis	20	0.110	200
3	Colitis	20	0.113	200
4	Liver abscess*	20	0.180	400
5	Liver abscess*	20	0.232	400
6	Liver abscess	80	0.519	1,600
7	Liver abscess	160	0.189	400

† Absorbance of sera diluted 1 : 100

*Convalescence

が、肝膿瘍の陰性例には回復期の検体が2例含まれていた。

3) 急性期および発症約6カ月後の抗体価の推移

発症約10日以内で急性症状を呈している患者の血清と発症約6カ月後で治療により症状がほぼ消失した時期の血清の抗体価を比較した(Table 3)。上記のような条件をみたすペア血清は5検体のみであったが、CF抗体価は4検体、ELISA吸光度は5検体、同抗体価は3検体に低下が認められた。しかし、5検体とも陽性域内に留まっていた。一方、CIEは1検体のみ陰性化した。

4) ELISA吸光度の病型別における比較

腸アメーバ症、肝膿瘍および両者の合併型におけるELISA吸光度の分布を示した(Fig. 1)。ペア血清は急性期の1検体のみとしたため、全44検体についての比較を行った。各病型ともバラツキがかなり大きく、腸アメーバ症の平均±標準偏差は0.160±0.076、肝膿瘍では0.270±0.150、合併型では0.337±0.162であった。しかし、腸アメーバ症は肝膿瘍または合併型に対して有意(p<0.01)に吸光度の低下が認められた。

5) CF抗体価およびELISA抗体価の病型別の比較

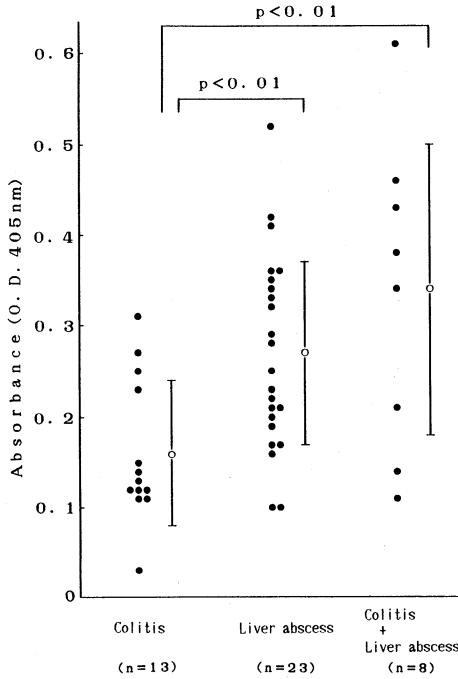
4)と同様に各病型におけるCF抗体価およびELISA抗体価を比較した(Table 4)。CF平均抗

Table 3 Persistence of antibodies in sera from patients with amoebiasis after cure

Case	Clinical diagnosis	Date	CF-titers	ELISA		CIE
				Absorbance	Titers	
1	Liver abscess	'83 4/20	40	0.325†	800	+
		'83 9/10	20	0.180	400	-
2	Liver abscess	'83 1/29	80	0.226	400	+
		'83 10/6	20	0.140	200	+
3	Liver abscess	'83 10/26	160	0.340	800	+
		'84 2/29	160	0.215	400	+
4	Colitis	'83 7/14	40	0.136	200	+
		'84 5/31	20	0.103	200	+
5	Colitis + Liver abscess	'85 6/7	80	0.141	200	+
		'85 12/6	40	0.108	200	+

† Absorbance of sera diluted 1 : 100

Fig. 1 Distribution of absorbance of sera diluted 1:100 from patients with amoebic colitis and amoebic liver abscess. The mean (○)±standard deviation (bars) were shown.



体価の場合、腸アメーバ症は肝膿瘍に対し $p < 0.01$ で、また合併型に対し $p < 0.05$ で有意に低下が認められた。一方、ELISA 平均抗体価の場合、腸アメーバ症は肝膿瘍に対し $p < 0.001$ で、また合併型に対し $p < 0.01$ で有意に低下が認められた。

考 察

CIE は電気泳動装置、高濃度の抗原を必要とするために最近はあまり用いられていない。その一方、高感度の間接蛍光抗体法(IFA)、ELISA、原理的にはCIEと同様であるが容易に実施できるゲル内沈降反応(AGD)などが頻用される傾向にある。しかし、Krupp はCIEはIHAより感度が低いものの、AGDよりは高く、特異性にも問題はないと報告している²⁾。また、Alperらの成績も同様であり、さらに実施後1時間での判定も可能であると報告している³⁾。今回の実験では他の報告とは抗原が異なるものの、CIEは感度の点ではCF反応、ELISAと比較してかなり低いものと考えられた。一方、特異性については、CIEはELISAとともに健常者血清で陽性を示した例はなく、CF反応が2%の陽性率であったが抗体価は低値であり、三法ともに問題は少ないと思われた。また、CIE陰性患者血清における他の方法による抗体価の測定値をみると、低値のものがCIE陰性となる傾向にあるが、その逆もみられ、検討を要する問題が内包されているものと思われる。前報¹⁾においてCF抗体価とELISA抗体価との相関が高くなかったことを考慮すると、検査法によりかなり異なった抗体を検出している可能性も否定できない。また、今回の方法で泳動後すぐに沈降線が確認できる検体はきわめて少なかったこと、抗原の希釈により沈降線を形成しない検体が増加した

Table 4 Distribution of CF and ELISA-antibody titers in sera from patients with amoebic colitis and amoebic liver abscess

Clinical diagnosis	No. of sera	No. of sera with antibody at indicated CF-titers								≥10(%)	Mean titer
		<10	10	20	40	80	160	320	640		
Colitis	13	1	1	2	5	3	1	0	0	12(92.3)	36.0
Liver abscess	23	0	0	2	3	11	5	2	0	23(100)	85.0*
Colitis+Abs.	8	0	0	1	1	2	3	0	1	8(100)	103.8**

Clinical diagnosis	No. of sera	No. of sera with antibody at indicated ELISA-titers						≥100(%)	Mean titer
		<100	100	200	400	800	1,600		
Colitis	13	1	0	7	5	0	0	12(92.3)	234.7
Liver abscess	23	0	0	2	9	9	3	23(100)	591.8***
Colitis+Abs.	8	0	0	2	1	2	3	8(100)	672.7*

Significantly different from colitis by Student's t test at * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

ことなどから、用いたCF用抗原の抗原濃度はかなり低く、CIEには必ずしも適していないと思われる。そのためCIEが低い陽性率になったとも考えられる。

一方、各血清学的診断法の抗体の検出感度にはかなりの異同がみられるため、治療後の抗体価の低下または陰性化に要する期間は各診断法で大きく異なることが報告されている^{5)~7)}。KruppらはCF反応はIHA、AGDに比して感度はかなり低く、CF抗体では2年後において70~80%が陰性化するが、IHA抗体では10~30%の陰性化に留まることを報告している⁵⁾。しかし、どの方法においても抗体価の低下はきわめて緩徐であったと報告している。JuniperらもIHAはCF反応、AGDに比べて感度が高く、CFおよびGDP抗体は6カ月で陰性化するが、IHA抗体では一般に12カ月を要すると報告している⁶⁾。また、腸アメーバ症、腸管外アメーバ症にかかわらず5年後に抗体が検出された例があったとも報告している。今回、我々が6カ月後の抗体価を測定できたのは5例の患者のみであったが、各抗体価の低下は認められたものの、陰性化はCIEの1検体だけであった。以上のようにアメーバ症の場合、治療後の抗体の持続はかなり長く、血清学的検査法を治療後の治癒判定に使用するためには、陰性化による判定よりも、抗体価の推移によって判定する必要があるだろう。そのためには抗体価の定量化が可能で、かつ高感度であること、臨床症状および原虫の消長と抗体価がよく一致すること、再現性に優れていることなどが不可欠の条件となる。その点からいえば、今回我々が行った検査法の中ではELISAがもっとも有用性の高い検査法であると思われるが、抗体価の低下が認められなかった検体もあり、さらに検討が必要である。また、以上のように各抗体の持続期間はかなり長期にわたるが、日本においては一般健常者のアメーバ抗体保有率はきわめて低いと考えられるため、診断に当たっては過去の感染による抗体の保有については考慮する必要はないであろう。

一方、アメーバ症の病型は腸アメーバ症と腸管外アメーバ症に大別されるが、腸アメーバ症では

腸管外アメーバ症に比して血清抗体価、陽性率ともに低いことが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。今回の成績においても、ELISA吸光度、ELISA抗体価およびCF抗体価の平均値すべてにおいて、腸アメーバ症は肝膿瘍または合併型に対し有意に低かった。また、CF反応およびELISAにおける唯一の陰性例も腸アメーバ症であった。組織侵入性が一般に強い肝膿瘍の方が抗体価も高くなるのであろう。CIEについては、定量化が困難なため、抗体価による比較はできず、また、今回の成績では陽性率も腸アメーバ症と肝膿瘍ではほぼ同程度に低率であった。このことより、長期間にわたる抗体の測定、また検体数を増やしてさらに検討する必要性があろう。

謝辞：本研究の一部は厚生省新薬開発推進事業「熱帯病治療薬の開発研究班（班長：田中 寛，分担研究者：大友弘士）」研究費によって行われたので、ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 長野 功, 大友弘士, 増田剛太, 所 光男, 野田伸司, 後藤喜一: アメーバ症の血清学的診断法に関する基礎的研究. 1. 市販CF用抗原のELISAへの適用. 感染症誌, 64: 699-703, 1990.
- 2) Krupp, I.M.: Comparison of counter-immunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23: 27-30, 1974.
- 3) Alper, E.I., Littler, C. & Monroe, L.S.: Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of amebiasis. Am. J. Gastroenterol., 65: 63-67, 1976.
- 4) 竹内 勲, 小林正規: 赤痢アメーバ症の血清学的診断法, とくにゲル内沈降反応について. 医学のあゆみ, 115: 53-58, 1980.
- 5) Krupp, I.M. & Powell, S.J.: Antibody response to invasive amebiasis in Durban, South Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg., 20: 414-420, 1971.
- 6) Juniper, K., Jr., Worrell, C.L., Minshew, M.C., Roth, L.S., Cypert, H. & Lloyd, R.E.: Serologic diagnosis of amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21: 157-168, 1972.
- 7) Stamm, W.P., Ashley, M.J. & Bell, K.: The value of amoebic serology in an area of low endemicity. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 70: 49-53, 1976.
- 8) Walsh, J.A.: Problems in recognition and

- diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.*, 8: 228-238, 1986.
- 9) 竹内 勤, 小林正規: 赤痢アメーバ症. *臨床と微生物*, 14: 72-76, 1987.
- 10) 高田季久, 井関基弘, 木俣 勲, 加藤真由美: 赤痢アメーバ症—疫学的考察および診断. *臨床と微生物*, 14: 415-422, 1987.
- 11) 井上 栄: マイクロ法による補体結合試験. *臨床検査*, 17: 838-847, 1973.

Fundamental Studies on Serological Diagnosis of Amoebiasis

2. Application of Antigen of *Entamoeba histolytica* for Complement Fixation Test to Counterimmunoelectrophoresis; and Clinical Relevance of Serological Tests

Isao NAGANO & Hiroshi OHTOMO

Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine

Gohta MASUDA

Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

Antigen of *Entamoeba histolytica* for complement fixation (CF) test was applied to counterimmunoelectrophoresis (CIE), and the result was compared with that of CF test and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in regard to sensitivity and specificity. Besides, we studied antibody titers to *E. histolytica* in sera from acute and convalescent patients, and from patients with amoebic colitis and amoebic liver abscess.

Sera used were from patients with amoebic colitis, amoebic liver abscess and uninfected control subjects. The CIE was less sensitive than the CF test and ELISA. Most CIE-negative samples had low CF and ELISA titers, but a few samples had higher CF and ELISA titers. On the other hand, all uninfected controls were negative by CIE and ELISA, and 98% were negative by the CF test.

The level of antibodies tended to decrease with time after clinical recovery, but CF test and ELISA results remained positive in all patients 6 months after clinical cure. CIE converted negative in only one patient after 6 months.

The level of antibodies of CF test and ELISA was significantly higher in amoebic liver abscess than amoebic colitis.

These results suggested that all these three methods were so specific, and antibody titers by the CF test and ELISA were well correlated to clinical manifestations. The CIE with CF-antigen was less sensitive as compared with CF test or ELISA.