

わが国における新しいマラリア診断フロー

A novel malaria diagnostic flow in Japan

かのう しげ ゆき
狩野 繁之
Shigeyuki KANO

<キーワード>

マラリア診断、顕微鏡検査、RDT、核酸増幅法、PCR法、LAMP法、フローサイトメトリー法、XN-31、届出基準

はじめに

マラリアは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」における全数届出の4類感染症に分類されている。その届出基準(同法律第12条1項)としては、従来、1)「顕微鏡下でのマラリア原虫の証明、かつ、原虫種の確認による病原体の検出」、または2)「PCR法による病原体の遺伝子の検出」の2つの検査方法を定め、マラリアが疑われる有症状の患者または無症状の病原体保有者を診断した場合と記載されていた。

近年、シスメックス株式会社(以下:シスメックス)によって、新しいマラリア診断法として、フローサイトメトリー法の応用による原虫感染赤血球の検出法が開発された。また、栄研化学株式会社(以下:栄研化学)によって開発されたPCRに代わる新しい核酸増幅法 Loop-Mediated Isothermal Amplification法(LAMP法)が、マラリア診断用に応用されている。筆者は、これらの方法が、実際の患者血中のマラリア原虫の迅速かつ鋭敏な同定に極めて有用であることを、両社との共同臨床研究/試験を通して見出した。これらの成果をもって、日本寄生虫学会、日本臨床寄生虫学会、日本熱帯医学会の3学会は、感染症法におけるマラリアの届出基準について、

「フローサイトメトリー法を追加すること」「従来のPCR法という表現を核酸増幅法に変え、LAMP法やその他の遺伝子検出法も使用可能にすること」の2点を厚生労働省に提案した。そして、2021年6月3日の厚生労働省健康局結核感染症課長通達により、マラリアの感染症法上の届出基準となる診断方法に、従来の「鏡検による病原体の検出」および「PCR法による病原体遺伝子の検出」に、「フローサイトメトリー法によるマラリア原虫感染赤血球の検出」、「LAMP法やその他の核酸増幅法による病原体遺伝子の検出」が新たに追加されて適用されることとなった(図1)¹⁾。

本稿では、マラリア診断の各臨床検査法の特徴を記載し、新しい診断フローを解説する。

I. 顕微鏡検査法

顕微鏡検査法は、マラリア診断の gold standard である。薄層塗抹標本は、スライドガラスの端に患者の抹消血を滴下し、もう一枚のスライドガラスを約45度の角度を保ちながら前方に滑らすように引いて作製する(図2)。直ちに風乾後、100%メタノールで固定し、pH7.2のリン酸バッファーで希釈したギムザ染色液で染色する。鏡検は、油浸レンズを用いて1,000倍の倍率で観察する。

ヒトに感染するマラリア原虫種のそれぞれの形態的特徴で、原虫の種の鑑別が可能である(図3)。また、赤血球数に対する寄生赤血球数の割合を目視でカウントすることで、マラリア重症度の一つの指標となる原虫寄生率(% parasitemia)を算出することができる。顕微鏡検査法では、患者血中のマラリア

ア原虫に関する多くの情報を得ることができるが、その有用性は検査者の技量に左右される。特に原虫寄生率が0.01%未満では、確率的に原虫を見逃してしまうリスクが大きい。筆者が顕微鏡検査を行う場

合には、少なくとも赤血球 10 万個を目視によって確認しても原虫を検出できなかった場合に「陰性」と判定している。

マ ラ リ ア 発 生 届

都道府県知事（保健所設置市長・特別区長） 殿

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 12 条第 1 項（同条第 6 項において準用する場合を含む。）の規定により、以下のとおり届け出る。

報告年月日 令和 年 月 日

医師の氏名 _____
 従事する病院・診療所の名称 _____
 上記病院・診療所の所在地(※) _____
 電話番号(※) () () - _____

(※病院・診療所に従事していない医師にあつては、その住所・電話番号を記載)

1 診断（検案）した者（死体）の類型 ・患者（確定例） ・無症状病原体保有者 ・感染症死亡者の死体 ・感染症死亡疑いの死体					
2 当該者氏名	3 性別 男・女	4 生年月日 年 月 日	5 診断時の年齢（0歳は月齢） 歳（ か月）	6 当該者職業	
7 当該者住所 電話（ ） -					
8 当該者所在地 電話（ ） -					
9 保護者氏名	10 保護者住所（9、10は患者が未成年の場合のみ記入） 電話（ ） -				

<p style="text-align: center;">病 型</p> <p>1) 三日熱、2) 四日熱、3) 卵形、4) 熱帯熱、5) その他、6) 不明</p> <p>11 症 状 ・発熱 ・悪寒 ・頭痛 ・関節痛 ・脾腫 ・貧血 ・出血症状 ・低血糖 ・意識障害 ・急性腎不全 ・DIC ・肺水腫 / ARDS ・その他（ ） ・なし</p> <p>12 診 断 方 法 ・血液検体の鏡検による病原体の検出 ・血液検体の核酸増幅法による病原体遺伝子の検出 検査法：PCR法・LAMP法・その他 ・血液検体のフローサイトメトリー法によるマラリア原虫 感染赤血球の検出 ・その他の方法（ ） 検体（ ） 結果（ ）</p>	<p>18 感染原因・感染経路・感染地域</p> <p>①感染原因・感染経路（確定・推定）</p> <p>1 動物・蚊・昆虫等からの感染（動物・蚊・昆虫等の種類・状況： _____）</p> <p>2 輸血・血液製剤（輸血・血液製剤の種類・使用年月・状況： _____）</p> <p>3 母子感染（ア、胎内 イ、出産時 ウ、母乳） _____</p> <p>4 その他（ _____）</p> <p>②感染地域（確定・推定）</p> <p>1 日本国内（ 都道府県 市区町村）</p> <p>2 国外（ 国 _____ 詳細地域 _____）</p> <p>※ 複数の国又は地域が該当する場合は全て記載すること。渡航期間（出国日 年 月 日・入国日 年 月 日 国外居住者については 入国日のみで可）</p>
---	---

13 初診年月日 令和 年 月 日
 14 診断（検案(※)）年月日 令和 年 月 日
 15 感染したと推定される年月日 令和 年 月 日
 16 発病年月日（*） 令和 年 月 日
 17 死亡年月日（※） 令和 年 月 日

19 その他感染症のまん延の防止及び当該者の医療のために医師が必要と認める事項 _____

(1、3、11、12、18 欄は該当する番号等を○で囲み、4、5、13 から 17 欄は年齢、年月日を記入すること。
 (※) 欄は、死亡者を検案した場合のみ記入すること。(* 欄は、患者（確定例）を診断した場合のみ記入すること。
 11、12 欄は、該当するものすべてを記載すること。)

この届出は診断後直ちに行ってください

図 1 マラリア発生届け

表中の「12 診断方法」の下線部分が新規に加筆・訂正された部分

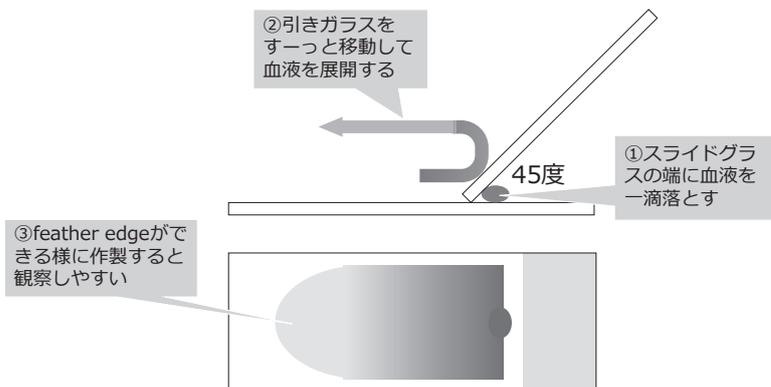


図 2 薄層塗抹標本の作成方法

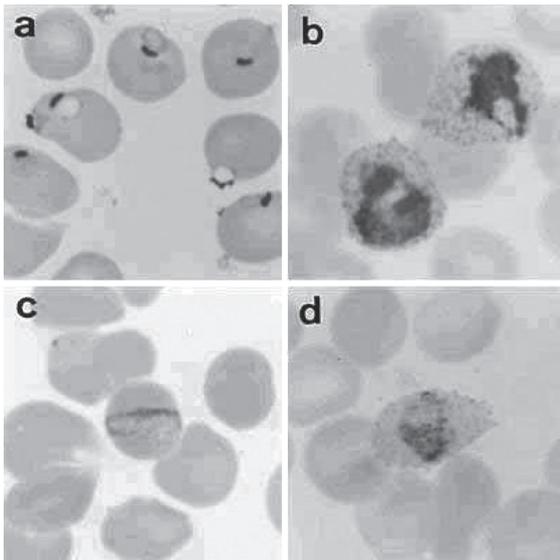


図3 鏡検による各種マラリア原虫像
(ギムザ染色薄層塗抹標本)

- a:** 熱帯熱マラリア原虫のリングフォーム(輪状体)が見られ、寄生率の高い重症患者塗抹標本では、複数個寄生する赤血球もある。
b: 三日熱マラリア原虫のアメーバイドボディー(アメーバ体)が見られ、感染赤血球は膨化し、非定型的な細胞質の形が観察される。シェフナー斑点も認められる。
c: 四日熱マラリア原虫のバンドフォーム(帯状体)が見られ、感染赤血球は大きくならない。
d: 卵形マラリア原虫の感染赤血球は卵形に膨化し、鋸歯状の辺縁が著明。形態的特徴は成書にあたること。

(図3は巻末にカラーで掲載しています)

II. 迅速診断法

イムノクロマトグラフィーの原理を利用して、末梢血中のマラリア原虫に由来する抗原タンパクを簡便に検出するキットが数多く市販されており、このキットを用いた抗原検査法を迅速診断法(Rapid Diagnostic Test: RDT)と呼んでいる²⁾。熱帯熱マラリアは他種のマラリアと比較して致死的な経過を辿るため、临床上、他のマラリア原虫との鑑別が重要であることから、RDTは熱帯熱マラリア原虫に特異的な抗原と、4種マラリア原虫に共通な抗原とをそれぞれ検出できるように設計されている場合が多い。

末梢血をキット上に滴下し、付属のバッファーを用いて展開すれば、約15分で所定の位置のバンドの有無を目視で判定し、結果を評価できる(図4)。キットさえあれば他の設備は一切不要で、検査者の技量によらず判定できる点で非常に優れた方法であるが、他の方法に比較すると鋭敏度に劣り、寄生率が低い場合に偽陰性を認めることがある。わが国で

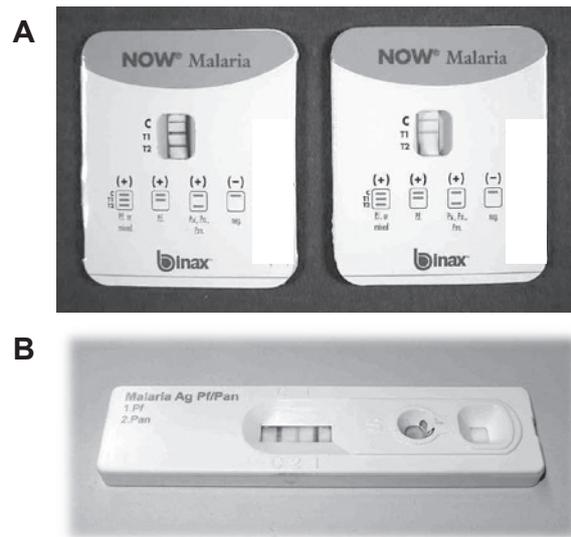


図4 マラリア迅速診断法(RDT)キット

A: BinaxNow[®]Malaria

(Binax Inc., Scarborough, Maine, U.S.A.)

B: SD Bioline Malaria Ag Pf/Pan

(Standard Diagnostics, Inc., Suwon, Kyonggi, Korea)

いずれも、テストキットの所定部分に患者末梢血液を15 μ L滴下し、キット付属のバッファーで展開した後、約15分で結果が得られる。結果はカード上の3本のバンドの有無で判定する。キット上のCの位置のバンドはコントロールバンドで、これが表出されないと、キットの品質や作業の的確性が保証されない。

キットAのT1バンドおよびキットBのPfバンドは、熱帯熱マラリア原虫に特異的な抗原(Pf HRP2)を検出した時に現れる。キットAのT2バンドおよびキットBのPanバンドは4種のヒトマラリア原虫(熱帯熱、三日熱、四日熱、卵形マラリア原虫)に共通の抗原(pLDH)を検出した時に現れる。即ち、BinaxNow[®]Malariaの場合は結果がT1(+)T2(+)の場合には熱帯熱マラリア原虫単独感染あるいは熱帯熱マラリア原虫と非熱帯熱マラリア原虫の混合感染、T1(+)T2(-)の場合には、熱帯熱マラリア原虫単独感染、T1(-)T2(+)の場合には非熱帯熱マラリア原虫感染、T1(-)T2(-)の場合にはマラリア原虫非感染と判定できる。SD Bioline Malaria Ag Pf/Panを用いた場合も同様に判定できる。

ほどのRDTキットも未承認であり、臨床検査に当たっては補助的に用いられている。

III. PCR法

マラリア原虫種ごとのDNAに特異的なプライマー配列を用いたPCR反応によって、患者血中の原虫DNAを特異的に増幅して検出することができる。世界中から、様々なPCRを用いたプロトコルが報告されている。筆者らは、従来、国内で広く用いられてきたSSU-RNA遺伝子をターゲットとしたNested-PCR法の改良を重ね、ヒトに感染する5種のマラリア原虫(熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、サルマラリア原虫の一種 *Plasmodium knowlesi*) を効率よく鑑

別することに成功しており³⁾、日常のマラリアの診療で運用している(図5)。

この方法では、患者血液からDNAを抽出し、2回のPCR反応後の結果を得るまでに約半日の時間がかかる。しかし、鋭敏度に優れ、原虫の種を特異的に鑑別できる点で、診断法としての有用性が高い。DNA抽出、PCRを行うには設備の整った検査室が必要であり、検査者は作業技術に習熟している必要がある。

IV. LAMP 法

LAMP法は、特殊なDNA増幅酵素を用いることにより、一定の温度で反応液をインキュベートするだけで、特異的な遺伝子の増幅を行う方法である⁴⁾。PCR法とは異なり、高度な温度制御装置を必要としない。栄研化学は、LAMP法によるマラリア診断のために、1)患者血液からLAMP反応に用いるDNAを簡便に抽出するキット(LoopAmp[®] PURE DNA抽出キット)と、2) LAMP法を利用したマラリア原虫遺伝子検出キット(LoopAmp[®] Malaria Pan/Pf)を開発した。LoopAmp[®] PURE DNA抽出キットを用いれば、血液を専用調整液に希釈して専用カラムに入れ、手で絞り出す操作のみで10分以内にDNAが抽出できる(Procedure for Ultra Rapid Extraction: PURE法)。

そのDNA抽出液をLoopAmp[®] Malaria Pan/Pfのチューブに添加して、65°C、40分のインキュベートでLAMP反応が終了し、判定は目視でチューブが発する蛍光の有無で行う(図6)。LoopAmp[®] Malaria Pan/Pfキットは、種類を問わないマラリア原虫(Pan)のDNAの検出および熱帯熱マラリア原虫(Pf)のDNAの検出が可能である。

PURE法によるDNA抽出からLAMP法による遺伝子検出までの一連の流れを、筆者らはPURE-LAMP法と呼んでいる。PURE-LAMP法は、PCR法と比較して操作が簡単で、人為的エラーが起きにくい。キットは室温で保管できる。また、LAMP法はPCR法と同等以上の鋭敏度を持つことが報告されている⁵⁾。非常に鋭敏度が高いので、DNAのコンタミネーションによる偽陽性に細心の注意を払う必要がある。また、リアルタイム濁度計を用いて、DNA増幅過程をモニターすることが可能であり、定量的な評価を行うこともできる。筆者らは、国立国際医療研究センター(NCGM)病院を訪れたマラリア疑い患者の血液より作成し、保管していた乾燥ろ紙血液117検体を用い、PURE-LAMP法によるマラリア原虫DNA検出を行なった。その結果、検出能は、新鮮血液を用いたPCR法と比較して、95%以上という高い鋭敏度、特異度を示した⁶⁾。この解析はアーカイブ検体を用

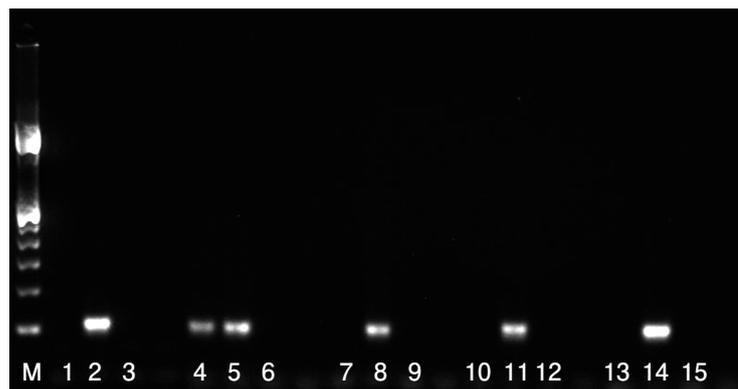


図5 Nested-PCR法による検査結果の1例

三日熱マラリア患者末梢血全血検体より抽出したDNAを鋳型としたPCRの結果。

M: DNAサイズマーカー(100bp DNAラダー)。

熱帯熱マラリア原虫DNA特異的プライマーと、1:患者検体抽出DNAを用いたPCR反応産物、

2: ポジティブコントロールDNAを用いたPCR反応産物、3: ネガティブコントロールの鋳型を用いたPCR反応産物。

三日熱マラリア原虫DNA特異的プライマーと、4-6は上記1-3と同様。

四日熱マラリア原虫DNA特異的プライマーと、7-9は上記1-3と同様。

卵形マラリア原虫DNA特異的プライマーと、10-12は上記1-3と同様。

P. knowlesi DNA特異的プライマーと、13-15は上記1-3と同様。

患者検体抽出DNAを鋳型としたPCRでは、レーン4の三日熱マラリア原虫DNA特異的プライマーを用いたPCR反応のみに増幅産物を認めたので、この患者は“三日熱マラリア原虫陽性”と判定できる。熱帯熱、四日熱、卵形マラリア原虫および、*P. knowlesi*は陰性と判定できる。

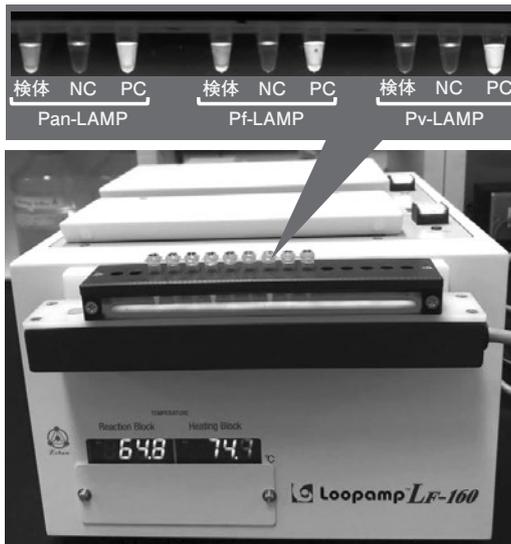


図6 LAMP法によるマラリア検査の例

Loopamp[®]蛍光測定部付恒温装置LF-160(栄研化学、東京)で反応終了後、チューブをUVランプ照射部で観察すると(下段写真)、その蛍光の有無でマラリア原虫の有無を判定できる(上段写真)。

LAMPのキットにはマラリア原虫全般(Pan)を検出するチューブ、熱帯熱マラリア原虫(Pf)を検出するチューブ、三日熱マラリア(Pv)を検出するチューブが含まれている。この検体のLAMPの結果はPan(+)/Pf(+)/Pv(-)なので、熱帯熱マラリア原虫DNA陽性、三日熱マラリア原虫DNA陰性と判定できる。PCはポジティブコントロール、NCはネガティブコントロール。

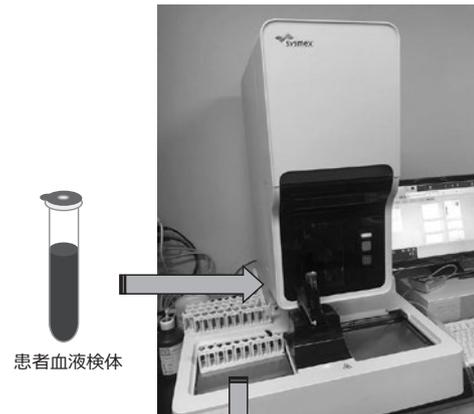
(図6は巻末にカラーで掲載しています)

いたものであり、新鮮な検体を用いればさらに高い鋭敏度での原虫DNAの検出が期待できる。

Loopamp[®] Malaria Pan/Pfキットに加えて、最近、三日熱マラリア原虫(Pv) DNAの検出を可能とするLoopamp[®] Malaria Pvキットが開発されて発売された。熱帯熱マラリア原虫および、三日熱マラリア原虫の特異的DNA検出が可能になることで、臨床現場でのLAMP法の有用性はますます高まっていくであろう。

V. フローサイトメトリー法(XN-31)

多項目自動血球分析装置XN-31(シスメックス、神戸)は、マラリア診断補助を目的として新規に開発されたマラリア原虫等感染赤血球の検出・計数装置である⁷⁾。この装置はフローサイトメトリーの原理により、患者血液をセットしてから約1分でマラリア原虫等感染赤血球(Malaria Infected RBC: MI-RBC)の定量値(MI-RBC#)、寄生率(MI-RBC%)の情報を、また研究用項目としてマラリア原虫種・発育ステージに関する情報を提供する。



測定結果

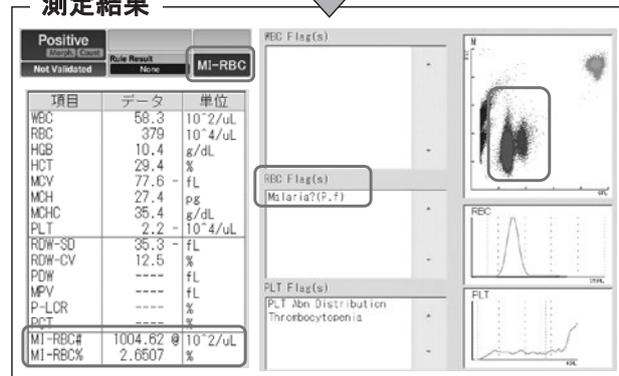


図7 XN-31によるマラリア検査

XN-31の装置の所定の場所に、患者血液検体の採血管をセットしてスタートボタンを押すと、cap piercing functionにより自動で必要量の血液(60μL)が吸引されて測定が始まり、約1分で結果を得ることができる。通常の血算のデータに加えて、マラリア原虫感染赤血球(MI-RBC)に関連する情報が得られる。

下段に示した測定結果の例では、(左下赤枠で囲った部分)MI-RBC#は血液1μLあたり1004.62×10²感染赤血球数、MI-RBC%(マラリア原虫感染赤血球の割合)は2.6507%を示している。

原虫種に関しては、(中央赤枠で囲った部分)にフラッキング情報「Malaria?(P,f)」として熱帯熱マラリア原虫の存在が示唆されている。右側のスキャットグラム中央部(右上赤枠で囲った部分)の赤い2つのクラスターが、マラリア感染赤血球の集合体を示す。

(図7は巻末にカラーで掲載しています)

筆者らは、2017年から2019年にかけてNCGM病院を受診したマラリア疑い患者検体の解析をXN-31で行った。その結果、顕微鏡で熱帯熱マラリア陽性とされた検体はすべてXN-31でもMI-RBC Positiveと判定され、原虫種も熱帯熱マラリア原虫感染を示唆した。熱帯熱マラリア患者血液の原虫寄生率では、顕微鏡観察およびXN-31での測定結果の相関係数が0.99以上であった⁸⁾。また、XN-31は、原虫種に関する情報を熱帯熱マラリア原虫(Malaria?(P,f))または非熱帯熱マラリア原虫(Malaria?(others))を示唆するフラッキング情報として提供する(図7)。筆者らの解析には5症例の非熱帯熱マラリア原虫感

染症例（三日熱マラリア原虫感染2例、四日熱マラリア原虫感染1例、卵形マラリア原虫と熱帯熱マラリア原虫の混合感染1例、*Plasmodium knowlesi*感染1例）が含まれていたが、熱帯熱マラリア原虫と他の原虫種の識別に関して、XN-31は顕微鏡観察との比較で0.938という高い相関係数の一致率を示した。また、フローサイトメトリーによって得られるスキャットグラム（図8）から推察できるマラリア原虫種および原虫発育ステージに関する情報は、顕微鏡観察結果をよく反映していた⁹⁾。

これらの情報が、検査者の技量によらず自動で簡便に得られることの意義は大きく、XN-31は臨床現場でのマラリア診断の補助に極めて有用で、臨床検査上のLeapfrog Innovationであると考えられる。2020年6月26日、「多項目自動血球分析装置XN-31」は、マラリア診断装置に該当するクラスⅢ医療機器として国内初の薬事承認を取得した。そして2021年9月1日付で保険適用を受け、マラリア疑いの患者に対してXN-31の結果を保険診療のもとで提供することが可能となった。

VI. 新しいマラリア診断フロー

各マラリア診断法の特徴、すなわち検出感度、原虫種鑑別能、定量性、検査所要時間、技術レベルを表1にまとめる¹⁰⁾。XN-31によるフローサイトメトリー法は、検査所用時間の短さで圧倒的に優れており、また、LAMP法は鋭敏度で特に優れている。

これらを踏まえて、新しいマラリア診断フローを示す（図9）¹¹⁾。問診による現症、既往歴、渡航歴などの聴取の後、臨床検査では血算や生化学検査に加えて、マラリアの特異的検査法が選ばれる。現在のフローでは、XN-31によるフローサイトメトリー法は顕微鏡検査法と同等または並列、あるいは優先または代替すべき検査法とすることができる。わが国ではRDTが承認されていないことから、XN-31によるフローサイトメトリー法の相対的優先性が高まると考えられる。さらに、感染原虫種特定のためにはPCR法またはLAMP法などの核酸増幅法による検査が追加されるとよい。これらの臨床検査法の診

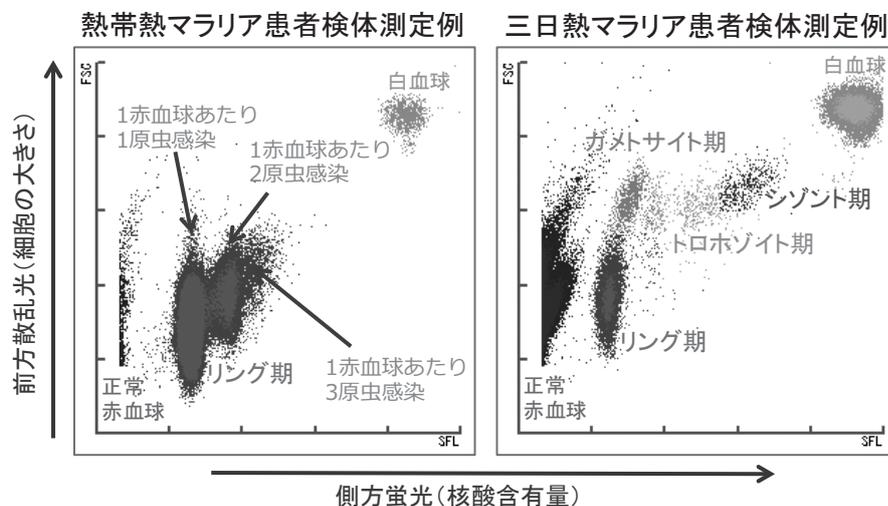


図8 XN-31測定によるスキャットグラム

スキャットグラムの横軸の側方蛍光の高低は細胞の核酸含有量を反映し、縦軸の前方散乱光の高低は細胞の大きさを反映する。各スキャットグラムの左端に共通して現れる青色のクラスターは正常赤血球、右上の水色のクラスターは白血球の集合体を表す。

左側の熱帯熱マラリア患者検体測定例のスキャットグラムに認められる赤色の3つのクラスターは、それぞれ1赤血球あたりの感染原虫数が1、2、3個の感染赤血球の集合体であることを示唆している。また、赤色のクラスターとして表示は、リング期（赤血球へ感染した後の幼若な栄養体の形態学的特徴から名付けられたステージ）の原虫の集合体を示唆している。

右側の三日熱マラリア患者検体測定例のスキャットグラムに認められる赤色のクラスターはリング期、緑色のクラスターはガメトサイト期（雌雄に別れた有性の原虫ステージ）、オレンジ色のクラスターはトロホゾイト期（赤血球で増殖が進んだ後期の栄養体ステージ）、紫色のクラスターはシズント期（赤血球で分裂が開始・進行したステージ）の原虫感染赤血球の集合体であることを示唆している。

（図8は巻末にカラーで掲載しています）

表1 マラリア診断法の特徴の比較

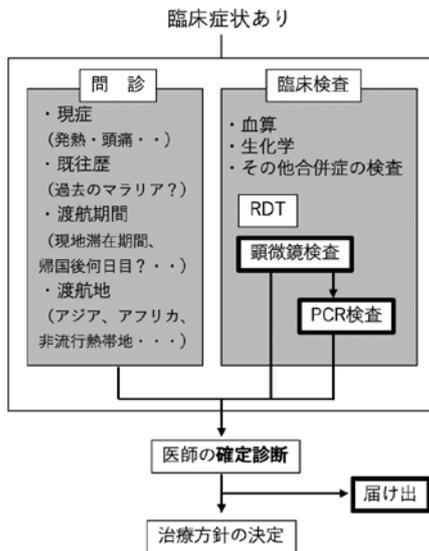
指標	顕微鏡検査法	迅速診断法 (RDT)	PCR法	LAMP法	フローサイトメトリー法 (XN-31)
検出感度 (原虫数/μL血液)	50	>100	1~20	1*	20
原虫種鑑別能	ヒトに感染するマラリア原虫全種	熱帯熱マラリア原虫、それ以外のマラリア原虫	ヒトに感染するマラリア原虫全種	熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、それ以外のマラリア原虫	熱帯熱マラリア原虫、それ以外のマラリア原虫 (注1)
定量性	原虫数のカウント可能	不可	リアルタイムPCRでは、鋳型原虫DNA量の推定が可能	不可(注2)	原虫数のカウント可能
所要時間	30-60分	20分	3-6時間	1時間	1分*
技術レベル	高度	低度	高度	中等度	低度

*特に優れている点。

(注1)今後の研究によって、スキヤットグラムから非熱帯熱マラリア原虫の鑑別がさらに詳しくできる可能性がある。

(注2)リアルタイム濁度計を用いたLAMP反応によって鋳型DNA量を定量的に推定することが可能である。

過去のフロー



現在 (2021年6月3日以後) のフロー

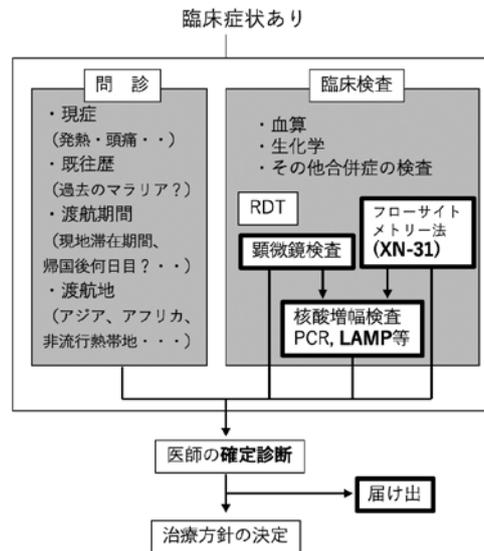


図9 新しいマラリア診断フロー

届出基準とされる検査方法を太枠で示している。医師は、マラリアの臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見からマラリアが疑われ、かつ、届出基準とされる検査方法によりマラリア患者と診断した場合には、感染症法第12条第1項の規定により、最寄りの保健所長を経由して都道府県知事に直ちに届け出なければならない。

(文献11)を基に作成)

断結果は問診結果と合わせ、総合的に医師による確定診断がなされ、その裁量に委ねられて治療方針が決定されることとなる。

おわりに

マラリアの適切な治療のためには、患者の渡航歴や症状などからマラリアが疑われた場合に、血液検体に感染している病原体を迅速かつ鋭敏に検出することが重要である。新規に開発されたXN-31とマ

ラリアLAMP法は、いずれも特殊な技術を必要とせず、迅速性・鋭敏性において従来の検査法の弱点をカバーする。これらの方法を用いた診断結果が感染症法上のマラリアの届出基準として認められたことにより、国内では症例数が少ない輸入マラリアを、症例経験が無い臨床現場でも容易に診断できるようになると考えられる。

また将来的には、これらの方法がマラリア流行地のPOCT (point of care testing) として活用されることが期待できる。わが国発の技術である、XN-31

によるフローサイトメトリー法と LAMP 法によるマラリア検査法は、WHO が目指す 2030 年までの世界のマラリア排除に向けての強力なツールとなるであろう。

利益相反：本報告は、シスメックスおよび栄研化学との共同臨床研究／試験の成果を含む。

文 献

- 1) 厚生労働省、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第12条第1項及び第14条第2項に基づく届出の基準等について」の一部改正について、(健感発0603第2号、2021年6月3日)(<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000788097.pdf>) (引用2022/2/28)
- 2) Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, et al. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007; **77** (6 suppl): 119-127.
- 3) Komaki-Yasuda K, Vincent JP, Nakatsu M, et al. A novel PCR-based system for the detection of four species of human malaria parasites and *Plasmodium knowlesi*. *PLoS One.* 2018; **13**(1): e0191886.
- 4) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**(12): E63.
- 5) 駒木-安田加奈子, 松本-高橋エミリー, 川合寛, 他. (2015): PURE/LAMP法のマラリア診断への応用. *Clin Parasitol.* 2015; **26**(1): 83-85.
- 6) Vincent JP, Komaki-Yasuda K, Iwagami M, et al. Combination of PURE-DNA extraction and LAMP-DNA amplification methods for accurate malaria diagnosis on dried blood spots. *Malar J.* 2018; **17**(1): 373.
- 7) Post A, Kaboré B, Reuling I, et al. (2019): The XN-30 hematology analyzer for rapid sensitive detection of malaria: a diagnostic accuracy study. *BMC Med.* 2019; **17**(1): 103.
- 8) 駒木-安田加奈子, 鈴木裕義, 阿部信彦, 他. 多項目自動血球分析装置XN-30による熱帯熱マラリア患者原虫血症評価. *Clin Parasitol.* 2017; **28**(1): 48-50.
- 9) 駒木-安田加奈子, 小西綾, 内橋欣也, 他. 多項目自動血球分析装置XN-30による非熱帯熱マラリア原虫の検出例. *Clin Parasitol.* 2019; **30**(1): 55-58.
- 10) 木村幹男. マラリアにおける診断と治療の現況. *感染症学雑誌.* 2002; **76**(8): 585-593.
- 11) 駒木-安田加奈子, 狩野繁之. マラリア診断法と新しい届出基準. *Clin Parasitol.* 2021; **32**(1): 7-14.

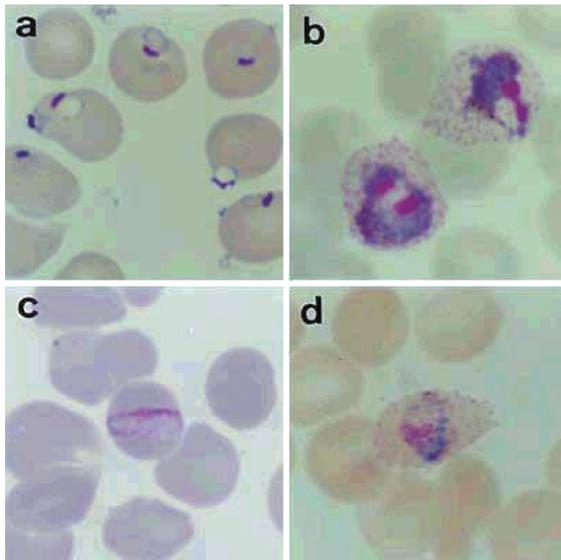


図3 鏡検による各種マラリア原虫像
(ギムザ染色薄層塗抹標本)

- a: 熱帯熱マラリア原虫のリングフォーム(輪状体)が見られ、寄生率の高い重症患者塗抹標本では、複数個寄生する赤血球もある。
- b: 三日熱マラリア原虫のアメーボイドボディー(アメーバ体)が見られ、感染赤血球は膨化し、非定型的な細胞質の形が観察される。シェフナー斑点も認められる。
- c: 四日熱マラリア原虫のバンドフォーム(帯状体)が見られ、感染赤血球は大きくなる。
- d: 卵形マラリア原虫の感染赤血球は卵形に膨化し、鋸歯状の辺縁が著明。形態的特徴は成書にあたること。

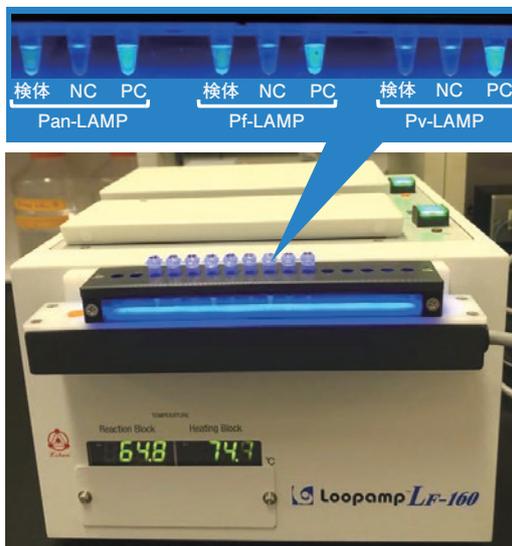


図6 LAMP法によるマラリア検査の例

Loopamp[®]蛍光測定部付恒温装置LF-160(栄研化学、東京)で反応終了後、チューブをUVランプ照射部で観察すると(下段写真)、その蛍光の有無でマラリア原虫の有無を判定できる(上段写真)。

LAMPのキットにはマラリア原虫全般(Pan)を検出するチューブ、熱帯熱マラリア原虫(Pf)を検出するチューブ、三日熱マラリア原虫(Pv)を検出するチューブが含まれている。この検体のLAMPの結果はPan(+)/Pf(+)/Pv(-)なので、熱帯熱マラリア原虫DNA陽性、三日熱マラリア原虫DNA陰性と判定できる。PCはポジティブコントロール、NCはネガティブコントロール。

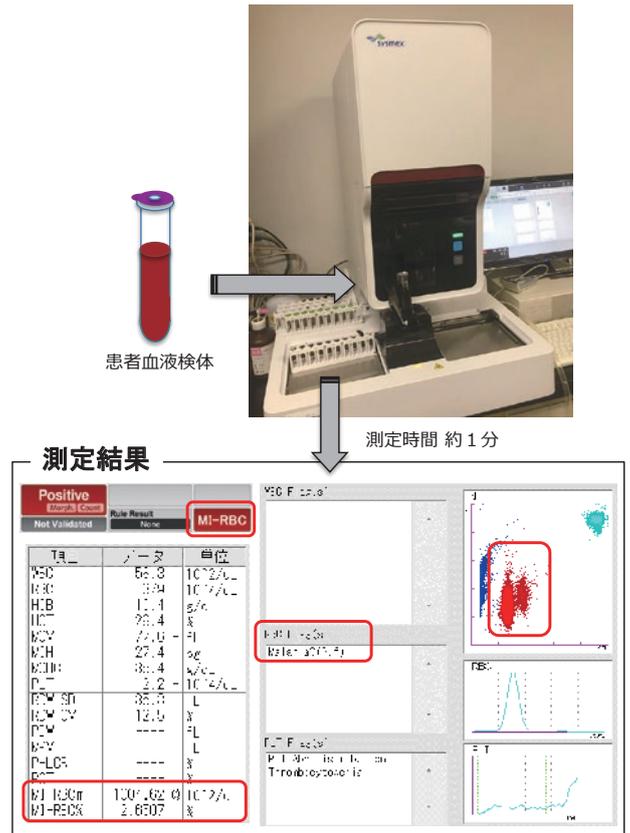


図7 XN-31によるマラリア検査

XN-31の装置の所定の場所に、患者血液検体の採血管をセットしてスタートボタンを押すと、cap piercing functionにより自動で必要量の血液(60μL)が吸引されて測定が始まり、約1分で結果を得ることができる。通常の血算のデータに加えて、マラリア原虫感染赤血球(MI-RBC)に関連する情報が得られる。

下段に示した測定結果の例では、(左下赤枠で囲った部分)MI-RBC#は血液1μLあたり1004.62×10⁶感染赤血球数、MI-RBC%(マラリア原虫感染赤血球の割合)は2.6507%を示している。

原虫種に関しては、(中央赤枠で囲った部分)にフラグging情報「Malaria?(P.f)」として熱帯熱マラリア原虫の存在が示唆されている。右側のスキヤットグラム中央部(右上赤枠で囲った部分)の赤い2つのクラスターが、マラリア感染赤血球の集合体を示す。

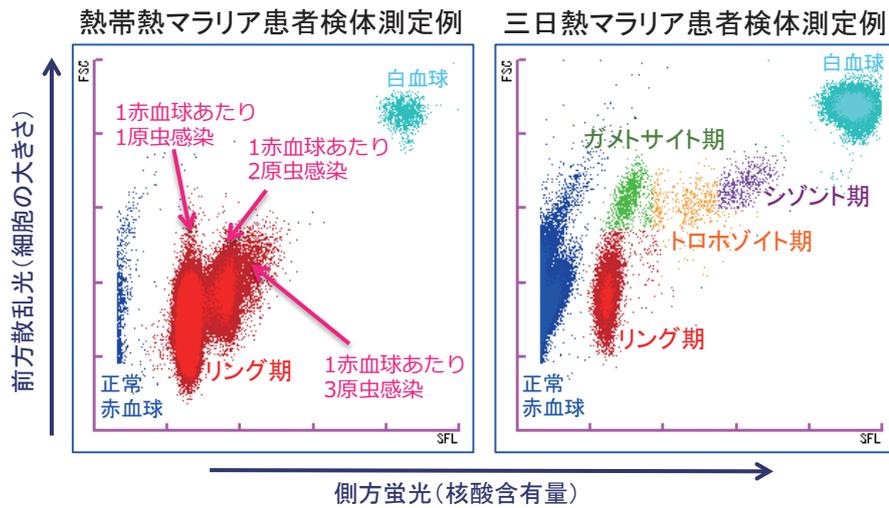


図8 XN-31測定によるスキャッタグラム

スキャッタグラムの横軸の側方蛍光の高低は細胞の核酸含有量を反映し、縦軸の前方散乱光の高低は細胞の大きさを反映する。各スキャッタグラムの左端に共通して現れる青色のクラスターは正常赤血球、右上の水色のクラスターは白血球の集合体を表す。

左側の熱帯熱マラリア患者検体測定例のスキャッタグラムに認められる赤色の3つのクラスターは、それぞれ1赤血球あたりの感染原虫数が1、2、3個の感染赤血球の集合体であることを示唆している。また、赤色のクラスターとして表示は、リング期(赤血球へ感染した後の幼若な栄養体の形態学的特徴から名付けられたステージ)の原虫の集合体を示唆している。

右側の三日熱マラリア患者検体測定例のスキャッタグラムに認められる赤色のクラスターはリング期、緑色のクラスターはガメトサイト期(雌雄に別れた有性の原虫ステージ)、オレンジ色のクラスターはトロホゾイト期(赤血球で増殖が進んだ後期の栄養体ステージ)、紫色のクラスターはシズント期(赤血球で分裂が開始・進行したステージ)の原虫感染赤血球の集合体であることを示唆している。