

マラリア

病原体検出マニュアル

2026 年 9 月 版

目 次

- 第 1 マラリアの概要
- 第 2 一般的な注意事項
- 第 3 検査材料の採取及び輸送
- 第 4 マラリア検査の進め方
- 第 5 顕微鏡による形態診断
- 第 6 分子生物学的診断法
 - 1. ヒト血液からの DNA 抽出
 - 2. 核酸増幅法 (Semi-nested PCR)
- 第 7 陽性コントロールの管理・使用について
- 第 8 迅速診断キットによる検査
- 第 9 参考文献
- 第 10 検査の相談窓口
- 第 11 執筆者一覧

第1 マラリアの概要

マラリアは、エイズ、結核と並ぶ世界三大感染症の一つであり、熱帯・亜熱帯地域を中心に流行する蚊媒介性感染症である。長年にわたり媒介蚊対策、抗マラリア薬の開発、ワクチン導入など様々な対策が進められてきたものの、依然として世界的な公衆衛生上の重要課題となっている。世界保健機関（WHO）の最新の報告では、2024年のマラリア患者数は約2億8,200万人、死亡者数は約61万人と推定され、死亡者の約95%はサハラ以南のアフリカ地域で発生している[1]。一方で、近年は感染者数が増加する国という観点では、タイ、ミャンマー、韓国などアジア地域の国々が該当するため注意が必要である。さらに薬剤耐性マラリア原虫の拡大、サルマラリア原虫の感染による人獣共通感染症の増加、殺虫剤抵抗性ハマダラカの拡大など、新たな課題も顕在化している。

マラリアは、病原体であるマラリア原虫の感染に起因する寄生虫疾患であり、ハマダラカによって媒介される。マラリアの臨床症状は、発熱・貧血・脾腫が主要な三大兆候とされるが、実際には様々な症状を複合的に呈する。具体的な症状としては、悪寒、頭痛、倦怠感、腹痛、関節痛、筋肉痛、下痢、黄疸などが認められる。また血小板減少、肝機能障害、出血傾向、アシドーシス、白血球増多・低下などが認められ、いずれも複合的な所見となることが多い。特に重症マラリアでは、劇的で急性の経過をとり、意識障害、痙攣や昏睡など重篤な脳症、急性腎不全、播種性血管内凝固症候群、肺水腫などを引き起こすことから、適切な処置を施さないと死に至るため注意が必要である。このため、流行地から帰国後に発熱を呈する患者では、マラリアを鑑別診断に挙げ、迅速な診断と適切な治療につなげることが重要である。

マラリア原虫は、ヒト体内でまず肝細胞内で増殖する肝内期を経て血流へ移行し、赤血球内で増殖する赤内期に入ることによって臨床症状を呈する。さらに一部の原虫は、生殖母体へと分化し、ハマダラカに吸血されると有性生殖に伴う減数分裂が行われ、次世代原虫を産生し、次のヒトへの感染が可能となる。マラリア原虫（*Plasmodium* 属）のうち、ヒトに感染するものとして、熱帯熱マラリア原虫：*Plasmodium falciparum*、三日熱マラリア原虫：*P. vivax*、四日熱マラリア原虫：*P. malariae*、卵形マラリア原虫：*P. ovale*、二日熱マラリア原虫：*P. knowlesi*の5種類が知られている。近年では、*P. cynomolgi*や*P. fieldi*などのサルマラリア原虫によるヒト感染も非常に多く報告されており、人獣共通感染症として渡航医学および公衆衛生上の重要性が高まっている。マラリア原虫種によって重症度や臨床経過、治療方針が異なることから、迅速かつ正確な原虫種の同定は、適切な治療および患者管理において極めて重要である。特に、熱帯熱マラリアでは診断や治療の遅れにより重症化し致死的となる可能性が高く、一方で三日熱マラリアおよび卵形マラリアでは肝臓細胞内に休眠体：hypnozoiteを形成し再発を生じることがあるため、原虫種を正確に判別することが重要となる。

日本では現在、国内での持続的な感染は認められておらず、報告される症例はすべて海外の流行地で感染した輸入マラリアである。しかし、国内には媒介可能なハマダラカが広く分布しており、輸入症例を感染源とする二次感染や、感染蚊が航空機などで持ち込まれる「エアポートマラリア」が過去に報告されている。このため、輸入症例の迅速な診断と適切な対応は、患者の救命だけでなく、公衆衛生上の観点からも極めて重要である。2007～2025年の国内届出データでは、輸入マラリアの約7割がアフリカ由来、約2割がアジア

由来であり、これらの地域への渡航歴は診断時の重要な情報となる。流行地で免疫を獲得していないナイーブな渡航者では、特に重症化しやすいことから、渡航歴の聴取は診断において極めて重要である。

感染症法では、マラリアは全数把握の四類感染症に指定されており、診断した医師は直ちに最寄りの保健所へ届出を行う必要がある。届出基準[2]では、「顕微鏡下での血液塗抹標本の観察によるマラリア原虫の確認」、「核酸増幅法による病原体遺伝子の検出」、および「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」が診断根拠として認められている。

マラリア迅速診断キット（Rapid Diagnostic Test：RDT）は、WHO が推奨する製品では高い感度・特異度を示すものが存在するが、国内では未承認であるため、補助的な診断法として位置付けられている[3]。2007～2025 年の国内届出における診断方法（重複回答可）の集計では、顕微鏡検査が 77.1%と最も多く、核酸増幅法は 3.5%、フローサイトメトリー法は 1.6%であった。PCR 法による診断は、2021 年以降増加傾向を示しており、新型コロナウイルス感染症流行時に整備された遺伝子検査体制の普及が影響した可能性が考えられる。

マラリアに関する最新の情報（2026 年）や感染動向、日本国内への輸入症例数の推移、媒介するハマダラカの最新情報、最新の治療薬やワクチン開発の情報などに関しては、「IASR Vol. 47, No. 8 (No. 558) August 2026」に特集記事として記載したので、参考にしたい。[IASR Vol. 47, No. 8 \(No. 558\) August 2026 マラリア 2007～2025 年 | 国立健康危機管理研究機構 感染症情報提供サイト](#)

本マニュアルでは、国内で実施されているマラリアの病原体検出法について、それぞれの原理、特徴および留意点を概説する。

第2 一般的な注意事項

マラリア原虫はバイオセーフティーレベル (BSL) 2 実験施設での取り扱いが必要であるが、患者または疑わしい患者由来等の検査材料を検査する場合は、病原体が確認されるまで BSL 1 以上の施設で検査を行ってもよい。

第3 検査材料の採取及び輸送

検査材料の採取及び輸送にあつては、次のとおりの確な材料を選んで安全に採取し、迅速かつ安全に検査室へ輸送する。

【ヒトの血液】

耳朶血、指頭血、静脈血のいずれかを EDTA などの抗凝固剤入りの採血管に採取したものを検体とし、検査に供する。

※検体の梱包については、WHO「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」に基づく基本3重包装の手順に従い確実に実施する。ゆうパックにより輸送する場合には、「感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について」（令和2年4月14日付け健感発 0414 第6号健康局結核感染症課長通知）を遵守する。

第4 検査の進め方

検査材料を受領した検査室では直ちに検査を実施する。
検査の概略は以下の通りである。

【ヒト血液】

マラリアの診断は、以下のいずれかの検査法を用いること。

- ・顕微鏡による形態診断：顕微鏡下でのマラリア原虫の検出、原虫種の確認（ギムザ染色法）
- ・分子生物学的診断法：遺伝子検査・核酸増幅法【Semi-nested PCR、real time PCR、Malaria-LAMP（原虫の検出：栄研化学株式会社）、ddPCR など】による病原体の遺伝子の検出
- ・多項目自動血球分析装置（フローサイトメトリー法）： XN-31（原虫の検出：シスメックス株式会社）
- ・迅速診断キット（RDT）：WHO の推奨が得られたキットに関しては、感度・特異性ともに非常に良い製品が多数存在するが、日本国内では未承認のため補助的方法に位置付けられる。[3] [Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 \(2016-2018\)](#)
【国立感染症研究所寄生動物部では、First Response® Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Card Test（Premier Medical）を最もよく使用しており、サルマラリア原虫の検出も含めて、多くの実績がある。】

本マニュアルでは、一般的なマラリアの病原体検査で広く用いられている二つの方法として、顕微鏡による形態診断のスタンダードである薄層塗抹標本を用いたギムザ染色法と、分子生物学的診断法である semi-nested PCR 法を紹介する。また、補助的な検査ツールとして有用な迅速診断キットについても併せて紹介する。

第5 顕微鏡による形態診断

顕微鏡による検査では、血液の薄層塗抹標本を作製し、メタノールで固定した後、ギムザ染色法を実施し、観察を行うのが最も標準的な方法として世界中で推奨・実施されている。以前は、アクリジンオレンジ法などを用いる場合があったが、原虫種の鑑別が難しく、検出感度としても最新の迅速診断キットの方が優れるため、本マニュアルでは記載しない。

●血液塗抹標本の作製

※採取後は速やかに血液塗抹標本を作製することが好ましい。

(1) 器材及び試薬等

- 1) スライドガラス
- 2) メタノール
- 3) メタノール固定用容器

(2) 操作手順

- 1) スライドガラスに血液(EDTA)を約5 μ l滴下する。
- 2) スライドガラス等を用いて血液を均等に広げ、薄層塗抹標本を作製する。
- 3) 速やかに乾燥させ、メタノールを入れた容器に浸け2～5分間固定する。

ギムザ染色法

(1) 器材及び試薬等

- 1) 光学顕微鏡
- 2) ギムザ染色液 (Sigma-Aldrich、1.09204.0100 など)
- 3) 10mM リン酸緩衝液 (pH7.2-7.4)
- 4) スポイト
- 5) ドライヤー

(2) 染色液の調製

染色液は用時調製とする。10mM リン酸緩衝液 (pH7.2-7.4) 1ml に対して市販のギムザ染色原液を1～1.5滴の割合で滴下・混合する。

(3) 操作手順

- 1) 薄層塗抹標本を水平に保ち、色素液をかける。
(多数の標本を同時に染色する場合には染色瓶を用いてもよい。)
染色時間は色素の希釈度によるが、10～30分間とする。
- 2) 塗抹した裏側から、水道水で洗浄する。
- 3) 洗浄後は速やかに水を切り、ドライヤー等を使用し冷風で乾燥させる。
- 4) 光学顕微鏡で、マラリア原虫に特異的な形態を観察する。
※観察は一般に油浸の100倍対物レンズを使用する。

表 マラリア原虫の寄生赤血球の特徴

		熱帯熱マラリア <i>P. falciparum</i>	三日熱マラリア <i>P. vivax</i>	卵形マラリア <i>P. ovale</i>	四日熱マラリア <i>P. malariae</i>
感染血球	大きさ	変化無し	大きい	大きい	小さい
	形	変化無し	変化無し	楕円形、 不正辺縁（棘状）	変化無し
	斑点	Maurer 斑点	Schüffner 斑点	Schüffner 斑点	なし
	球齢	すべて	幼弱	幼弱	老衰
血球内 原虫	原虫数（1 血球内）	2 原虫以上有する 場合がある	通常 1 原虫（ まれに 2 原虫の 場合がある）	通常 1 原虫	通常 1 原虫
	特徴的な栄養体	—	アメーバ状	アメーバ状	帯状体
	分裂体	末梢血中では 通常みられない	16～24 核	8～10 核	6～8 核
	生殖母体	鎌形	球形	球形	球形
原虫血症	平均原虫血症	1%	0.5%	0.05%	0.1%
	最大原虫血症	極めてまれだが 10%超の場合 もある	2%	2%	2%

・原虫種毎の写真に関しては、以下のサイト等の写真を参照のこと。

DPDx – Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern
<https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>

※Image Gallery のタブは標準的で、多くの写真を見ることができるため推奨する。

・原虫種ごとの比較やまとめの図に関しては、以下の論文に簡潔にまとめた図（Fig. 2）があるため、参照のこと。

Image analysis and machine learning for detecting malaria.
 Poostchi M, Silamut K, Maude RJ, Jaeger S, Thoma G.
 Transl Res. 2018 Apr;194:36–55. doi: 10.1016/j.trsl.2017.12.004.

第6 分子生物学的診断法（遺伝子検査）

1 ヒト血液からの DNA 抽出

本マニュアルでは QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いた抽出法を示す。

（1）器材および試薬等

- 1) QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. 51104)
- 2) エタノール (96~100%)
- 3) 1.5ml マイクロチューブ
- 4) マイクロピペット及びフィルターチップ
- 5) 遠心機
- 6) ウォーターバスまたはヒートブロック

（2）試薬の調製

- 1) Buffer AL に沈殿物がある場合は 56℃で溶解させ、使用前によく振る。
 - 2) Buffer AW1 に 96~100%エタノールを加える（添加量はボトルに記載の通り）。
 - 3) Buffer AW2 に 96~100%エタノールを加える（添加量はボトルに記載の通り）。
- ※いずれも室温で 1 年間安定であるが、使用はキットの有効期限までとする。

（3）操作手順（操作は全て室温で行う。Qiagen 社のマニュアルの通り。）

- 1) 1.5ml マイクロチューブの底に Proteinase K 20 μ l を入れる。
- 2) 1) のマイクロチューブに検体を 200 μ l 添加する。
- 3) 2) に Buffer AL を 200 μ l 添加し、15 秒間パルスボルテックスにより混和する。
- 4) ウォーターバスまたはヒートブロックで 56℃、10 分間インキュベートする。
- 5) 数秒間スピンドウンし、蓋の内側についた溶液を収集する。
- 6) エタノール (96~100%) を 200 μ l 添加し、15 秒間ボルテックスをした後、数秒間スピンドウンし、蓋の内側についた混合溶液を収集する。
- 7) 混合溶液 (620 μ l に相当する。) を QIAamp Mini Spin Column (以下、「カラム」とする。) に添加し、6,000 $\times$ g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 8) 7) のカラムを新しい 2ml コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- 9) カラムに 500 μ l の Buffer AW1 を添加し、6,000 $\times$ g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 10) 9) のカラムを新しい 2ml コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- 11) カラムに 500 μ l の Buffer AW2 を添加し、20,000 $\times$ g (14,000rpm) で 3 分間遠心分離する。
- 12) 11) のカラムを新しい 2ml コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- 13) 再度、20,000 $\times$ g (14,000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 14) 1.5ml マイクロチューブにカラムを移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
- 15) カラムに 100 μ l の Buffer AE を添加し、室温で 1 分間インキュベートする。
- 16) 6,000 $\times$ g (8,000rpm) で 1 分間遠心分離する。
- 17) 回収した溶液を、検体 DNA 抽出液とする。

2 核酸増幅法 (Semi-nested PCR)

本マニュアルでは、「Komaki-Yasuda K, Vincent JP, Nakatsu M, Kato Y, Ohmagari N, Kano S (2018) A novel PCR-based system for the detection of four species of human malaria parasites and *Plasmodium knowlesi*. PLoS ONE 13(1): e0191886, DOI: 10.1371/journal.pone.0191886」(以下、「Komaki-Yasuda 法」と記す) および「Kimura M, Kaneko O, Kiu Q, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol. Int.* 46: 91-95, 1997, [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(97\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(97)00013-5)」(以下、「Kimura 法」と記す) による報告を基にした検査法を示す。反応条件は Komaki-Yasuda 法を採用し、プライマー配列は卵形マラリア特異的なプライマーを除き Kimura 法を採用した。

Komaki-Yasuda 法並びに Kimura 法ではどちらも rRNA 遺伝子を標的としたヒトマラリア原虫のうち熱帯熱マラリア (*P. falciparum*)、三日熱マラリア (*P. vivax*)、四日熱マラリア (*P. malariae*) および卵形マラリア (*P. ovale*) の判別を行う。Komaki-Yasuda 法では従来の卵形マラリア *P. ovale curtisi* とアフリカに分布する variant type である *P. ovale wallikeri* の判別が可能であるが、マラリアの届出基準では両者の判別を行う必要はない。本マニュアルでは *P. ovale curtisi* と *P. ovale wallikeri* を同時に増幅するプライマーを紹介する。さらに近年ヒトへの感染が報告されているサル由来の *P. knowlesi* については、推定感染地域等を考慮し必要に応じて検査を実施する。巻末に、世界各地域で単離されたマラリアから rRNA の配列情報が NCBI のデータベースに登録されているもののアライメントとプライマーがアニールする配列を記す。

(1) 器材および試薬等

- 1) サーマルサイクラー
- 2) 電気泳動装置
- 3) UV 照射装置
- 4) ボルテックスミキサー
- 5) 遠心分離機
- 6) マイクロピペット
- 7) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 8) 滅菌マイクロチューブ
- 9) PCR 用チューブ
- 10) PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa, R050A または R050B)
- 11) 100bp DNA Ladder
- 12) 1.5-2.0% アガロースゲル
- 13) 6×Gel loading dye
- 14) 1×TAE 電気泳動バッファー; 50×TAE (ニッポンジーン社等) を 50 倍に希釈
- 15) エチジウムブロマイド染色液
- 16) Primer (表を参照)

Type of primer	Primer name	Sequence (5' -3')	Products (bp)
Universal	P1	ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT	136-159
Universal	P2	GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T	
Pf-specific	F2	CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG	100-106
Pv-specific	V1	CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A	
Po-specific	O2c	AAA GAA GCA ATC TAA GAA ATT TCC	
Pm-specific	M1	GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T	
Pk-specific	K1	GTT CTA ATC TCC GGA GAG AAA AGA AAA AC	

【参考】

Pk については、推定感染地域（インドシナ半島やボルネオ島周辺）や症状（Pk の場合、24 時間周期の発熱等）を考慮し、必要に応じて検査を実施する。

※各 Primer は TE で 100 μ M に調製（10 μ M に希釈する時は DW で調製する）したものを小分けして-80℃で冷凍保管しておくが良い。※Primer を合成委託する際にはカートリッジ精製を行うこと。

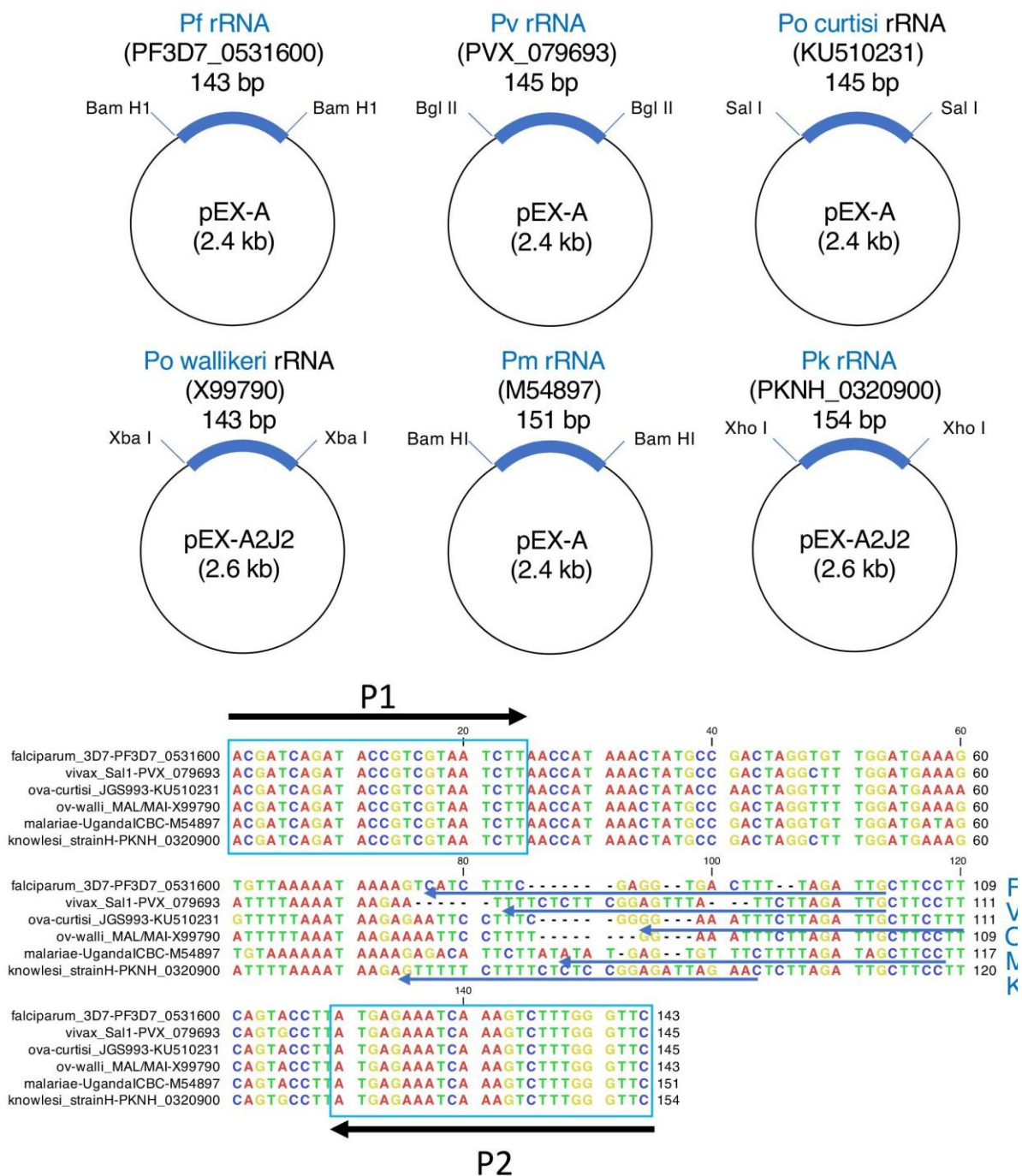


図 1、陽性コントロールの約 150bp の rRNA 遺伝子配列は、pEX-A (Pf, Pv, Poc, Pm) あるいは pEX-A2J2 (Pow, Pk) に Bam H1, Bgl II, Sal I, Xba I, Xho I のいずれかの制限酵素部位を付加して挿入した (上段)。挿入配列のアライメント (下段) には、1st PCR で使用する P1 と P2 のプライマーの位置を黒矢印で示し、2nd PCR で使用する種特異的なプライマーの位置を青矢印で示した。02c プライマーは 2 種の *P. ovale* (*curtisi* と *wallikeri*) に共通して使用できる。陽性コントロール配列は Komaki-Yasuda 法の配列と同一である。

(2) 操作手順

【1st PCR】

1) マイクロチューブに次表に従い反応液を必要量調製する。氷上で混和する。

(反応液)

試薬名	容量	最終濃度
5×PrimeSTAR GXL Buffer	4.0 μ l	1×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6 μ l	200 μ M each
P1 (10pmol/ μ l)	0.8 μ l	0.4 μ M
P2 (10pmol/ μ l)	0.8 μ l	0.4 μ M
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	0.4 μ l	
RNase free water	10.4 μ l	
計	18.0 μ l	

- 2) 調製後、泡立たない程度によく混和（軽くボルテックス、タッピング、ピペッティング等）し、スピンドウン（管壁や蓋についた試薬を落とす程度）する。
- 3) 反応液を PCR 反応チューブに 18 μ l ずつ分注する。
- 4) 反応液を分注した PCR チューブに陰性コントロール (DW)、検体 DNA 抽出液を各々 2 μ l ずつ加え、確実にキャップする。
- 5) **陽性コントロール (100 ng/ μ l) を、DW で 1,000 倍希釈する (0.1 ng/ μ l)。**
- 6) 反応液を分注した PCR チューブに希釈した陽性コントロールを 2 μ l 加え、確実にキャップする。
- 7) 管壁や蓋についた試薬を落とす程度スピンドウンし、PCR チューブに気泡がないことを確認後、サーマルサイクラーにセットし、次の反応条件により増幅をする。

(反応条件)

98°C、10sec	}	35cycles
60°C、15sec		
68°C、5sec		
↓		
4°C、 ∞		

【2nd PCR】

8) マイクロチューブに次表に従い反応液を必要量調製する。氷上で混和する。

(反応液)

試薬名	容量	最終濃度
5×PrimeSTAR GXL Buffer	4.0 μ l	1×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6 μ l	200 μ M each
P1 (10pmol/ μ l)	0.8 μ l	0.4 μ M
each specific inner primer (10pmol/ μ l)	0.8 μ l	0.4 μ M
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	0.4 μ l	
RNase free water	10.4 μ l	
計	18.0 μ l	

- 9) 調製後、泡立たない程度によく混和（軽くボルテックス、タッピング、ピペッティング等）し、スピンドウン（管壁や蓋についた試薬を落とす程度）する。
- 10) 反応液を PCR 反応チューブに 18 μ l ずつ分注する。
- 11) 1st PCR 増幅液を、DW で 1,000 倍希釈する。
- 12) 11) で希釈した増幅液を、陰性コントロール、検体、陽性コントロールの順に各々 2 μ l ずつ加え、確実にキャップする。
- 13) 管壁や蓋についた試薬を落とす程度スピンドウンし、PCR チューブに気泡がないことを確認後、サーマルサイクラーにセットし、次の反応条件により増幅をする。

（反応条件）

98°C、10sec	}	20cycles
60°C、15sec		
68°C、5sec		
↓		
4°C、 ∞		

- 14) 増幅後、6×Gel loading dye 1.4 μ l と 2nd PCR 増幅液 7 μ l をよく混合（ピペッティング）し、1.5–2.0%に調製したアガロースゲル（以下、「ゲル」とする。）のウェルに混合液を 7 μ l 入れる。
- 15) 電気泳動装置で 100V、30～40 分間、－から＋へ電気泳動する。
- 16) 泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液に入れ 15～30 分間染色する。
- 17) 染色後、ゲルを 5～10 分間水洗し、UV 照射装置で 260～300nm の UV を照射して写真撮影する。

(3) 結果の評価と判定

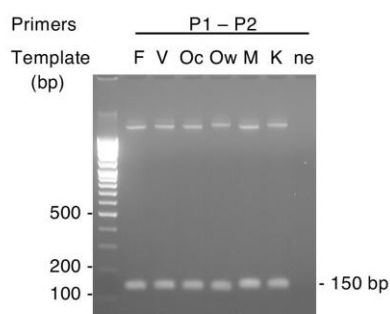
各々の型において標的となるサイズのバンドの存在の有無を確認する。

1) 精度管理（並行試験結果の評価と判定）

次の①及び②の条件がともに満たされた場合は、当該試験は良好であると判定する。
 なお、精度管理の結果が不良であった場合は、検査中のコンタミネーションなど事故の発生が推察されることから、各検査室でトラブルシューティングを行い、確実に原因を究明した上で再検査を行う。

- ① 各々の陽性コントロールについて、検査の対象とした目的遺伝子に特異なサイズと同等のバンド(約 100 bp)が増幅されることを確認する。
- ② 各々の陰性コントロールについて、検査の対象とした目的遺伝子に特異なサイズと同等のバンドが増幅されないことを確認する。

1st PCR, 0.2 ng template/reaction



2nd PCR

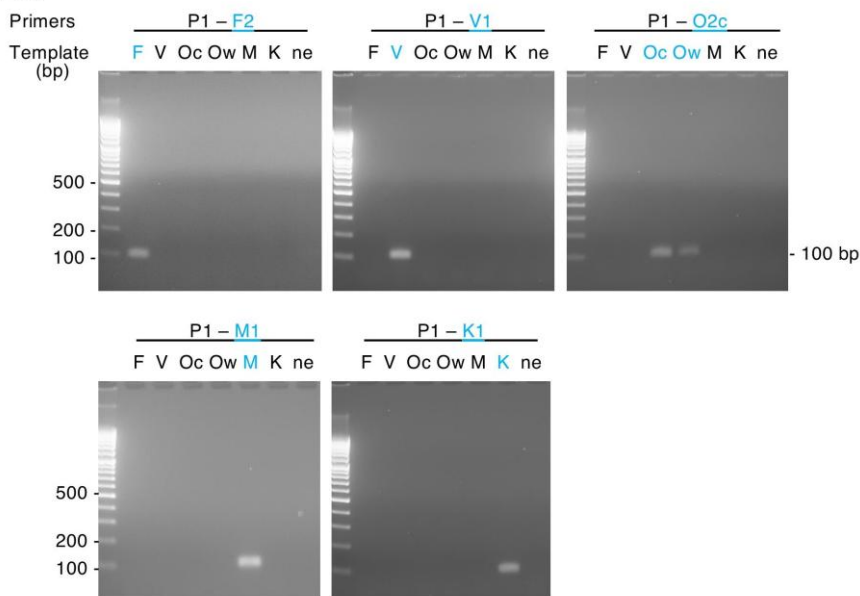


図2、陽性コントロールプラスミド(F, V, Oc, Ow, M, K) 0.2 ng は、約 2×10^6 コピーの rRNA 遺伝子に相当する(プラスミド 2.5 kb, 1 塩基対平均分子量 660 として計算)。 2×10^6 コピーの鋳型 rRNA は、おおよそ原虫率 1% の患者検体の検査に相当する(血中赤血球数 $5 \times 10^6 / \mu\text{l}$, 1 原虫に 1 遺伝子座位と仮定する)。陽性コントロールは更に 1,000,000 倍希釈した 0.2 fg (2 コピー) でも同様な結果を得ることができるため(data not shown)、クロスコンタミネーションの防止に配慮する。陰性コントロール (ne) では増幅されないことを確認する。

2) 検体 DNA 抽出液の結果の評価と判定

1) の精度管理の結果が良好であった場合は、検体の検査結果について評価と判定を行う。

- ① 陽性コントロールと同一の結果が得られた目的遺伝子を陽性とする。
- ② 陰性コントロールと同一の結果が得られた目的遺伝子を陰性とする。

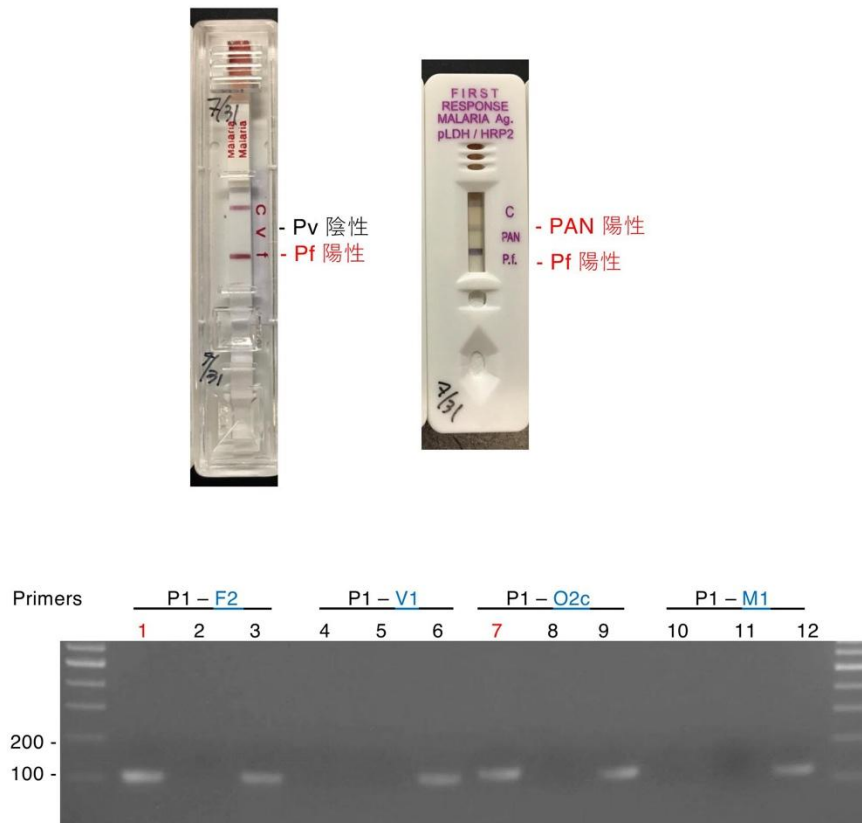


図3、迅速診断キットと Semi-nested PCR を組み合わせた検査の一例。患者血液検体を用いて、2つの異なる迅速診断キットを用いた検査を行った。Entebbe Malaria Cassette (図左上：熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum*; *f* と三日熱 *P. vivax*; *v* を検出) では、Pf のみが陽性であった。pLDH/HRP2 Combo Card Test (図右上：熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum*; *P. f.* と全てのマラリア原虫; PAN を検出) では、Pf と PAN が両陽性であった。よって、熱帯熱マラリア陽性、卵形マラリアあるいは四日熱マラリア陽性が強く示唆された。Semi-nested PCR の結果では (図下)、熱帯熱マラリアと卵形マラリアに相当するバンドが増幅された (検体: レーン1, 4, 7, 10. 陰性コントロール: レーン2, 5, 8, 11. 陽性コントロール: 3, 6, 9, 12)。

よって、熱帯熱マラリア陽性と卵形マラリアの重複感染であることが分かった。

第7 陽性コントロールの管理・使用について

遺伝子検査で使用する陽性コントロールの管理および使用について規定する。

※陽性コントロールは、本マニュアルの Semi-nested PCR 用のプラスミド DNA であり、他の核酸増幅法には使用できない。

陽性コントロール一覧

原虫種	濃度
Pf	100ng/ μ l
Pv	100ng/ μ l
Poc	100ng/ μ l
Pm	100ng/ μ l
Pk	100ng/ μ l

(1) 陽性コントロールの保管方法

100ng/ μ l の陽性コントロールを -20°C 以下の冷凍庫で保管する。100ng/ μ l より薄い濃度では保管しないこと。なお、100ng/ μ l の濃度であれば凍結融解を繰り返しても問題無いが、小分け分注などして保管をすることが好ましい。

(2) 陽性コントロールの使用方法

使用直前に、DW で 1,000 倍希釈して使用する。

(例) 陽性コントロール (100ng/ μ l) 0.5 μ l を DW 499.5 μ l で希釈。

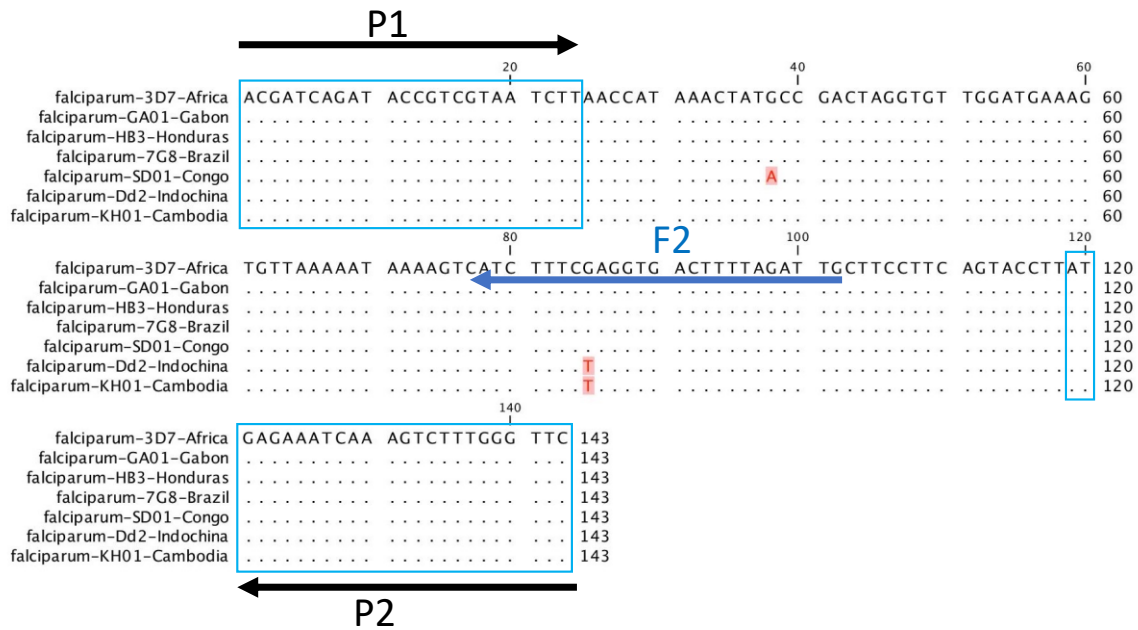


図4, アフリカ (3D7, GA01, SD01)、南米 (HB3, 7G8)、東南アジア (Dd2, KH01) で単離された熱帯熱マラリアの rRNA の増幅配列のアライメントを示す。同一のヌクレオチドはドットで示し、塩基置換を赤字でハイライトした。F2 は 2nd PCR で使用する熱帯熱マラリア特異的なプライマー配列。Accession Numbers: 3D7 (PF3D7_0531600), GA01 (PfGA01_050035900), HB3 (PfHB3_050036500), 7G8 (Pf7G8_050036700), SD01 (PfSD01_110050300), Dd2 (PfDd2_050036400), KH01 (PfKH01_050036800).

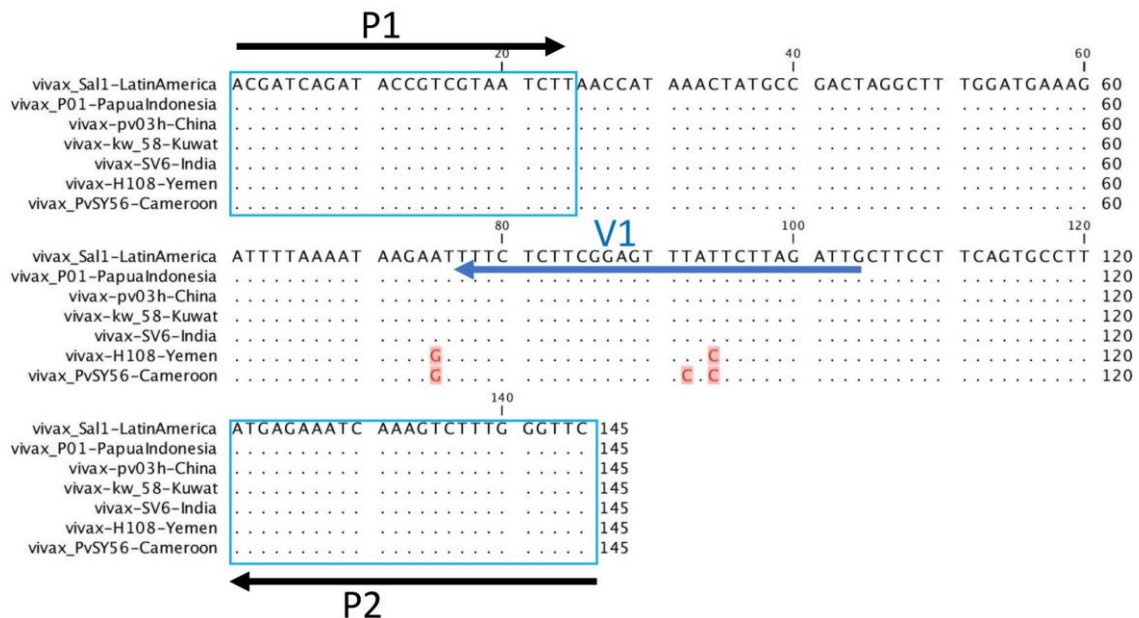


図5, アフリカ (Kw58, H108, SY56)、南米 (Sal1)、東南アジア (P01, pv03h, SV6) で単離された三日熱マラリアの rRNA の増幅配列のアライメントを示す。同一のヌクレオチドはドットで示し、塩基置換を赤字でハイライトした。V1 は 2nd PCR で使用する三日熱マラリア特異的なプライマー配列。Accession Numbers: Sal1 (PVX_079693), P01 (PVP01_0202900), pv03h (MT942982), kw58 (MZ293722), SV6 (JQ627158), H108 (HQ283225), PvSY56 (QMFC01000002).

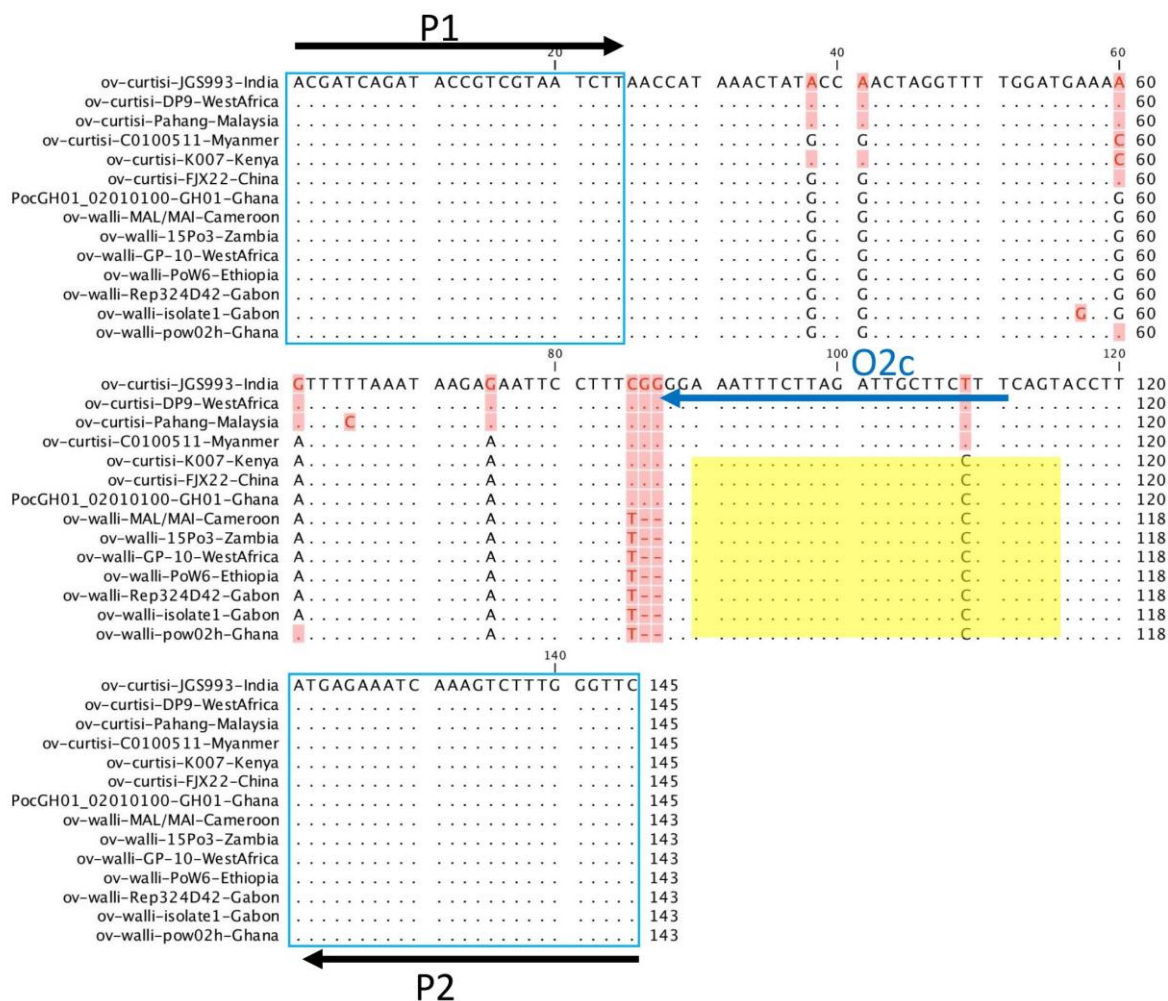


図6. アフリカ (DP9, K007, GH01, MAL/MAI, 15Po3, Rep324D42, isolate1, pow02h)、東南アジア (JGS993, Pahang, C0100511, FJX22) で単離された卵形マラリア (curtisi ならびに wallikeri) の rRNA の増幅配列のアライメントを示す。同一のヌクレオチドはドットで示し、塩基置換を赤字でハイライトした。O2c は 2nd PCR で使用する卵形マラリア特異的なプライマー配列。黄色は Kimura 法のプライマー O2 がアニールする領域。Accession Numbers: JGS993 (KU510231), DP9 (KF696377), Pahang (MK351321), C0100511 (KX672021), K007 (MZ927725), FJX22 (KJ871673), GH01 (PocGH01_02010100), MAL/MAI (X99790), 15Po3 (MN515141), GP-10 (KF696368), PoW6 (KF536876), Rep324D42 (MG847126), isolate 1 (KJ170102), pow02h (MT942989)。

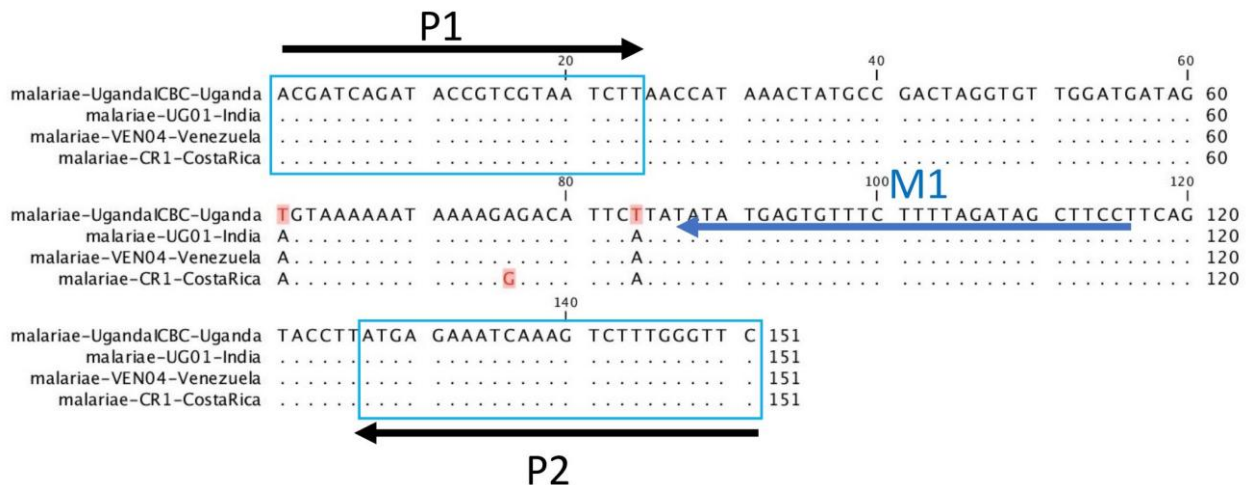


図7, アフリカ (UgandaICBC)、東南アジア (UG01)、南米 (VEN04, CR1) で単離された四日熱の rRNA の増幅配列のアライメントを示す。同一のヌクレオチドはドットで示し、塩基置換を赤字でハイライトした。M1 は 2nd PCR で使用する四日熱マラリア特異的なプライマー配列。Accession Numbers: Uganda1 CBC (M54897), UG01 (PmUG01_10013000), VEN04 (KJ619947), CR1 (KJ934251)。

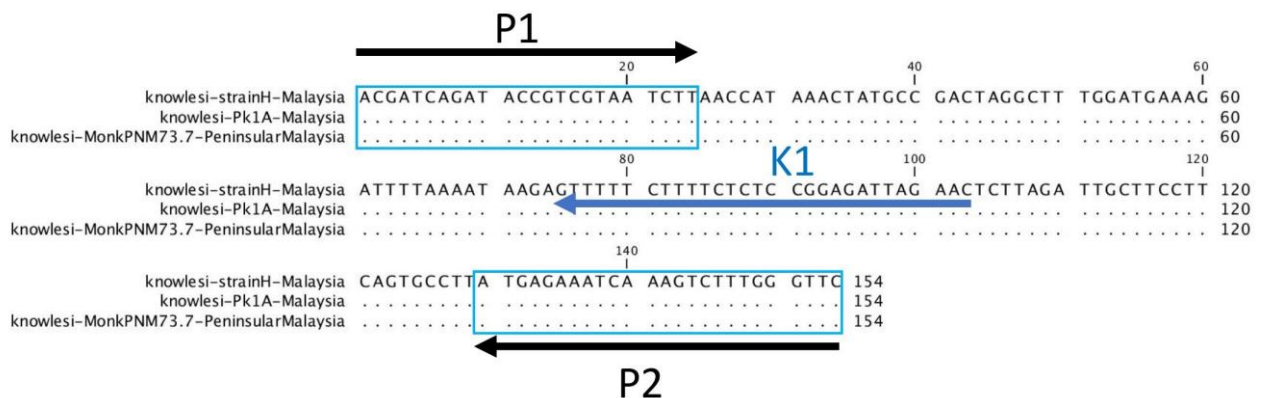


図8, インドシナ半島 (MonkPNM73.7)、ボルネオ島 (Pk1A, strainH) で単離された *P. knowlesi* の rRNA の増幅配列のアライメントを示す。同一のヌクレオチドはドットで示した。K1 は 2nd PCR で使用する *P. knowlesi* 特異的なプライマー配列。Accession Numbers: strain H (PKNH_0320900), Pk1A (PKN0H_S02313300), MonkPNM73.7 (KT852938)。

第8 迅速診断キットによる検査

マラリアの迅速診断キット（RDT）は、WHO の基準を満たしている製品であれば、非常に高感度にマラリア原虫を検出でき、方法も簡便であることから、補助ツールとしての使用を推奨する。ただし、日本国内では未承認のため補助的方法に位置付けられ、顕微鏡による形態検査や核酸増幅法などによる確定診断を必ず行うこと。

マラリアの迅速診断キットは、使用する抗原として Histidine-rich protein 2（HRP-2）と plasmodium lactate dehydrogenase（pLDH）が、一般的に用いられる場合が多い。

HRP-2 抗原検出は、熱帯熱マラリア原虫に対する検出感度が鋭敏であるが、患者血液に残る微量の HRP-2 も検出してしまう場合がある。また、三日熱マラリア原虫などに対する検出感度は低いため、原虫種の鑑別の抗原として優れている（つまり熱帯熱マラリア原虫の HRP-2 は特異性が高い）。

pLDH 抗原検出は、三日熱マラリア原虫に対する感度が HRP-2 検出より高く、また様々な原虫種の pLDH と交差する部位も含むため、マラリア感染を検出する抗原として優れている。また熱帯熱マラリア原虫に対しては交差性が低いことから、原虫種の鑑別の際に優れている。

使用する RDT キットの選定には、以下の WHO の報告書を参照のこと。 [3]

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276190/9789241514965-eng.pdf>

・使用するキット例

WHO の情報ならびに日本国内（国立感染症研究所など）の実績により、以下の 2 製品の使用を推奨する。

① First Response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Card Test

(Premier Medical Corporation Ltd)

熱帯熱マラリア (HRP-2) と全てのマラリア原虫 (pLDH) を検出

② Entebe Malaria Cassette

(Laboratorium Hepatika 社)

熱帯熱マラリア (HRP-2) および三日熱マラリア (pLDH) を検出

マラリアの迅速診断キットによる検査

- 1). 4～5μlの血液をサンプルウェルに加える(上)
- 2). バッファーを 6滴(Entebe)または 2滴(Combo) バッファールウェルに加える(下)
- 3). 10-15分間待つ
- 4). 判定

First Response Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Card Test
Rapid One Step Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Test

Premier Medical Corporation Ltd.
32-35, Shree Ganesh Ind. Estate, Kachigam, Near Dahanu, Dahanu - 396 215, INDIA.
Tel: +91 260 2294432 • E-mail: info@premiermedcorp.com
Website: www.premiermedcorp.com • www.premiermedcorp.in

熱帯熱(Pf) と全てのマラリア原虫(PAN)を検出

Entebe
Malaria Cassette

LABORATORIUM HEPATIKA
Jl. Raya Garuda, No. 1, Kuningan, Cirebon 47132
Telp. 0326-222222, Fax 0326-222222, Email: info@hepatika.com

熱帯熱(Pf) と三日熱(Pv)を検出

操作はキットに添付されている取扱説明書に従って行うこと。

第9 参考文献

- [1] World malaria report 2025.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240117822>
- [2] 届出基準
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-33.html>
- [3] The role of RDTs in malaria control
<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis/rapid-diagnostic-tests/role-in-malaria-control>
- [4] 「検疫法に基づく検査実施区分等について」（検疫所業務管理室長通知）
- [5] 「港湾区域等衛生管理業務の手引きについて」（検疫所業務管理室長通知）
- [6] マラリア検査マニュアル 国立感染症研究所 2012 年 7 月版
- [7] DPDx – Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern
<https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- [8] Image analysis and machine learning for detecting malaria. Poostchi M, Silamut K, Maude RJ, Jaeger S, Thoma G. Transl Res. 2018 Apr;194:36–55. doi: 10.1016/j.trsl.2017.12.004.
- [9] Kimura M, Kaneko O, Kiu Q, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol. Int.* 46 : 91–95, 1997.
- [10] Komaki-Yasuda K, Vincent JP, Nakatsu M, Kato Y, Ohmagari N, Kano S (2018) A novel PCR-based system for the detection of four species of human malaria parasites and *Plasmodium knowlesi*. PLoS ONE 13(1): e0191886

第10 検査の相談窓口

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-2 3-1

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物部 第三室

案浦健（あんのうらたけし）、中野由美子（なかのゆみこ）、荒木球沙（あらきたまさ）

E-mail: annoura.t@jihs.go.jp saito-nakano.y@jihs.go.jp araki.t@jihs.go.jp

Tel: 03-5285-1111（内線 2735）

第11 執筆者一覧

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物部

案浦 健、中野 由美子、荒木 球沙、梅木 優子、久枝 一