

マラリア

目次

I. マラリアの概説

- 1) マラリアとは ー世界と日本における状況ー
- 2) マラリアの病態
- 3) マラリアの診断と治療

II. マラリア検査の進め方

- 1) マラリアの顕微鏡による形態診断
- 2) マラリアの迅速診断キットによる検査
- 3) マラリアの遺伝子検査

III. 参考文献

IV. 検査の問い合わせ

V. 執筆者一覧

I. マラリアの概説

1) マラリアとは ー世界と日本における状況ー

マラリアの病原体は *Plasmodium* 属の原虫で、ヒトに感染して臨床的問題となるのは、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*) の4種類とされてきたが、最近、マカク属のサルで感染が問題となっていた *P. knowlesi* のヒトでの集団感染例が、東南アジアで報告されている。ただし、前4種のマラリア原虫が、媒介動物であるハマダラカ (*Anopheles* 属) とヒトの間で生活環がまわるのに対し、*P. knowlesi* ではヒト→蚊→ヒトの自然感染は、まだ報告されていない。

マラリアは世界100カ国余りでみられ、世界保健機構 (WHO) の推計によると、年間2億人以上の罹患者と200万人の死亡者があるとされる¹⁾。死亡例の大部分はサハラ以南アフリカにおける5歳未満の小児である。アフリカ以外では、熱帯アジアや南太平洋諸島、中南米などにおいても多くの発生がみられる。重症化しやすく死亡率も高い熱帯熱マラリアは、アフリカやアジア・太平洋地域の熱帯地域が流行の中心だが、三日熱マラリアは、韓国や中国といった温帯地域でも問題になっている。黒人は遺伝的に三日熱マラリア原虫に感染しにくく、従来、三日熱マラリアの流行は、アフリカではないとされたが、アジア系住民の流入増加もあって、東アフリカを中心に感染者の報告がみられるようになった。熱帯熱マラリアと三日熱マラリアの両方がみられる地域では、マラリア対策が進むにつれ、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアに移っていく現象がみられ、現在、東南アジアや中南米ではマラリア患者数が減少するとともに、相対的に三日熱マラリアの比率が増している。卵形マラリアや四日熱マラリアは、熱帯熱マラリアや三日熱マラリアに比して感染者数は少ない。

旅行医学の領域でもマラリアは重要な疾患で、全世界では、旅行者が帰国してから発症する例が年間3万人程度あるとされる。特に、マラリアに対して免疫がない旅行者では、致命的となることも稀ではなく、的確な診断と治療が求められる。日本国内での報告数は、1990年代増加傾向を示し、2000年には年間154例に達したが、最近では年間50~70例とやや減少している²⁾。国内での報告例は、感染症法施行後は輸入例のみだが、輸血 (保存血、血小板、交換輸血)、針刺し事故などによる感染も起こり得るので、検査検体を取り扱う際にも注意

を要する。また、マラリア原虫を媒介する *Anopheles* 属の蚊は、日本国内にも生息しており、同じように国内に媒介蚊が生息するデング熱やチクングニア熱と同様、検疫法の対象疾患となっている。もっとも、最近の温暖化傾向の中で、特に媒介蚊の生息地拡大や生息数増加を指摘する報告はない。

感染症法では、マラリアは四類感染症であり、診断した医師は直ちに最寄りの保健所に届け出なければならない。報告のための基準は以下の通りである。

○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がなされたもの。

- ・病原体の検出

- 例 血液塗抹標本による顕微鏡下でのマラリア原虫の証明と、鏡検による虫種の確認など

- ・病原体の遺伝子の検出

- 例 PCR 法など

2) マラリアの病態

マラリア流行地で育ったわけではなく、マラリアに免疫のない (non-immune) ヒトが初感染した場合、発熱はほぼ必発といってよく、原虫侵入後の潜伏期は熱帯熱マラリアで 12 日前後、四日熱マラリアは 30 日前後、三日熱マラリアと卵形マラリアでは 14 日前後である。ただし、流行地で生まれ育ち、何度もマラリアに罹患して免疫を得ている者 (semi-immune) では、発熱などの症状が軽度しかみられないこともある。また、三日熱マラリアの場合は、non-immune でも 1 年以上、はっきりした症状もなく過ごすことがある。

潜伏期間の後、悪寒、震えと共に熱発作で発症する。この熱発作の間隔は、四日熱マラリアで 72 時間ごと、三日熱・卵型マラリアで 48 時間ごと、熱帯マラリアでは不定期で短い。*P. knowlesi* 感染では 24 時間ごとと言われている。発熱に伴い、倦怠感、頭痛、筋肉痛、関節痛などがみられるが、腹部症状（悪心・嘔吐、下痢、腹痛）や、呼吸器症状が目立つこともあり、マラリアを疑わないと、風邪やインフルエンザと誤診されることになる。一般検査所見では血小板減少、LDH 上昇などが高頻度に見られる²⁾。貧血は、病初期にはみられないことも多い。熱帯熱マラリアで重症化すると脳症、腎症、肺水腫/ARDS、DIC 様出血傾向、重症貧血、代謝性アシドーシス、低血糖、黒水熱（高度の血色素尿症）など種々の合併症を生じ、致命的となる³⁾。

3) マラリアの診断

血液塗抹標本を染色し、光学顕微鏡で検査する形態学的診断法が **gold standard** である。塗抹標本には厚層塗抹と薄層塗抹があり、理論上は厚層塗抹の方が多くの血液量を検査できるので診断感度が高く、途上国のマラリア流行地では一般的である。日本国内では、一般的に行われる血球の形態検査と同様、複数の血液薄層標本を作製し、鏡検する方が実際的だが、いずれにしる顕微鏡検査での診断精度は、検査者の経験と技量によるところが大きい。また、主に熱帯熱マラリアを対象とした特異抗原検出用キットも開発されており、経験がなくても 15 分程で迅速に診断できる。遺伝子を用いた診断法としては、PCR 法や LAMP 法が、日本国内の複数の研究室で開発されている。

さらに、実際の診断にあたっては、患者の行動歴や臨床情報とならんで世界的なマラリアの疫学的状況の把握も重要となる。熱帯地域から帰国後の熱性疾患では、デング熱などのアルボウイルス感染との鑑別が重要だが、マラリア原虫を媒介する *Anopheles* 属の蚊は、アルボウイルスを媒介する *Aedes* 属の蚊と異なり、都市環境では生息できない。アフリカやインド等の一部の国を除き、日本人が、熱帯の都市に滞在しマラリアに罹患する可能性はかなり低い。また、発熱以外に消化器症状が前面に出た場合は、腸チフスとの鑑別が問題となる。

マラリアの治療は、急性期治療と根治的治療に分けて考えることができる。急性期治療としては、長く使われてきたクロロキンに代わり、耐性が問題となっている熱帯熱マラリア以外にも、短期作用型のアルテスネートと長期作用型の他剤を組み合わせた合剤が利用されることが多くなった。熱帯熱マラリアの合併症に対し、病態に合わせた補助的治療が必要なのは、他の重症疾患と同じである。また、三日熱マラリアと卵形マラリアの場合は、急性期治療の後に、肝臓に潜む休眠体の原虫を殺滅する根治療法として、プリマキンの投与が必要となる。マラリアの治療については、世界的に大きく変化しており、詳細は毎年更新される国際保健や旅行医学の文献で、最新の情報を入手して頂きたい⁴⁾。

II. 検査の進め方

1) マラリアの顕微鏡による形態診断

1. 検査材料の採取

採血の要点 耳朶血、指頭血、静脈血のいずれでもよい。

- ・採血後は速やかに塗抹標本作製すべきである。ギムザ液の染色性への影響を考えると、血液凝固阻止剤はEDTAを使用することが望まれる。

2. 標本の作製

- ・薄層塗抹標本作製手順は、通常 of 血球の形態検査で行う際と同じでよい。
- ・速やかに乾燥させ、メタノールで 2 - 5 分間固定する。固定過多は染色性を損なうこともある。

3. 染色液の調整と標本の観察

A ギムザ染色法

① 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。色素の析出を防ぐ目的で、色素液の希釈に際しては強い攪拌を避ける。一般に血液像の観察では pH6.4 程度のわずかに酸性の緩衝液を用いるが、原虫の形態観察には pH7.2 - 7.4 に調整した染色液が適当である。pH7.2 付近で安定しているようであれば水道水をそのまま用いてもよい。本染色液では赤血球が青色を帯びた色調となる。ギムザ染色の代わりにライト染色を用いてもよい。ライト-ギムザ染色、あるいはメイ・グリュンワルド-ギムザ染色などの二重染色法では細胞質の染色性が向上し、マラリア原虫の顆粒観察に適している。

② 染色の手順

- 1) メタノール固定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。
- 2) 染色時間は色素の希釈度によるが、10 - 30 分間とする。染色時間は 45 分が最長で、染色時間をそれ以上延長しても色調は変わらない。特に濃染したい場合には、染色液を新調して染め直す。
- 3) 染色濃度は緩衝液による洗浄時間で調整する。
- 4) 洗浄後は速やかに水を切り、冷風で乾燥する。
- 5) 繰り返し観察をする場合、カバーガラスをかけて永久標本作製する。
- 6) 顕微鏡観察は一般に油浸の 100 倍対物レンズを使用する。マラリア原虫は細胞質が淡青紫色、核が赤紫色に染まる。

B アクリジンオレンジ Acridine Orange (AO) 染色

① 染色液の調整

市販の Acridine Orange 染色液 (和光純薬) を使用できる

調整する場合 アクリジンオレンジ 5.0 mg グリセリン 2.5 g
10mM リン酸緩衝液 (pH7.0-7.5) 47.5 ml

調整済みの市販薬、調整した場合、いずれも遮光して冷暗所で長期保存が可能。

② 染色の手順

- 1) カバーガラスをろ紙などの上に置き、少量のアクリジンオレンジ溶液を1滴たらす。
- 2) アクリジンオレンジ溶液を載せたカバーガラス 1) を、薄層塗抹標本 (メタノール固定したもの) に軽く押し付ける。(約1秒間) このとき、余分な染色液はろ紙に吸収させる。
- 3) 蛍光顕微鏡で鏡検。B 励起 (450-490nm) / 広域帯フィルター (520nm 以下カット) の組み合わせで観察を行う。核: 緑~黄色、細胞質: 鮮やかな橙色の蛍光を発する。

ハロゲンランプを光源とする通常の顕微鏡に特殊干渉フィルター (協和光学製) を装着して観察することも可能だが、多目的な用途で使用される顕微鏡で、観察のたびに装着し直すのはあまり実際的ではない。

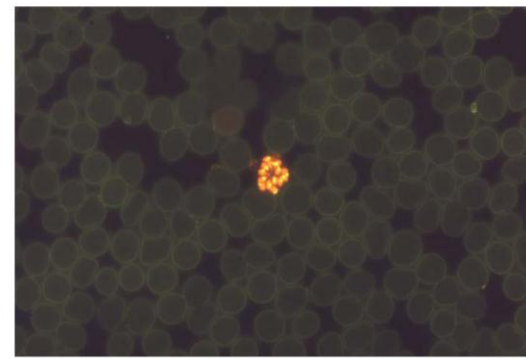
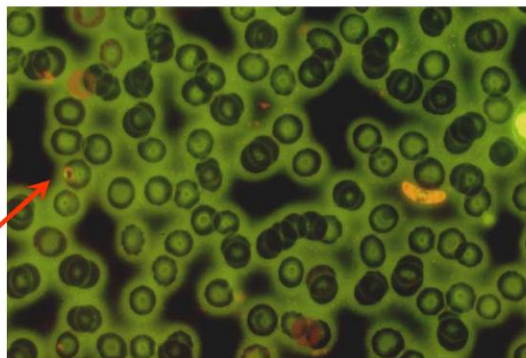
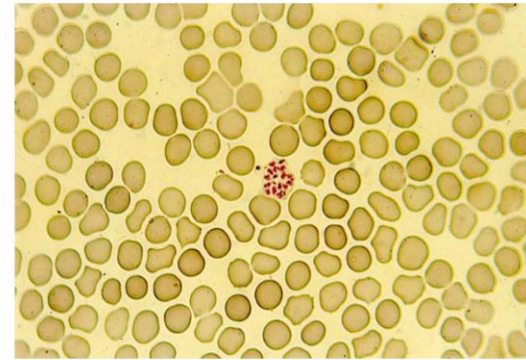
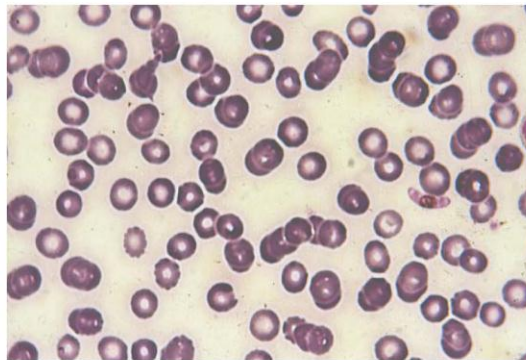
4. ギムザ染色とアクリジンオレンジ染色の比較, 検査上の注意点

表1に4種類のマラリア原虫の顕微鏡的形態診断の比較を示す。原虫密度の低い例では、前期栄養体の形態のみでの鑑別診断は難しい。また、ギムザ染色では、染色液のむらや血小板の重なりを、輪状体と区別するのは、意外にたいへんである (図1, 2)。アクリジンオレンジ染色では、Schfunner 斑点や Mauer 斑点は染まらないが、蛍光顕微鏡で観察すると、核: 緑~黄色、細胞質: 鮮やかな橙色 と染色され、網状赤血球以外は染色されない赤血球を背景として、マラリア原虫や白血球の核酸部分が浮かび上がってくる (図1, 2)。形態診断に関しある程度の予備知識があれば、油浸レンズを使うことなく、400倍で広い範囲を鏡検できるので、アクリジンオレンジ染色は、低原虫密度の例での検査にも有用である。重症度の判定には、原虫密度以外に形態観察も重要である。熱帯熱マラリアでは、原虫密度が高くなっても通常分裂体がみられることはなく、観察された場合は、脳症など致死的な病態となっていることが多い (図3)。

表1 4種類のマラリア原虫の寄生赤血球の特徴

	熱帯熱マラリア	三日熱マラリア	四日熱マラリア	卵形マラリア
感染血球 大きさ 形 斑点 球齡	変化なし 変化なし Mauer 斑点+ すべて	大きい 変化なし Scuffner 斑点++ 幼弱	小さい 変化なし なし 老衰	大きい 橢円形, 辺縁不正 Scuffner 斑点++ 幼弱
血球内原虫 数 特徴的な栄養体 分裂体 生殖母体	1, 2 時に3 末梢血中は通常(-) 鎌形	1 アメーバ状 16~24 核 球形	1 帯状体 6~8 核 球形	1 アメーバ状 8~10 核 球形
原虫血症 平均原虫血症 最大原虫血症	1% 40%超のこともある	0.5% 2%	0.1% 2%	0.05% 2%

熱帯熱マラリア原虫の輪状体:
Ring form

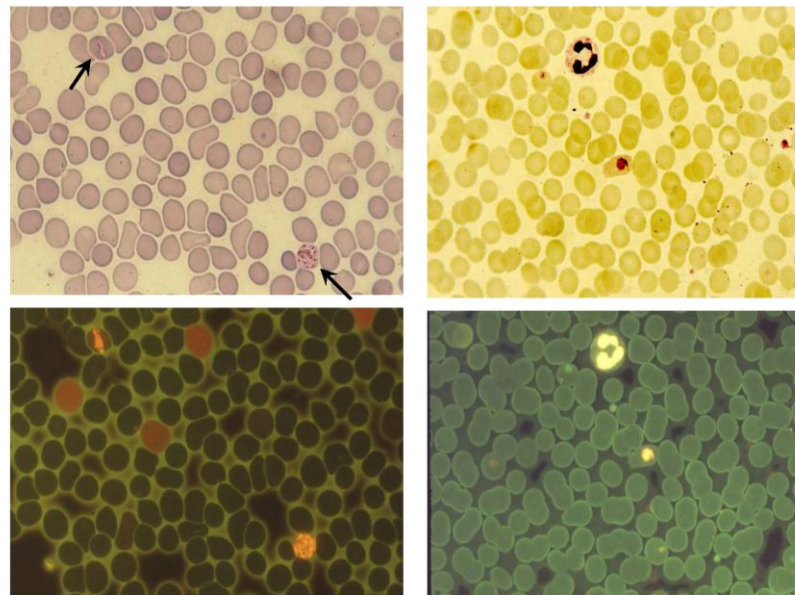


熱帯熱マラリア原虫

三日熱マラリア原虫

図1 ギムザ染色(上段)とアクリジンオレンジ染色(下段)の比較
(協力 川本 文彦 博士)

熱帯熱マラリア原虫の輪状体・生殖母体 と 三日熱マラリア原虫の分裂体
熱帯熱マラリア原虫の輪状体は、ギムザ染色ではっきりしない。



四日熱マラリア原虫

卵形マラリア原虫

図2 ギムザ染色(上段)とアクリジンオレンジ染色(下段)の比較

(協力 川本 文彦 博士)

四日熱マラリア原虫の帯状体・分裂体 と 卵形マラリア原虫のアメーバ体
 四日熱マラリア原虫の帯状体は、ギムザ染色ではっきりしない。また、染色の
 ムラや血小板の重なりは、ギムザ染色では、輪状体と区別しにくい。

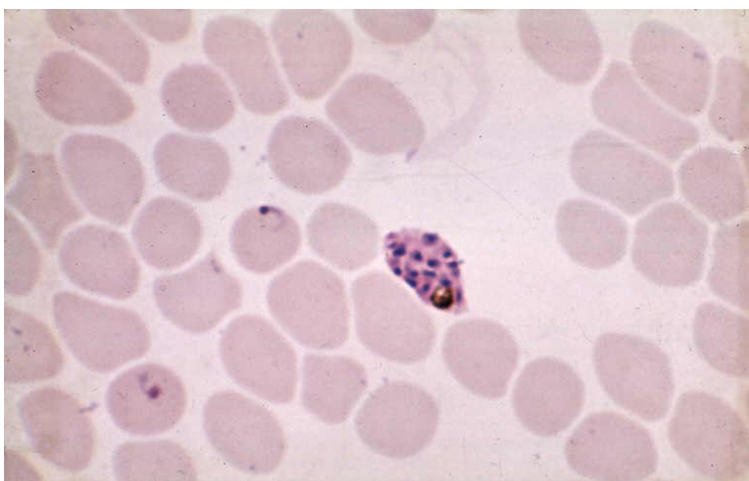


図3 熱帯熱マラリア原虫の輪状体と分裂体

この感染例では、血液採取直後から意識障害が生じたという。

2) マラリアの迅速診断キットによる検査

1. 使用の原則

現在、世界的には、マラリアの迅速診断キット **Rapid Diagnostic Test Kits (RDTs)**として、100種類以上のキットが販売されているが、その品質はまちまちで、WHOは、原虫密度100/ μ l以上での検出を標準としている⁵⁾。免疫クロマト法によってマラリア原虫特異抗原を検出するという原理は共通だが、検出する原虫の種や標的とする蛋白質の違いや組み合わせは様々である。現在、顕微鏡による診断が困難な流行地のヘルス・ポストのみならず、非流行国でのトラベル・クリニックなどでも広く利用される。ただ、日本国内で臨床試験薬として認可されている製品はなく、国内での使用については、顕微鏡的形態検査などによる確定診断の補助として用いるのが原則である。

2. 使用している抗原と特性

Histidine-rich protein 2 (HRP-2)を検出するキットおよび、マラリア原虫の細胞内代謝酵素plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH)を検出するキットに大別される(表2, 図4)。また、致命的となり得る熱帯熱マラリアと他のマラリアをマラリア原虫とを、15分程度で区別して検出できることを一義的に考えている(図4, 5)。最近になって、両方の抗原を使用するキットも臨床応用されている。

表2 各種マラリア迅速診断キットが検出する抗原

ICT Malaria P.f./P.v.	Detection of Histidine rich protein- 2(HRP-2)
Opti MAL	Detection of Parasite lactate dehydrogenase(pLDH)
Malraia Ag Pf/Pan	Detection of HRP-2 and pLDH
Entebe Malaria	Detection of HRP-2 and pLDH of <i>P. vivax</i>

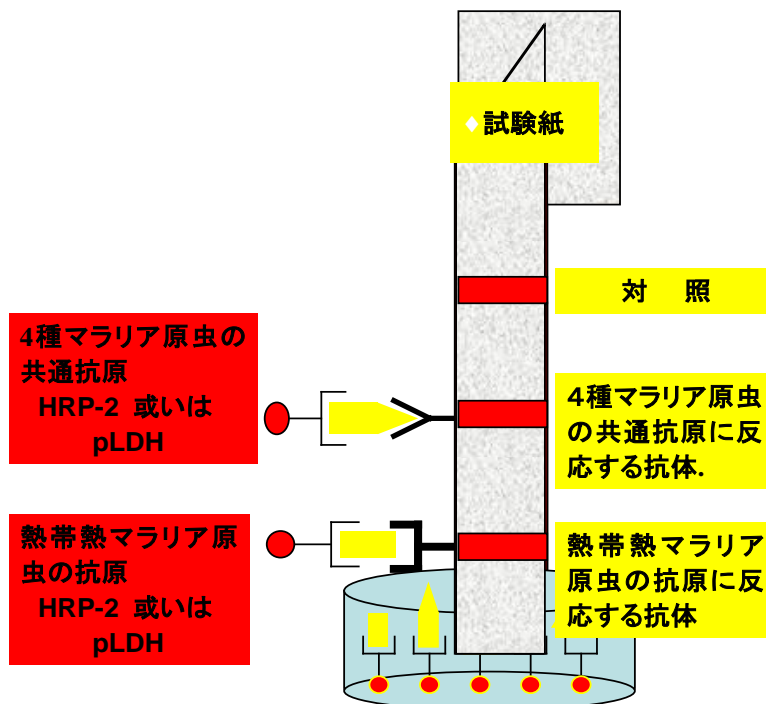


図4 イムノクロマト法によるマラリア迅速診断キットの原理

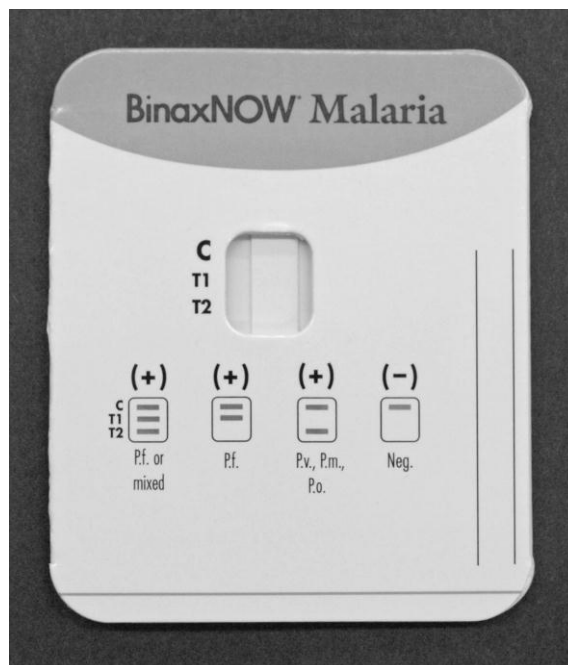


図5 マラリア迅速診断キットの例

診断結果は、血液滴下後のラインの有無で判定。熱帯熱マラリアでは種の区別できるが、他のマラリアについては種の区別ができないキットが多い。

各々のマラリア原虫抗原検出キットにはそれぞれ特性があり、実際の使用に際してはその特性を把握した上で使用する必要がある。HRP-2を検出するキットでは、熱帯熱マラリア原虫に対する検出感度が鋭敏で、患者血液中に残る微量のHRP-2も検出することから治療効果の判定には適していないことと、三日熱マラリア原虫に対する検出感度が低いことがあげられる。一方、pLDHを検出するキットでは、三日熱マラリア原虫に対する感度はHRP-2を検出するキットよりも高い反面、熱帯熱マラリア原虫に対しては感度が低い。この傾向は、pLDHの検出キット(OptiMAL®: DiaMed GmbH, Switzerland)とHRP-2の検出キット(BinaxNow Malaria®: Inverness Medical Inc., USA)を比較した、熱帯の流行地での *in vivo* 調査や培養した原虫やマラリア原虫感染者の希釈した血液を用いた *in vitro* 検査でも確認されている⁶⁾。

上記の特性を生かして現在では、HRP-2とpLDHの両方を検出するキット、Malaria Ag P.f/Pan (SD of Bio Venture, Korea)や熱帯熱マラリア原虫に対してはHRP-2、三日熱マラリア原虫に対してはpLDHを検出するキット、Entebe Malaria (Laboratorium Hepatika, Indonesia)も製品化されており、やはり1種類の抗原を検出するキットに比して感度はよい。しかし、いずれのキットを用いたとしても、血中原虫密度が $100/\mu\text{l}$ 以下の低原虫密度の例では、信頼性は著しく低下する。また、*P. knowlesi*感染については、OptiMALでは熱帯熱マラリア、Entebe Malariaでは三日熱マラリアと誤った結果を示した⁷⁾。

3) マラリアの遺伝子検査

1. 遺伝子検査の意義

マラリアの確定診断は血液塗抹標本の顕微鏡観察による形態学的検査が基本となる。しかし顕微鏡観察によるマラリア原虫の検出は検査者の経験と技量に左右され、赤血球に寄生する原虫数が少なく、各種に典型的な虫体像を認めない場合は形態学的検査による種同定にも限界がある。最近、第5のヒトマラリアと提唱され注目される *P. knowlesi* の赤内型虫体の形態も、ヒトに寄生する他種マラリアと類似し、顕微鏡観察のみによる種鑑別は非常に難しい。本マニュアルではヒトに寄生する4種の診断法を始めに紹介し、次に、国内への輸入例が今後増加する可能性がある *P. knowlesi* のPCR法による種鑑別についても紹介する。さらに、施設によってはPCR法よりも施行しやすいLAMP法についても、4種のマラリアを診断する方法について、簡単に紹介

する。遺伝子検査の流れとしては、①形態学的検査でマラリアの種鑑別が困難な場合に遺伝子検査を行う、②nested PCR でマラリア 4 種の鑑別を試みる、③マラリア 4 種とも陰性の場合、*Plasmodium* 属特異的 second PCR を行い、特異サイズの産物が増幅されるかどうか確認する。といった一連の手順が考えられる。

2. 方法

① 検体からの DNA 抽出

検体には患者全血を用いる。全血からの DNA 分離は QIAGEN 社の市販キット (QIAamp DNA Mini Kit、QIAamp DNA Blood Kit、DNeasy Blood and Tissue Kit など) の利用が便利で、これらのキットは全血に血液凝固防止剤 (クエン酸ナトリウム、ヘパリン、EDTA など) が含まれていても DNA 分離とその後の PCR 反応に影響を及ぼさない。検体量は使用するキットに応じて 100 ~200 μ l を用いる。QIAamp DNA Mini Kit、QIAamp DNA Blood Kit にはプロテアーゼ (QIAGEN Protease) が添付されているが、オプションで Protease K (Cat. No. 19131) を購入し、血液検体を Protease K 処理をした方が、原虫 DNA の回収率と PCR の増幅効率は向上する。抽出方法は、各キットのプロトコールを参照されたい。キットの値段は QIAamp DNA Mini Kit (50 回分、23,500 円、1 サンプルあたり 470 円)、QIAamp DNA Blood Kit (50 回分、20,000 円、1 サンプルあたり 200 円)、QIAGEN Protease K (2ml) (50 回分、1 万円、1 サンプルあたり 200 円) である。濃度の濃い DNA を回収するために、カラムからの DNA の溶出は、キットに添付の溶出バッファー 50 μ l で行う。

② 検査の手順

A. PCR による鑑別診断

まず、ヒトに感染する 4 種のマラリアを鑑別する従来の PCR 法について述べ、次に近年、東南アジアから感染例が増えている *P. knowlesi* を含む診断法を述べる。どちらも標的遺伝子は *Plasmodium* 属の 18S rRNA 遺伝子 (small subunit rRNA (SSUrRNA), リボソーム小サブユニット RNA 遺伝子) である。従来の 4 種のマラリアの診断法の方が PCR の増幅断片が短いため、PCR 反応時間が早く終了する。

A-1) 従来の4種のマラリアの鑑別

従来から報告されているヒトに寄生するマラリア4種を鑑別するためのプライマーと、PCRの反応条件を表3、4に示す。鋳型DNAを2 μ lのPCR反応系でP1 forward/P2 reverse primer^{8,9)}でfirst PCRを行う(反応サイクルは35回)。DNA polymeraseはEx Taq Hot Start Version (TaKaRa)や、AmpliTag Gold DNA polymerase (Applied Biosystems)を使用する。この反応によつての*Plasmodium*の18S rRNA遺伝子が増幅される。次にfirst PCR産物を20倍に希釈し、その1 μ lをsecond PCRの鋳型に用いて、18サイクルのsecond PCR反応を行う。プライマーは、first PCRで用いた*Plasmodium*-P1 forward primerと、それぞれの種特異的reverse primer 4種(*falciparum*-F2, *malariae*-M1, *ovale*-O2, *vivax*-V1)を用いる。5 μ lのPCR産物を2%アガロースゲルで泳動し、陽性サンプルには約110bpの断片が検出される(図6)。

二次汚染を防ぐために、鋳型DNAの調整、PCR mixtureの混合、PCR反応産物の泳動には異なる実験スペースで行い、別々のピペットマンを使用する。チップはフィルター付きを使用する。

表3 4種のマラリア鑑別に用いられるPCRプライマーとサイクル反応

増幅されるマラリア属種	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)	標的遺伝子	サイクル反応
<i>Plasmodium</i> genus	<i>Plasmodium</i> -P1	ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT	150	SSUrDNA	(1st PCR) 98°C10秒→55°C30秒→72°C30秒を35サイクル, 72°C7分
	<i>Plasmodium</i> -P2	GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T			
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium</i> -P1	1st PCRと同じ	101	SSUrDNA	(2nd PCR) 98°C10秒→55°C30秒→72°C30秒を20サイクル, 72°C7分
	<i>falciparum</i> -F2	CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG			
<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium</i> -P1	1st PCRと同じ	104	SSUrDNA	(2nd PCR) 98°C10秒→55°C30秒→72°C30秒を20サイクル, 72°C7分
	<i>malariae</i> -M1	GGA AGC TAT CTA AAA GAA AGA CTC ATA T			
<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Plasmodium</i> -P1	1st PCRと同じ	115	SSUrDNA	(2nd PCR) 98°C10秒→55°C30秒→72°C30秒を20サイクル, 72°C7分
	<i>ovale</i> -O2	ACT GAA GGA AGC AAT CTA AGA AAT TT			
<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium</i> -P1	1st PCRと同じ	115	SSUrDNA	(2nd PCR) 98°C10秒→55°C30秒→72°C30秒を20サイクル, 72°C7分
	<i>vivax</i> -V1	CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A			

Kimura 97 PI, Han2007JCM

表4 4種のマラリア検出のためのPCR反応液の調整

	First PCR	Second PCR
精製水	10.3 μ l	11.3 μ l
10X Ex Taq Buffer	2 μ l	2 μ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	1.6 μ l	1.6 μ l
Forward primer (5 μ M)	2 μ l	2 μ l
Reverse primer (5 μ M)	2 μ l	2 μ l
Template	2 μ l	1 μ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.1 μ l	0.1 μ l
反応液総量	20 μ l	20 μ l

Second PCR のテンプレートは First PCR 産物の 20 倍希釈溶液を用いる

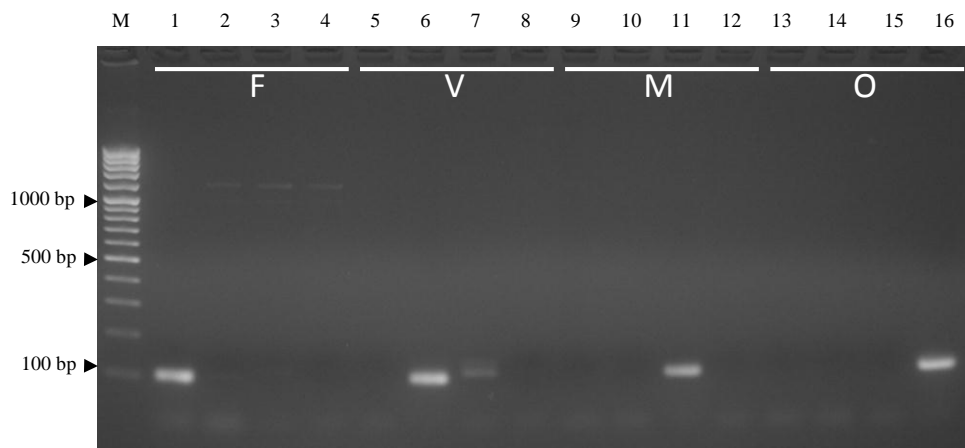


図6 : A-1)のPCR法による4種のマラリアのsecond PCRの電気泳動像

熱帯熱 (レーン 1、5、9、13)、三日熱 (2、6、10、14)、四日熱 (3、7、11、15)、卵型 (4、8、12、16) マラリアのサンプルについて、熱帯熱 (レーン 1-4)、三日熱 (5-8)、四日熱 (9-12)、卵型 (13-16) マラリア特異的なオリゴヌクレオチドのセットで nested PCR を行った。それぞれの特異的なオリゴヌクレオチドのセットで約 110bp の断片が増幅されている。ゲルは 2%濃度。

A-2) サルマラリア *P. knowlesi* と他の4種の診断

P. knowlesi を含むヒトに寄生するマラリア 5 種を鑑別するためのプライマーと、PCR の反応条件を表 5、6 に示した。ターゲットは A-1) と同じ *Plasmodium* 属の SSUrDNA であるが、A-2) の PCR では増幅領域が長いこと、A-1) の方法に比べ PCR の増幅に時間がかかり、またギムザ染色や乾燥した血液サンプルからの増幅は困難である。

表5 *P. knowlesi* を含む5種マラリア原虫の鑑別に用いられる PCR プライマーとサイクル反応

増幅されるマラリア属種	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)	標的遺伝子	サイクル反応
<i>Plasmodium</i> genus	rPLU1 (forward)	5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3'	1640	SSUrDNA	(1st PCR) 95°C5分, 94°C30秒→55°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rPLU5 (reverse)	5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC-3'			
<i>Plasmodium</i> genus	rPLU3 (forward)	5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3'	240	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→62°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rPLU4 (reverse)	5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC-3'			
<i>Plasmodium falciparum</i>	rFAL1 (forward)	5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'	205	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→58°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rFAL2 (reverse)	5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'			
<i>Plasmodium vivax</i>	rVIV1 (forward)	5'-CGG TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'	117	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→58°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rVIV2 (reverse)	5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'			
<i>Plasmodium malariae</i>	rMAL1 (forward)	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'	144	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→58°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rMAL2 (reverse)	5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'			
<i>Plasmodium ovale</i>	rOVA1 (forward)	5'-ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'	787	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→58°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	rOVA2 (reverse)	5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG-3'			
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PkF1140 (forward)	5'-GAT TCA TCT ATT AAA AAT TTG CTT C-3'	426	SSUrDNA	(2nd PCR) 95°C5分, 94°C30秒→50°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分
	PkR1550 (reverse)	5'-GAG TTC TAA TCT CCG GAG AGA AAA GA-3'			
<i>Plasmodium knowlesi</i>	PkCspF1 (forward)	5'-TCG TCC ACA TAC TTA TAT ACA AGA-3'	1160	CSP	(1st PCR) 94°C4分, 94°C30秒→55°C1分→72°C2分を40サイクル, 72°C10分
	PkCspR1 (reverse)	5'-GTA CCG TGG GGG ACG CCG-3'			

Singh 1999 Am J Trop Med Hyg, Imwong 2009 J Clin Microbiol, Singh 2004 lancet

表6 *P. knowlesi* の鑑別のための PCR 反応液の調整

	First PCR	Second PCR
精製水	28.75 µ l	29.75 µ l
10X Ex Taq Buffer	5 µ l	5 µ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 µ l	4 µ l
Forward primer (5µ M)	5 µ l	5 µ l
Reverse primer (5µ M)	5 µ l	5 µ l
Template	2 µ l	1 µ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.25 µ l	0.25 µ l
反応液総量	50 µ l	50 µ l

Second PCR のテンプレートは First PCR 産物の 20 倍希釈溶液を用いる

まず、同属の SSUrDNA シーケンスを基に設計された rPLU1/rPLU5 のプライマーペア¹⁰⁾ で first PCR を行う (反応サイクルは 30 回)。次に first PCR 産物をテンプレートとして *Plasmodium* 属の種特異的なプライマーペア¹⁰⁾ を用いて second PCR を行う (反応サイクルは 30 回)。rPLU3/rPLU4 は *Plasmodium* 属特異的であり single PCR 用としてヒト寄生マラリア 4 種、サルマラリア *P. gonderi*、げっ歯類マラリア 4 種で用いられていたが、second PCR に用いることで後述する種特異プライマーの場合と同様に検出感度は

高くなる¹⁰⁾。図7に示したように、熱帯熱、三日熱または四日熱マラリアの患者血液から分離したDNAを用いた場合、全ての検体で240-bpの特異産物が明瞭に増幅される。

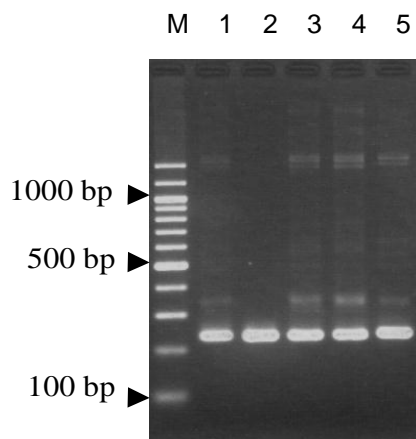


図7：A-2)のPCR法による *Plasmodium* 属特異的プライマー (rPLU3/rPLU4) を用いた second PCR の電気泳動像

熱帯熱 (レーン1、2)、三日熱 (レーン3、4)、四日熱 (レーン5) マラリア患者の全血から分離したDNA 検体全てに *Plasmodium* 属特異的な 240-bp の産物を認める。レーン M、サイズマーカー (100-bp ラダー)。ゲルは3%濃度 (NuSieve 3:1 Agarose 使用)。

一方、種特異的プライマーを用いた場合、熱帯熱マラリアは rFAL1/rFAL2 のみで 205-bp の産物が増幅され (図8A、レーン3、4)、他種マラリアに特異的なプライマーペアでは増幅されない (図8B~8D、レーン3、4)。同様に三日熱、四日熱マラリアでは各々 rVIV1/rVIV2、rMAL1/rMAL2 のみで 117-bp、144-bp の増幅産物を認める (図8B、レーン1、2、図8C、レーン5)。サルマラリア *P. knowlesi* の診断には、second PCR に PkF1140/PkR1550 のプライマーペアを使用すると 426 bp の産物が増幅できる¹¹⁾ (図9A)。また、PkF1140/PkR1550 を用いた second PCR で陽性であったサンプルは、さらに *P. knowlesi* の検出の特異性を高めるために、PkCspF1/PkCspR1 で 1160bp が増幅されることも確認する (図9B)。PkCspF1/PkCspR1 のターゲットはスポロゾイト表面タンパク質 circumsporozoite protein (CSP) である¹²⁾。*P. knowlesi* 感染の検査診断についてまとめると、PkF1140/PkR1550 のネステッドPCRで426 bpが増幅され、かつ PkCspF1/PkCspR1 の first PCR で 1160 bpが増幅されるサンプルを *P. knowlesi* 陽性とすることになる。

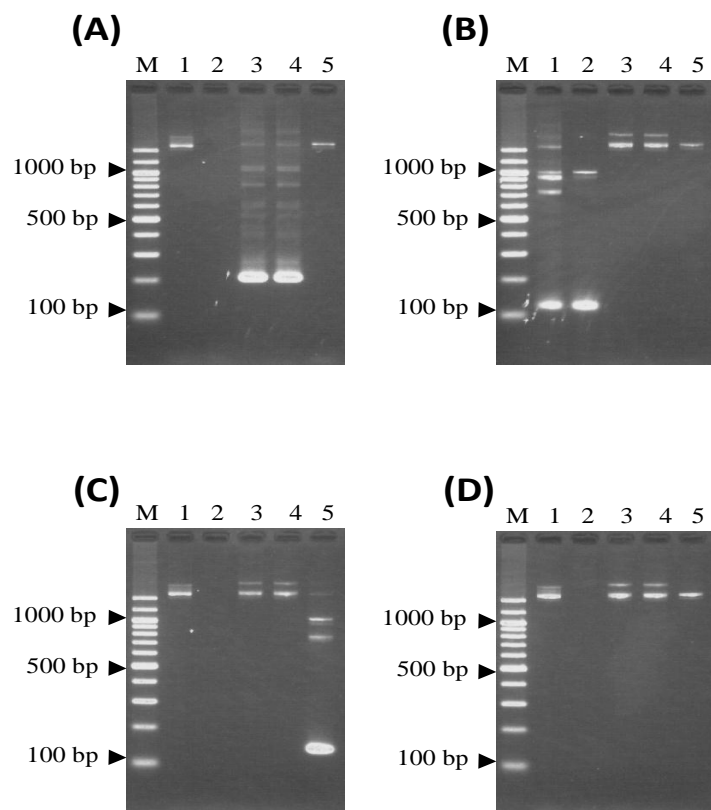


図 8 : ヒト寄生マラリア 4 種の各特異的プライマーを用いた PCR の電気泳動像。

A は熱帯熱マラリア特異的プライマー rFAL1/rFAL2 を用いた場合。B は三日熱マラリア特異的プライマー rVIV1/rVIV2 を用いた場合。C は四日熱マラリア特異的プライマー rMAL1/rMAL2 を用いた場合。D は卵形マラリア特異的プライマー rOVA1/rOVA2 を用いた場合。レーン 1、2、三日熱マラリア分離株；レーン 3、4、熱帯熱マラリア分離株；レーン 5、四日熱マラリア分離株；レーン M、サイズマーカー（100-bp ラダー）。卵形マラリア特異的プライマーを用いた場合、熱帯熱、三日熱、四日熱マラリアでは特異サイズ（787-bp）の産物の増幅を認めない（D）。ゲルは 3%濃度（NuSieve 3:1 Agarose 使用）。

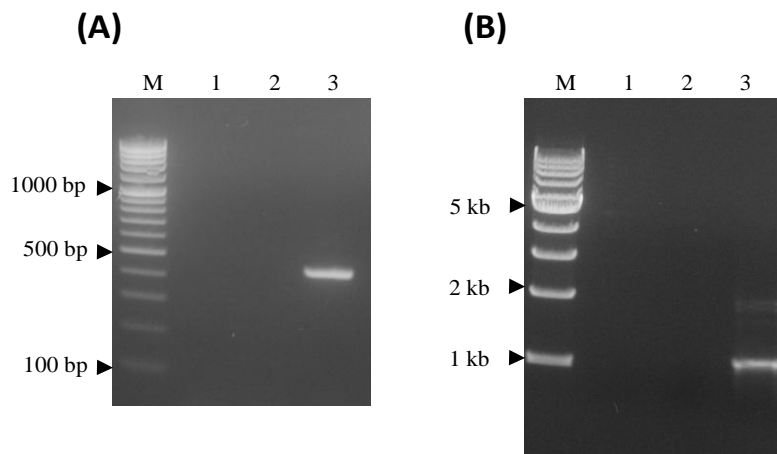


図 9 : *P. knowlesi* の PCR。熱帯熱（レーン 1）、三日熱（レーン 2）、*P. knowlesi*（レーン 3）の

サンプルを PkF1140/PkR1550 (A) と PkCspF1/ PkCspR1 (B) のプライマーセットで PCR を行った。PkF1140/PkR1550 のセットを用いた場合に SSUrRNA の陽性バンド 426bp が、また PkCspF1/ PkCspR1 のセットを用いた場合に PkCSP の陽性バンド 1160bp が増幅されている。(A) は 2%、(B) は 0.7% アガロースゲルを使用。

B. LAMP(loop-mediated isothermal amplification)法による 4 種のマリアアの診断

LAMP 法は遺伝子増幅法としては、感度及び特異性が高く、短時間で診断出来る極めて優れた方法である。試薬は栄研化学(株)から市販されている

(Loopamp DNA増幅試薬キット、96回分、50,000円、一回あたり520円)。濁度計を用いて測定する方法と目視判定で行う方法があり、後者の場合には検査に特殊な機器を必要としない。目視判定の試薬も栄研化学から市販されている (Loopamp 蛍光目視検出試薬、96回分、7,800円) ので、その説明書を参照されたい。また、濁度測定のための機器としては栄研化学からリアルタイム濁度測定装置 LA320-C などが市販されている。表 7, 8 に LAMP 法に用いる反応液とプライマーについてまとめた。

反応後のサンプルをチューブから電気泳動すると、実験室の二次汚染がおきる可能性が高い。そこで、反応後はチューブの蓋を閉めた状態で目視判定するか、濁度計による計測を行う。また、前述のように、鋳型 DNA の調整、PCR mixture の混合、PCR 反応産物の泳動には異なる実験場所で行い、別々のピペットマンを使用する。チップはフィルター付きのものを使用する。陽性ならびに陰性コントロールを、毎回作成する。

表 7 LAMP 法の反応液の調整

精製水	4.5 μ l
40 pmol/ μ l FIP	1 μ l
40 pmol/ μ l BIP	1 μ l
20 pmol/ μ l LPF	1 μ l
20 pmol/ μ l LPB	1 μ l
5 pmol/ μ l F3	1 μ l
5 pmol/ μ l B3c	1 μ l
Fluorescent dextran	1 μ l
2x LAMP reaction mix	12.5 μ l
BST polymerase	1 μ l
反応液総量	25 μ l

表8 4種のマラリア鑑別に用いられ LAMP 用プライマー

増幅されるマラリア属種	プライマーの名称	プライマーのシーケンス	標的遺伝子	増幅反応
<i>Plasmodium</i> genus	Pg-F3	GTATCAATCGAGTTTCTGACC	以下全て SSUrDNA	以下全て 60°C90分→80°C2秒
	Pg-B3c	CTTGCACTACCTCTCTCT		
	Pg-FIP	TCGAACCTTAATCCCGGTACCTATCAGCTTTTGATGTTAGGGT		
	Pg-BIP	CGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGAATTGGTAATTTACGGC		
	Pg-LPF	CGTCATAGCCATGTTAGGCC		
	Pg-LPB	AGTACCACATCTAAGGAAGGCAG		
<i>Plasmodium falciparum</i>	PF-F3	TGTAATTGGAATGATAGGAATTTA		
	PF-B3c	GAAAACCTTATTTTGAACAAAGC		
	PF-FIP	AGCTGGAATTACCGCGGCTG GGTTCCTAGAGAAACAATTGG		
	PF-BIP	TGTTGCAGTTAAAACGTTCTGTAGCCCAAACGATTTAAATGAAAC		
	PF-LPF	GCACCAGACTTGCCCT		
	PF-LPB	TTGAATATTAAGAA		
<i>Plasmodium vivax</i>	Pv-F3	GGAATGATGGGAATTTAAAACCT		
	Pv-B3c	ACGAAGTATCAGTTATGTGGAT		
	Pv-FIP	CTATTGGAGCTGGAATTACCGCTCCCAAACCTCAATTGGAGG		
	Pv-BIP	AATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAAGCTAGAAGCGTTGCT		
	Pv-LPF	GCTGCTGGCACCAGACTT		
	Pv-LPB	AGTTGAATTTCAAAGAATCG		
<i>Plasmodium malariae</i>	Pm-F3	CAAGGCCAAATTTGGTT		
	Pm-B3c	CGGTTATTCTTAACGTACA		
	Pm-FIP	TATTGGAGCTGGAATTACCGCGATGATGGGAATTTAAAACCT		
	Pm-BIP	AATTGTTGCAGTTAAAACGCTATGTTATAAATATACAAAGCATT		
	Pm-LPF	GCCCTCAAATTCGCTTCTG		
	Pm-LPB	TCGTAGTTGAATTTCAAAGGAATCA		
<i>Plasmodium ovale</i>	Po-F3	GGAATGATGGGAATTTAAAACCC		
	Po-B3c	GAATGCAAAGAACAGATACGT		
	Po-FIP	TATTGGAGCTGGAATTACCGGTTCCCAAATTC AATTGGAGG		
	Po-BIP	GTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTGTATTGTCTAAGCATCTATAGCA		
	Po-LPF	TGCTGGCACCAGACTTGC		
	Po-LPB	TGAATTTCAAAGAATCAA		

3. 陽性コントロールの供与

A-1) に記述した4種のマラリアのPCRの陽性コントロールは感染研寄生動物部から配布できる。それぞれ、SSUrRNAの増幅配列をプラスミドに組み込んだものである。また、A-2)に記述した*P. knowlesi*の陽性コントロールも寄生動物部で配布できる。これらは*P. knowlesi*のSSUrRNA 426bpとCSP遺伝子1160bpをプラスミドに組み込んだものである。CSP遺伝子断片は台湾CDCのDar-Der Ji 博士から供与された。LAMPの陽性コントロールとして4種のマラリアの増幅配列を組み込んだプラスミドは愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 坪井敬文 博士から供与できる。また、寄生動物部でも坪井博士に代わって配布している。

【一般的注意】

検査は一般実験室 (P1 レベル) で可能である。

III. 参考文献

- 1) World Health Organization: World Malaria Report 2011. Geneva, Switzerland.
www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en
- 2) 木村幹男, 感染症の話 マラリア IASR (2005年第4週) 感染症情報センター, 国立感染症研究所.
http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k05/k05_04/k05_04.html
- 3) World Health Organization: Management of Severe Malaria, a practical guidebook, 2nd edition, 2000. Geneva, Switzerland.
www.rbm.who.int/docs/hbsm.pdf
- 4) World Health Organization: International Travel Health 2012 edition, Malaria Situation, 2012. Geneva, Switzerland. www.who.int/ith
- 5) World Health Organization: Malaria Rapid Diagnostic Test Performance, 2011. Geneva, Switzerland.
www.finddiagnostics.org/.../Full-report-malaria-RDTs.pdf
- 6) 大前比呂思, 亀井喜世子, Bernard Bakote' e, 中澤港. マラリア対策の進捗による感染状況の変化とフィールドでの迅速診断法の限界 臨床寄生虫学会誌 18 (1) : 76-79, 2007.
- 7) 川合 覚. 人獣共通感染症・サルマラリアに関する最近の知見. モダンメディア 56: 139-145, 2010.
- 8) 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.
- 9) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, et al. Detection of four Plasmodium Species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 45:2521-2528, 2007.
- 10) Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, et al. A genus-and species specific nested polymerase chain reaction, Malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 60: 687-692, 1999.
- 11) Imwong M, Tanomsing N, Pukrittayakamee S, et al. Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit rRNA gene by use of primers currently

used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol* 47: 4173-4175, 2009.

- 12) Singh B, Sung LK, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 362: 1017-1024, 2004.

IV. 検査の問い合わせ

国立感染症研究所寄生動物部第三室

〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23-1 Tel: 03-5285-1111
(内線 2740, 2221)

国立国際医療研究センター研究所 熱帯医学・マラリア研究部

〒162-8655 東京都新宿区戸山1丁目21-1 Tel: 03-3202-7181

V. 執筆者

大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当 阿部 仁一郎

東京都健康安全研究センター 微生物部 鈴木 淳

国立感染症研究所 寄生動物部第三室 中野 由美子, 大前 比呂思