

令和 3 年 5 月 28 日

新規マラリア診断機器等の臨床活用に関して

一般社団法人 日本熱帯医学会	理事長 金子 修
日本寄生虫学会	理事長 丸山 治彦
日本臨床寄生虫学会	理事長 吉川 正英

今般、本邦で初めてシスメックス株式会社がフローサイトメリー法を応用して開発した「多項目自動血球分析装置 XN-31」が独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)より国内初のマラリア診断装置に該当するクラス III 医療機器として薬事承認を得ましたので(2020 年 6 月 26 日)、別添の通りに使用することを、私ども 3 学会から提案します。

マラリア診断機器等の臨床的有用性について

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ますが、その届出基準の検査方法として、「感染症法に基づく医師及び獣医師の届け出について」では、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おります。

1. 顕微鏡法

標本作成から検鏡に至るまで熟練した手法が要求され、現在わが国のすべての臨床検査技師が、感染した原虫種の形態学的鑑別までを精度高く行うのは極めて困難です。特に、赤血球への原虫寄生率が低い場合には(例えば 10 万個の赤血球に対して数個の寄生率などでは)、検出に 1 時間ほどの検査時間を要して顕微鏡技師の検査労力が大きな負担となります。

2. フローサイトメトリー法の応用診断機器

マラリア原虫の DNA 含有感染赤血球の定量および定性判定により、次のような有用性が認められます。

- 1) 測定者の技量によらない自動分析装置: 夜間や休日などを含め、臨床検査技師などのリソースが限られている医療環境でも対応可能です。また、患者血液採血管をそのままセットでき、装置内のキャップピアッシング機能により、検査者のバイオハザードリスクを軽減できます。
- 2) 検査時間は約 1 分: あらゆるマラリア検査法を迅速性で凌駕します。
- 3) 高い鋭敏度: 検出限界は、1 μ L の血液あたりに 20 個程度の感染赤血球数まで捉えることができ、顕微鏡検査での検出限界と言われる 50 個/ μ L を凌駕します。
- 4) マラリア原虫が感染した赤血球の数及びその割合を計算して表示: 本装置は、従来の血球計数項目の測定も行えるので、感染赤血球の密度(感染赤血球数/ μ L 全血)や比率(%寄生率)を表示します。原虫寄生率については、顕微鏡法の検査結果との相関係数は 0.99 以上です。
- 5) 感染原虫種の鑑別: 原虫種の鑑別の薬事承認は今後の課題であるが、臨床研究ベースで得られたエビデンスとして、本機器は熱帯熱マラリアを高い特異度をもって峻別することが可能です。さらに、スキヤタグラム上で、三日熱マラリア、サルマラリアの一種(*Plasmodium knowlesi* ヒト感染症)の発育ステージに関する情報も提供できるので、今後は種の鑑別の臨床応用が期待されます。

以上の性能評価の結果により、フローサイトメトリー法は、マラリア疑い患者の診断フローにおいて(別添 1)、問診の後、顕微鏡検査と同等/並列、または優先/代替すべき検査法として評価されます。治療方針の決定のために、種の鑑別が必要な場合には、核酸増幅法による検査の追加が望まれます。(参考文献)

3. 核酸増幅法

核酸増幅法を用いた病原体の核酸検出は、PCR 検査という名称が多く用いられていますが、診療や検査の指針やガイドラインなどでは、PCR 検査という名称が、PCR 法を示す場合と核酸増幅法全体を示す場合のどちらの場合においても使用されており、核酸増幅法全体を示す内容で PCR 法のみを示すと誤って解釈や運用をされている場面があります。そのため、マラリアの診断については、LAMP 法などの PCR 法以外の核酸増幅法を用いた体外診断用医薬品でも同様な検査成績が得られるにも関わらず、上記届け出基準により、医療現場では PCR 法以外がマラリアの診断法として使用が制限されたり、診断基準としての正当性を得られない状況が発生したりしております。

1) PCR 法

鋭敏度の高い検査手法として有用で、ヒト固有の感染原虫種 4 種(熱帯熱/三日熱/四日熱/卵形マラリア原虫)、そしてサル類のマラリア原虫の一種 *Plasmodium knowlesi* も、特異的なプライマーを用意することで鑑別することができます。しかしながら、特別な検査室の環境(DNA が扱える環境や DNA 増幅器の設置、そして専門的な知識と技術を持つ検査技師)が必要となり、日本国内でも限られた検査室でしか PCR 法による診断はできません。

2) LAMP 法:

栄研化学株式会社が開発した LAMP 法は、簡易・迅速かつ鋭敏な診断薬として広く結核や COVID-19 の診断で実用化されている核酸増幅法の一つであります。本診断法は、マラリアの診断では、血液からの DNA 抽出キットと併用して「PURE-LAMP 法」として、検査の簡易化・迅速化にも成功しており、何よりもその鋭敏度は、通常の PCR 法の 10 倍以上で、1 μ L の血液あたりに 1 個の感染原虫を捉えることができます。また、現在のところ LAMP 法の市販プライマーは、全種共通プライマーの他、熱帯熱マラリア特異プライマー、三日熱マラリア特異プライマーが用意されており、それぞれの鑑別診断が可能となっています。(参考文献)

なお、核酸増幅法は、原虫種の鑑別診断の必要性に応じて、顕微鏡法/フローサイトメトリー法に追加して行うことが望まれます。

注 1) 顕微鏡法では、原虫寄生率が低かったり、標本の作成や染色が稚拙だったりすると、原虫種の鑑別が困難です。特に、三日熱マラリア原虫と卵形マラリア原虫の形態的な鑑別が困難、さらには四日熱マラリア原虫と上記サルマラリア原虫の形態的鑑別が困難であることが、治療薬の選択や臨床管理に影響を及ぼします。

注 2) 国内での原虫種の鑑別による精密なサーベイランスやモニタリングが発生動向調査上必要で、薬剤の配備や今後の突発的流行を予防するための検疫に資すると考えます。

以上

(参考文献)

フローサイトメトリー法の臨床活用に関する報告

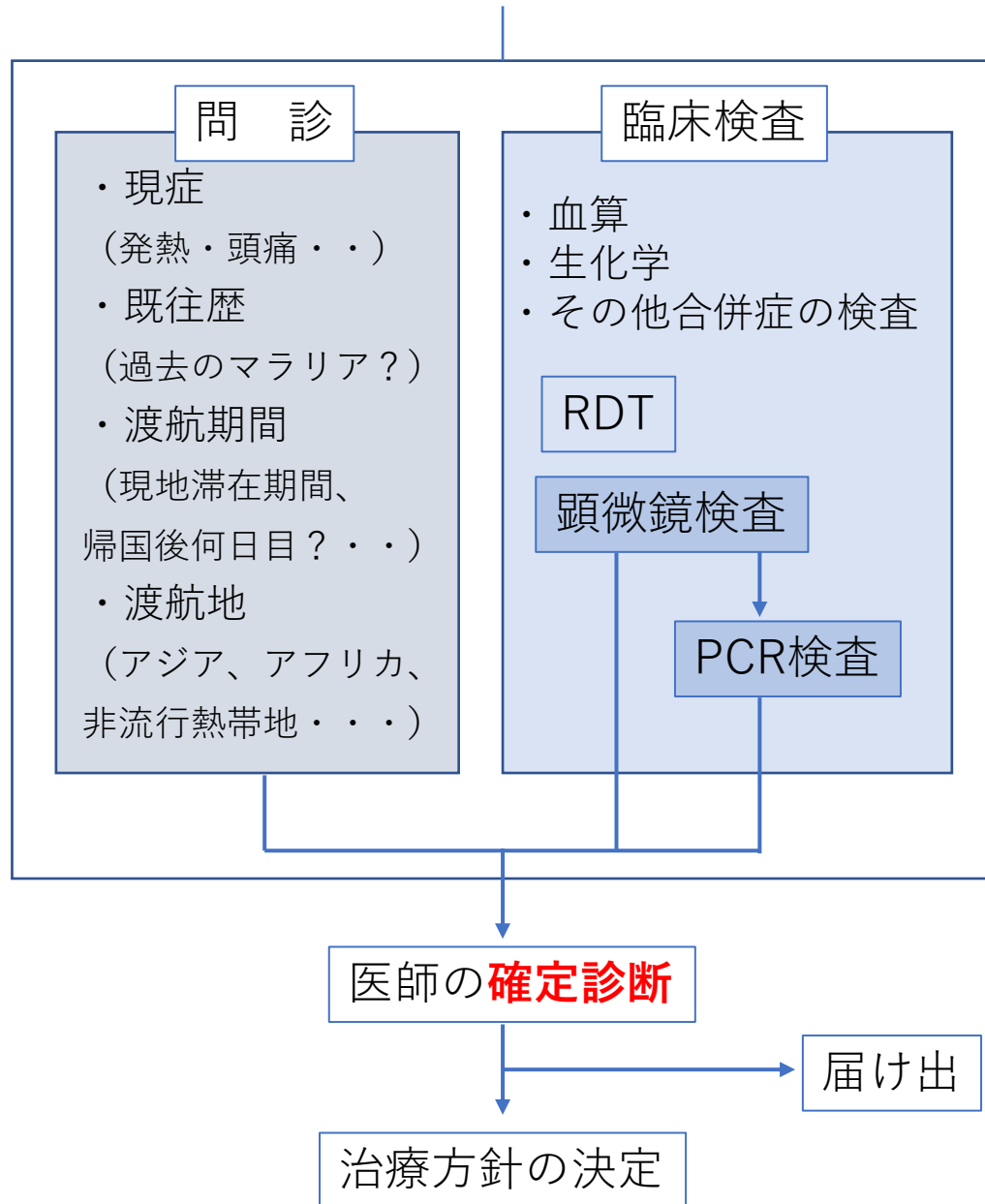
- 1) 多項目自動血球分析装置 XN-30 による熱帯熱マラリア患者原虫血症評価. 駒木-安田加奈子 他、第 28 回日本臨床寄生虫学会大会、東京、2017/6/24(口頭発表)
- 2) 多項目自動血球分析装置 XN-30 によるマラリア患者原虫血症評価. 駒木-安田加奈子 他、グローバルヘルス合同大会 2017、東京、2017/11/24-26(口頭発表)
- 3) Evaluation of Automated Hematology Analyzer XN-30 using blood samples of clinical malaria patient. 駒木-安田加奈子 他、1st Malaria World Congress、メルボルン(豪州)、2018/7/1-4(ポスター)
- 4) 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. 駒木-安田加奈子 他、第 30 回日本臨床寄生虫学会大会、東京、2019/6/23(口頭発表)
- 5) マラリア診療・対策現場を変える最新のマラリア検査. シンポジウム 2: マスギャザリングにおける感染症対策・輸入感染症対策. 狩野繁之、第 31 回日本臨床微生物学会学術集会、石川県立音楽堂、2020/1/31(口頭発表)
- 6) フローサイトメトリー法によるマラリア診断の可能性. シンポジウム「“30 分の壁”を破る次世代感染症診断法」. 狩野繁之、第 94 回日本感染症学会総会学術講演会、グラントニッコー東京台場、2020/8/21(口頭発表)
- 7) Evaluation of a Newly Developed Automated Hematology Analyzer for the Detection of Malaria Parasite in Clinical Blood Samples. 駒木-安田加奈子 他、American Society of Tropical Medicine and Hygiene 69th Annual Meeting、バーチャル開催、2020/11/15-19 (オンラインポスター)
- 8) 多項目自動血球分析装置 XN-31 によるマラリア患者原虫血症評価. 駒木-安田加奈子 他、第 90 回日本寄生虫学会大会・第 32 回日本臨床寄生虫学会大会合同大会、奈良、2021/4/16-17(オンライン口頭発表)

LAMP 法の臨床活用に関する報告

- 1) PURE/LAMP 法のマラリア診断への応用. 駒木-安田加奈子 他、第 26 回日本臨床寄生虫学会大会、宇都宮、2015/6/20(口頭発表)
- 2) PURE/LAMP, a simple and rapid method for DNA extraction and detection, was highly sensitive for malaria diagnosis with clinical samples. Vincent Perpetue 他、第 86 回日本寄生虫学会大会、札幌、2017/5/28-29 (口頭発表)
- 3) A Global Health Pacific-Atlantic Cooperation: Cross-sectional Study of Malaria in Haiti. Vincent Perpetue 他、日米医学協力プログラム寄生虫疾患専門部会第 48 回国内会議、長崎、2018/2/16(口頭発表)
- 4) Experience with Malaria-LAMP in Laos and Haiti: Importance of submicroscopic/asymptomatic malaria detection toward malaria elimination. Shigeyuki Kano, American Society of Tropical medicine and Hygiene 67th Annual Meeting, Evening Seminar, 2018/11/1 (口頭発表)
- 5) 熱帯感染症の疫学と検査. 基調講演3. 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、狩野繁之、ヒルトン東京お台場、2019/2/2(口頭発表)
- 6) PURE/Pv-LAMP 法の三日熱マラリア診断への応用. 駒木-安田加奈子 他、第 88 回日本寄生虫学会大会、長崎、2019/3/15-16(口頭発表)
- 7) PURE-LAMP method for accurate detection of malaria parasite DNA from dried blood spots. 駒木-安田加奈子 他、日米医学協力プログラム寄生虫疾患専門部会第 50 回国内会議、松山、2020/2/22-23(口頭発表)

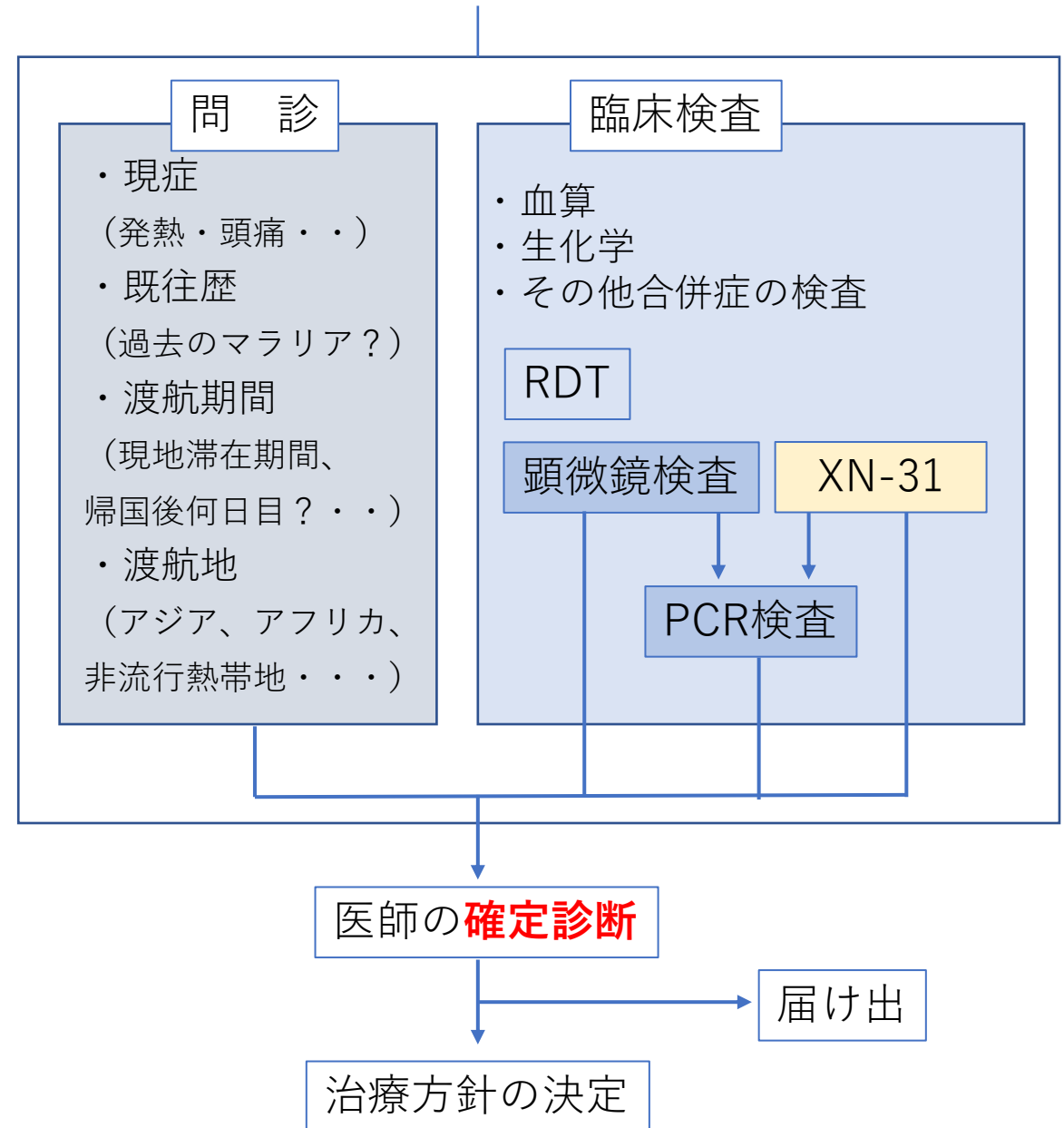
現在のフロー

臨床症状あり



将来のフロー

臨床症状あり



（別添1）マラリア診断フローの解説

本診断フローは、それぞれのマラリア検査技術（顕微鏡検査、PCR検査、XN-31、そしてRDT*）の臨床現場における役割を詳細に解説します。このフローは、それぞれの機器性能をもって、そうあるべき理想的な使われ方を提案するものではなく、日本の医療の環境や条件下で、患者様を目の前にして実際に（現在）運用されている、そして（将来）そのように運用するのが適当であろうと考えられる3学会（日本熱帯医学会、日本寄生虫学会、日本臨床寄生虫学会）からの意見です。

* RDT: Rapid Diagnostic Test（迅速診断法＝イムノクロマトグラムによる抗原検査法）

現在のフロー

1) マラリアの臨床症状がある（多くの場合、熱帯地からの帰国後に発熱した）患者が、医師を訪れるところから始まります。

2) 医師は、まず問診を行い

a) 現症の聴取：現在の患者の訴える自発的な症状（頭痛など）や客観的に読み取れる症状（発熱など）を総合して、マラリアの症状でありうるかどうかの判断を開始します。（例えば、一日置き発熱パターンが顕著であれば三日熱マラリア、二日おきの発熱パターンが顕著であれば四日熱マラリア、などと熱型でマラリアの感染種の鑑別診断までがほぼついてしまう場合があります）

b) 既往歴：熱帯地でマラリアにかかったことがあるか？他の感染症や病気にかかったことがあるか？などを聞き取り、現在の症状がその延長線上にあるのか？特にマラリアであれば再発の可能性はあるかどうかなども判断します。

c) 渡航期間：この渡航期間と、発病のタイミングを合わせて考え、マラリアの潜伏期（熱帯熱マラリアの場合1週間から1ヶ月）と一致して発症しているかどうか？などを考察します。

d) 渡航地：（果たして本当にマラリアの流行地で活動したかどうか、都市部のホテルの中だけで滞在していたわけではないか？など詳細な行動内容も含め）現地のマラリア流行状況（どの種のマラリアの流行がどの季節に多く報告されているのかなどの情報も手に入れます）、これらと合わせて、マラリアである可能性が高いかどうかを考えます。地域が限定できれば感染した原虫種が高い確率で想像できます。（例えば、西アフリカには三日熱マラリアの流行はありませんので、その可能性が否定できます。ほぼ熱帯熱マラリアの診断で間違いがなくなります）

3) 臨床検査

上記問診でマラリアの疑いが高い場合には、臨床検査試験を医師はオーダーします。

a) 一般検査：血算や生化学検査を行います。マラリアでは貧血が必ずおきますので、貧血症状のない日本人のマラリアはありません。生化学検査でもマラリアの重症度に応じて様々な検査値が異常値を示します。合併症を惹起したマラリア重症化の指標を得ることもできます。

b) マラリアに特異的な検査：

RDT: わが国では承認されていないので、この検査法による陽性／陰性判定をもって確定診断とすることができませんが、15分ほどで結果が出るので、国内のいくつかのトラベルクリニックでは個人輸入して、参考データとしてRDT検査をまず行なっています。（顕微鏡検査のた

めの薄層塗抹標本の作成、メタノールによる固定、ギムザ染色液による染色などを行なっている間に、RDTの結果は出てしまいます。)

顕微鏡検査：標本の作成は開業医など一般医家レベルでは作成が困難ですが（試薬の常備がまずありません）、地方でも総合病院で検査部を持つ病院であれば、どこでも作成ができます。しかし、顕微鏡技師（検査技師）のマラリア原虫検出能力は大きく異なるので、外注検査（検査会社医学部寄生虫学教室等）に検査依頼を出すこともあります（郵送なども含め、検査結果を得るのに1日かかるのが普通です）。

PCR 検査：顕微鏡検査で原虫の存在自体や種の鑑別が形態的に困難であった場合（標本作成の質が悪い、染色の仕方が悪い、寄生率が低い・原虫のステージが特徴的でない、顕微鏡技師の能力が低いなどの理由による）、PCRは感度が高く、感染した原虫種（ヒトマラリア原虫の4種、およびサルマラリア原虫の1種）もプライマーの設計で特異的に鑑別できるので、患者の治療や臨床管理のためにPCR法が必要と医師が判断した場合には、国立国際医療研究センター研究所や国立感染症研究所にPCR検査を依頼することができます。（検査結果は郵送時間も含めて翌日になります）

以上、問診の結果と、臨床検査の結果を総合して、医師はマラリアであるかどうか、そうであればどの原虫種によるマラリアであるかを判断して、治療方針を決定します。（それと同時に、直ちに保健所長を通して都道府県知事に届け出を行います。原虫種の診断結果（必ずしもPCR結果によるものではない）を記載できれば記載し、わからない場合には不明として届け出ます）。

将来のフロー

現在のフローにXN-31による診断方法を付け加えることができます。

XN-31の性能に関しては、本文で詳細に記載しますので、フローにおけるXN-31の位置だけを説明します。すなわち：

- 1) フローにおける位置としては顕微鏡検査と並列。ただし、XN-31が備わっている医療機関では顕微鏡検査より優先されることが多いと考えます。顕微鏡検査もXN-31と合わせて行っても当然構わないと考えます。
- 2) 従来通りに顕微鏡検査しかできない医療機関であれば、新たにXN-31による検査を行う必要は当然ありません。
- 3) 顕微鏡検査またはXN-31（または両方）で検査したのちに、（医師の判断で治療方針に）必要とあればPCR検査を追加する。

以上の結果と問診との結果を総合して、マラリア感染の有無や種の鑑別などを医師が判断し、治療を開始するのは上記と同じです。