

### Statistical analysis

Nonparametric analysis was performed with the Mann-Whitney *U* test. *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Specificity of PCR method

To test the specificity of the probes for the SSU rRNA genes of the 4 species of *Plasmodium*, PCR was performed with a species-specific gene fragment in the plasmid as a template. The amplification plot with the *P. falciparum*-specific probe is shown in Fig 1. Only signal from the *P. falciparum* plasmid DNA was detected, whereas signals from other species were not detected. The probe detected *P. falciparum* plasmid DNA in a concentration-dependent manner. The specificity of the probe was confirmed with the use of cultured parasite DNA as a template. Equivalent specificity of the probes for the other 3 parasite species was obtained with the use of species-specific genes in the plasmid as the template DNA (data not shown).

### Sensitivity of PCR method

The sensitivity of the method was determined with a 10-fold dilution of cultured *P. falciparum*-infected erythrocytes. *P. falciparum* DNA could be detected in a reaction containing as few as 5 parasite-infected erythrocytes.

### Application of PCR method to clinical blood samples

DNA extracted from patient blood was analyzed by real-time PCR (Table 2). Parasite DNA was detected in 100 blood samples. In 1 group of 50 samples, which were diagnosed as *P. falciparum* infection by microscopic examination, *P. falciparum* DNA alone

was detected in 40 samples, and *P. vivax* DNA alone was detected in 3 samples. Both *P. falciparum* DNA and *P. vivax* DNA were found in 7 samples. In the second group of 50 samples, which were diagnosed as *P. vivax* infection by microscopic examination, *P. vivax* DNA alone was detected in all 50 samples. DNA of other parasite species was not detected in these samples.

## DISCUSSION

Several techniques for the detection of malaria parasite DNA and RNA have been developed. These techniques, including standard PCR (Snounou *et al*, 1993a), nested PCR (Snounou *et al*, 1993b; Kimura *et al*, 1997; Rubio *et al*, 2002), and DNA probe assay (McLaughlin *et al*, 1993), are objective and have advantages in specificity and sensitivity. In the present study, we applied real-time PCR with TaqMan technology for the detection and discrimination of human malaria parasite species. An approximate 150-bp region of the SSU rRNA gene of *Plasmodium* (Waters and MacCutchan, 1989) was amplified with interspecies conserved universal primers and was detected with species-specific TaqMan MGB probes. In experiments with the plasmid-cloned SSU rRNA gene fragment as a template, probes specific for each parasite species only amplified DNA corresponding to each species, with no cross-reactivity with that of other species. In experiments with DNA from cultured *P. falciparum*-infected erythrocytes as the template, the detection and discrimination threshold for the PCR method was 5 parasite-infected erythrocytes per reaction. Equivalent sensitivity was determined for the 3 other parasite species. It has been reported that microscopy can routinely detect as few as 10-100 malaria parasites per  $\mu$ l of blood (Rubio *et al*, 2002).

Table 2  
Comparison of real-time PCR and microscopic examination for diagnosis of malaria in blood samples from Thai patients.

Microscopy		Real-time PCR <sup>b</sup>				
		Pf	Pv	Pf + Pv	Po	Pm
Pf	50	40	<u>3</u> <sup>a</sup>	<u>7</u>	0	0
Pv	50	0	50	0	0	0
Total	100	40	53	7	0	0

<sup>a</sup> Numbers underlined indicate discrepant results between the 2 methods.

<sup>b</sup> Pf: *P. falciparum*; Pv: *P. vivax*; Po: *P. ovale*; Pm: *P. malariae*

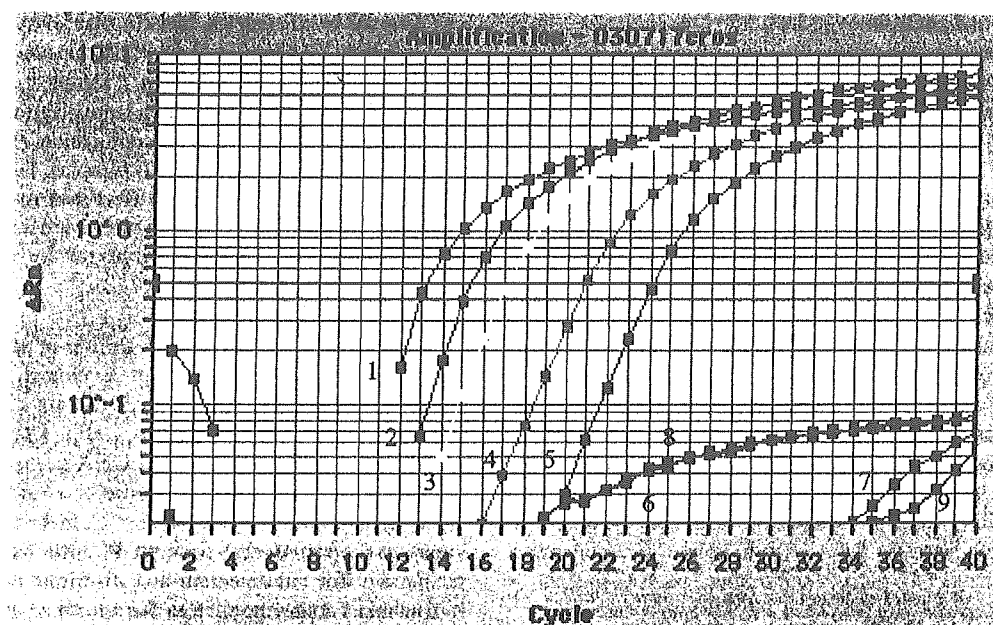


Fig 1- Amplification plot of fluorescence against cycle number for 4 SSU rRNA genes of human malaria parasites, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*.  $\Delta R_n$  is relative fluorescence units. One hundred nM TaqMan MGB probes specific for *P. falciparum* and 300 nM universal primers for *Plasmodium* SSU rRNA gene were used. The templates were composed of plasmid DNA with a species-specific SSU rRNA gene. Each curve indicates the template used:

1-5 = plasmid DNA with the *P. falciparum* gene, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, and 1 pg, respectively; 6 = plasmid DNA with the *P. vivax* gene, 10 pg; 7 = plasmid DNA with the *P. ovale* gene, 10 pg; 8 = plasmid DNA with the *P. malariae* gene, 10 pg; 9 = No template control.

Thus, the sensitivity of the real-time PCR method reported here is apparently higher than that of microscopic examination.

To evaluate the real-time PCR method, blood samples from Thai patients who were diagnosed by microscopy were utilized. Interestingly, comparison of methods for the 100 blood samples showed that the PCR method could detect mixed infection in 7% of the samples, whereas microscopic observation detected only a single infection for the same samples (Table 2). All samples diagnosed as mixed infection by PCR showed relatively low parasite counts by microscopy. Mean parasitemia in the group with *P. falciparum* single infection was 0.82%, whereas that in the group with mixed infection was 0.17% ( $p < 0.05$ ). It is known that *P. vivax* and *P. falciparum* in the ring/early trophozoite stage are difficult to distinguish, particularly when the level of parasitemia is low (Snounou *et al.*, 1993b), and microscopic diagnosis may only be successfully performed when the late asexual stages of *P. vivax* are present in the sample (Rubio *et al.*, 2002).

Recently, the real-time PCR method, with other

systems, such as SYBR<sup>®</sup> Green I have been used in malaria research (Polanco *et al.*, 2002; Cheesman *et al.*, 2003; de Monbrison *et al.*, 2003). However, nonspecific binding of SYBR<sup>®</sup> Green I to primers and spurious amplicons must be minimized by careful optimization of the reaction conditions (Bell and Ranford-Cartwright, 2002). In the present study, we found that real-time PCR with target-specific TaqMan MGB probes allowed for high-performance detection and discrimination of parasite DNA without complicated optimization procedures. Because this PCR method uses standard cycling conditions and reagent concentrations, it permits simultaneous assay of multiple targets. This method may be useful in monitoring the effectiveness of malaria chemotherapy in situations where drug-resistant strains are prevalent. Drug-resistant genes of the parasite, such as *pfcr* and *pfmdr-1*, would be used as targets. Further application of the real-time PCR method with allele-specific probes for other genetic markers of malaria parasites, or for human genetic markers associated with susceptibility, may increase the efficacy of treatment as well as the prevention of this most globally prominent infectious disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a Grant for International Health Cooperation Research (16C-1) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (16406012) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, Mahidol University grant, and JICA-Mahidol University-Asian Center of International Parasite Control Project.

## REFERENCES

- Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002;18:337-42.
- Cheesman SJ, de Roode JC, Read AF, Carter R. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Mol Biochem Parasitol* 2003;131:83-91.
- de Monbrison F, Raynaud D, Latour-Fondanaiche C, *et al.* Real-time PCR for chloroquine sensitivity assay and for *pfmdr1-pfcr1* single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Methods* 2003;54:391-401.
- Kawamoto F, Billingsley PF. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy. *Parasitol Today* 1992;8:69-71.
- Kimura M, Kaneko O, Liu 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* 1997;46: 91-5.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000;28:655-61.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979;65:418-20.
- McLaughlin GL, Subramanian S, Lepers JP, Raharimalala L, Deloron P. Evaluation of a nonisotopic DNA assay kit for diagnosing *Plasmodium falciparum* malaria in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:211-5.
- Petersen E, Marbiah NT. QBC and thick blood films for malaria diagnosis under field conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:416-7.
- Polanco JC, Rodriguez JA, Corredor V, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax*: parasitemia determination by real-time quantitative PCR in *Aotus* monkeys. *Exp Parasitol* 2002;100:131-4.
- Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(suppl 1): S199-203.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993a;58:283-92.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993b;61:315-20.
- Tham JM, Lee SH, Tan TM, Ting RC, Kara UA. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf tests in a clinical environment. *J Clin Microbiol* 1999;37: 1269-73.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria species in continuous culture. *Science* 1976;193:673-5.
- Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* 1989;17:1343-6.
- Wongsrichanalai C, Arevalo I, Laoboonchai A, *et al.* Rapid diagnostic devices for malaria: field evaluation of a new prototype immunochromatographic assay for the detection of *Plasmodium falciparum* and non-falciparum *Plasmodium*. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:26-30.

## A PILOT FIELD TRIAL OF AN *IN VITRO* DRUG SUSCEPTIBILITY TEST USING THE ANAEROPACK<sup>®</sup> MALARIA CULTURE SYSTEM ON THE THAI-MYANMAR BORDER

TOSHIMITSU HATABU<sup>1,2</sup>, SHIN-ICHIRO KAWAZU<sup>1</sup>, SOMEI KOJIMA<sup>3</sup>, PRATAP SINGHASIVANON<sup>4</sup>,  
SRIVICHA KRUDSOOD<sup>4</sup>, SORNCHAI LOOAREESUWAN<sup>4</sup>, SHIGEYUKI KANO<sup>1,\*</sup>

Accepted 10, September, 2004

**Abstract:** The AnaeroPack<sup>®</sup> malaria culture system with a portable thermostat incubator was evaluated in a field laboratory on the Thai-Myanmar border conducting *in vitro* drug susceptibility tests on blood samples from 5 Karen children infected with *P. falciparum*. Only one isolate was susceptible to chloroquine; the others were highly resistant. The IC<sub>50</sub> value of an isolate was only resistant to mefloquine, whereas the values of the 3 patients who presumably showed recrudescence were slightly elevated in the susceptible ranges. These results suggested that chloroquine should no longer be used for *P. falciparum* malaria in this geographic area, and that mefloquine should be carefully monitored for its *in vivo* effectiveness. In this study, the AnaeroPack<sup>®</sup> malaria culture system with portable thermostatic incubator is a powerful and useful mobile tool, which aids in providing detailed evidence-based distribution data concerning of drug resistant malaria in the field.

**Key words:** AnaeroPack<sup>®</sup>, Drug susceptibility test, *Plasmodium falciparum*

### INTRODUCTION

Since chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* was first reported in 1959 in Thailand, it has developed resistance to all commonly used drugs [1]. The spread of multi-drug resistant *P. falciparum* is now a major public health problem worldwide, with prophylactic and therapeutic implications [2]. Evidence-based detection of drug-resistant parasites is important for the accurate evaluation of susceptibility to antimalarial drugs. However, isolation of fresh parasites for *in vitro* drug susceptibility testing is often difficult in the field because of the precise experimental conditions needed for the test. *In vivo* susceptibility tests are frequently conducted, but they sometimes fail because of difficulties in following up the patients. In fact, it is sometimes difficult to determine whether an adequate drug concentration has been successfully achieved in the patients' blood. Therefore, *in vitro* tests are indispensable to determine the exact degree of resistance acquired by the parasites.

We previously reported that the AnaeroPack<sup>®</sup> gas system can be used for the continuous cultivation of both laboratory strains and fresh isolates of *P. falciparum* from patients [3]. This gas system is safer, simpler, and easier to use than the candle jar method. In this study, we evaluated the AnaeroPack<sup>®</sup> malaria culture system with a portable thermostat incubator in a field laboratory on the Thai-Myanmar border to conduct *in vitro* drug susceptibility tests on *P. falciparum*. The feasibility of the system and the results of the tests are described in this report.

The study was conducted at Rajanagarindra Tropical Disease International Center, a field laboratory center of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, located in Suan Phung, Rachaburi, about 200 km west of Bangkok. The area was inhabited by Karen as well as Thai people, and in 2001 more than 6,000 people were subjected to microscopic diagnosis of malaria in the center with about 1,000 positive cases found. Malaria is endemic throughout the year in this area with the peak season occurring around May and June. Mefloquine is currently the first drug of

<sup>1</sup> Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan.

<sup>2</sup> Gunma University School of Health Sciences, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan.

<sup>3</sup> Asian Centre of International Parasite Control, Bangkok 10400, Thailand.

<sup>4</sup> Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

\*Corresponding author:

Shigeyuki Kano,

Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan.

Tel: +81-3-3202-7181 (ext. 2877), Fax: +81-3-3202-7364, E-mail: kano@ri.imcj.go.jp

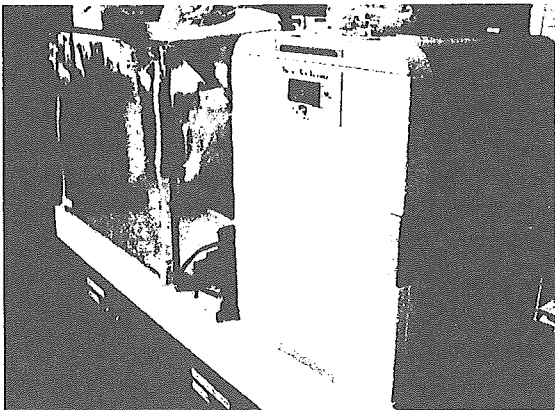
choice for the treatment of uncomplicated malaria, and artesunate, a qinghaosu derivative, is administered in complicated cases.

The AnaeroPack<sup>®</sup> CO<sub>2</sub> (Mitsubishi Gas Co., Tokyo, Japan) is a foil-packed paper sachet that on exposure to air immediately absorbs atmospheric O<sub>2</sub> and simultaneously generates CO<sub>2</sub> until a condition of 15% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> is attained. The microaerophilic atmosphere produced within a sealed jar (AnaeroPack<sup>®</sup> Kakugata jar, SUGIYAMA-GEN Co., Ltd., Tokyo, Japan) can be maintained for at least 24 hours. A portable thermostat incubator (SUGIYAMA-GEN Co., Ltd.) was carried to the laboratory, and the temperature inside the incubator was adjusted to 37°C. During *P. falciparum* cultivation, the sachet inside the jar was replaced with a new sachet every day when the culture medium was changed (Fig. 1).

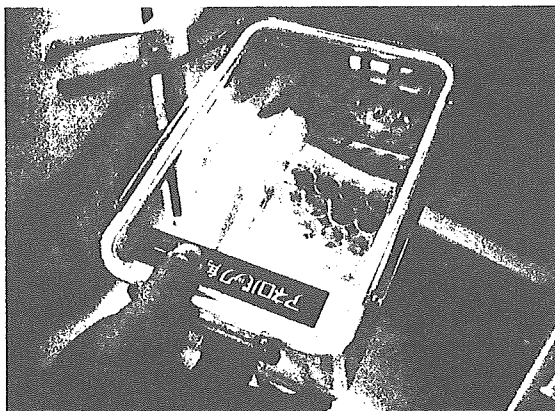
The *in vitro* drug susceptibility test used in this study was a modified semi-micro test described previously [4, 5]. The following procedures were conducted right after the sampling in the field laboratory center. Briefly, blood samples were washed 3 times with RPMI 1640 and resuspended in RPMI 1640 (GIBCO BRL), pH 7.4, supplemented with

10% human serum (from non-immune Japanese donors without a previous history of malaria; Blood Type A) and 25 µg/ml gentamicin (Sigma, Saint Louis, Mo), 25 mM HEPES, and sodium bicarbonate at a hematocrit of 5%. Five hundred microliters of the erythrocyte suspension were placed in each well of a tissue culture plate (24-well flat bottom, Corning Costar, NY). Chloroquine diphosphate was purchased from Sigma. Mefloquine hydrochloride was kindly provided by Hoffman-La Roche Ltd., Basel. Twenty microliters of chloroquine diphosphate or mefloquine was added to each well (for chloroquine to create a series of doubling dilutions from 20 to 10240 nM, and for mefloquine to create a series of 10 times dilutions from 0.01 to 1000 nM dissolved in distilled water). To monitor parasite growth, 6 wells per plate served as controls without antimalarials. When the schizonts were fully grown in the control wells, the culture plate was removed from the incubator. Thin-smear specimens stained with Giemsa solution were made from each well, and we counted the number of erythrocytes microscopically in the control smears until encountering 50 schizonts. We defined the schizonts as parasites that have both dark brown pigment and more than 3 nuclei [6]. The effect of antimalarials on parasite growth was evaluated by observing the decreased number of schizonts per equal number of erythrocytes counted previously in the control cultures. The percentage of growth inhibition effect was calculated as follows: test well schizont count/control well schizont count (50) x 100. Fifty percent growth inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was calculated from the inhibition curve obtained from the values by a statistical probit method.

Blood samples were obtained from 5 Karen children age 5 to 13 years (Table 1). The guardians gave written consent to this study, which had been approved by the Ethical Committee of Mahidol University. This survey research also followed the ethical guidelines for epidemiological studies by the Ministry of Education, Culture, Science and Technology and Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Three of the 5 patients had a history of *P. falciparum* malaria within 1 month, and they had received mefloquine at that time. The parasitemias of the patients were relatively low, 0.05-0.20%. The incubation period (the time needed for the tested isolates to grow to schizonts) ranged from 48 to 96 hrs. The IC<sub>50</sub> values of the isolates for chloroquine varied from 91 to 402 nM, with a geometric mean of 273 nM and SD of 90 nM. Only one isolate, from patient B, was susceptible to chloroquine; the others were highly resistant. The IC<sub>50</sub> values of the isolates for mefloquine varied from 4-52 nM, with a geometric mean of 24 nM and SD of 13 nM. The IC<sub>50</sub> value of the isolate from patient A was only resistant to mefloquine, whereas the values of the 3 patients who



(A)



(B)

Figure 1. AnaeroPack<sup>®</sup> culture system. (A) the portable incubator and (B) the AnaeroPack<sup>®</sup> Kakugata jar with a culture plate inside.

Table 1 Profiles of the *P. falciparum* isolates from 5 patients in Suan Phung

No.	Age	Sex	% Parasitemia	Day of recrudescence	Chloroquine		Mefloquine	
					IC <sub>50</sub> (nM)	Judgment*	IC <sub>50</sub> (nM)	Judgment**
A	12	female	0.30	none	231	Resistant	52	Resistant
B	13	male	0.05	D29	91	Susceptible	18	Susceptible
C	8	male	0.20	D24	358	Resistant	27	Susceptible
D	12	male	0.11	none	285	Resistant	4	Susceptible
E	5	female	0.11	D22	402	Resistant	17	Susceptible

\* Threshold of IC<sub>50</sub> for chloroquine resistance is 114 nM [5].

\*\* Threshold of IC<sub>50</sub> for mefloquine resistance is 40 nM [9].

presumably showed recrudescence were slightly elevated in the susceptible ranges. These results suggested that chloroquine should no longer be used to treat *P. falciparum* malaria in this geographic area, and that mefloquine should be carefully monitored for its *in vivo* effectiveness.

The World Health Organization's test with the candle jar is the standard method used to cultivate parasites for drug susceptibility testing in the field [7]. This method is sometimes difficult to carry out under field conditions. Our study found the AnaeroPack<sup>®</sup> system to be an effective alternative method for cultivation of malaria parasites and for *in vitro* drug susceptibility testing in the field. The AnaeroPack<sup>®</sup> gas system does not need a catalyst, water, or hydrogen for the activation of gas production, and the gas jars or incubator chambers are lightweight and portable. Our findings were consistent with other reports that the AnaeroPack<sup>®</sup> culture system produced acceptable results for the growth of malaria parasites in the laboratory application. The IC<sub>50</sub> values attained with the AnaeroPack<sup>®</sup> CO<sub>2</sub> were similar to those attained by the candle jar method [3, 4, 8]. In addition, the thermostatic incubator of AnaeroPack<sup>®</sup> malaria culture system can now be powered by a car battery. The AnaeroPack<sup>®</sup> malaria culture system with portable thermostatic incubator is a powerful and useful mobile tool that helps to provide detailed evidence-based distribution data concerning drug resistant malaria in the field.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the laboratory staff in the Suan Phung field station for their kind assistance and support. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (International Research) (13576012, 16406012) from the Japan Society for the Promotion of Science, by Asian Centre of International Parasite Control (ACIPAC) project (Hashimoto Initiative) under the Japan International Cooperation Agency (JICA) program, and by a grant from Mahidol University.

#### REFERENCES

1. Looareesuwan S, Chongsuphaisiddhi T. Malaria. In: Looareesuwan S, Wilairatana P, editors. Clinical Tropical Medicine, Bangkok: Medical Media, 1994: 1-61.
2. Alrajhi AA, Rahim I, Akood M, Hazmi M. Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* cerebral malaria in a chloroquine-susceptible area. J Infect Dis 1999; 180: 1738-41.
3. Mizuno Y, Hatabu T, Kawazu SI, Masuda G, Otomo H, Kano S. Cultivation of *Plasmodium falciparum* isolates under the AnaeroPack gas condition in a portable thermostatic incubator. Jpn J Trop Med Hyg 2000; 28: 383-5.
4. Lin Q, Onda T, Kano S, Masuda G, Suzuki M. *In vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* using a portable thermostat and CO<sub>2</sub> gas. J Jpn Assoc Inf Dis 1999; 73: 1099-103. (Japanese text)
5. Inaba H, Ohmae H, Kano S, Faarado L, Boaz L, Leafasia J, Suzuki M. Variation of incubation time in an *in vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* isolates studied in the Solomon Islands. Parasitol Int 2001; 50: 9-13.
6. Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GDH, Louwrier K, Mai NTH, Simpson JA, Hien TT, White NJ. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. Am J Pathol 1999; 155: 395-410.
7. Rieckmann KH, Sax LJ, Campbell GH, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* - An *in vitro* microtechnique. Lancet 1978; 7: 22-3.
8. Haruki K, Kobayashi F, Fujino T, Matsui T, Tsuji M. Evaluation of AnaeroPack (AnP) type as tools of *Plasmodium falciparum* cultivation and drug sensitivity tests. Jpn J Trop Med Hyg 2001; 29: 365-70.
9. Milijaona R, Jambou R, Raharimalala L, Ranaivo L, Ranson MA, Roux J. Mefloquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* in Madagascar: impact on tourists and public health. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94: 313-7.

## シンポジウム：わが国の海外政策と臨床寄生虫学

## 青年海外協力隊における寄生虫感染対策

独立行政法人国際協力機構 健康管理センター\*

田沼順子\*<sup>\*\*</sup>・大塚一美・井上康子・鳴戸 弘

国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター\*\*

岡 慎一・木村 哲

同 研究所

狩野繁之

Key Words : 青年海外協力隊, マラリア, アメーバ赤痢, ランブル鞭毛虫, 住血吸虫

青年海外協力隊事業は38年間の歴史を持つ国際協力機構 (JICA) の主要事業のひとつで, これまでに累計80カ国 (図1), 約25,000名の派遣実績がある。毎年約1,000人を超える若者 (20歳~39歳) が任地に赴き, ほぼ同数が帰国する。派遣期間は原則2年間で, 常に約2,000名を超える隊員 (2004年3月31日現在2,331名, 男女比2:3) が, 在外で活動している。

以下, 青年海外協力隊 (Japan Overseas Cooperation Volunteer : JOCV) に発生する寄生虫疾患の現状と対

策・問題点について報告する。

## JOCVの傷病発生状況

2003年度は, 活動中のJOCVにおいて全3,276件の傷病報告があり, その内737件 (22.5%) が感染症に関するものであった。

熱帯病に関する傷病で最も多かったのはマラリアで, 109件であった。防蚊対策・予防内服・早期診断の重要性に関する啓蒙活動を強化し, 簡易診断キットを導入して確定診断率を向上することによ

Prevention Against Parasitic Infections Among  
Japan Overseas Cooperation VolunteersJunko Tanuma\*<sup>\*\*</sup> Kazumi Otsuka\* Yasuko Inoue\*

Hiroshi Naruto\* Shinichi Oka\*\* Satoshi Kimura\*\* Shigeyuki Kano\*\*\*

\*Health Support Center, Japan International Cooperation Agency

\*\*AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

\*\*\*Research Institute, International Medical Center of Japan

論文請求先: 田沼順子 〒162-8655 新宿区戸山1-21-1 国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター

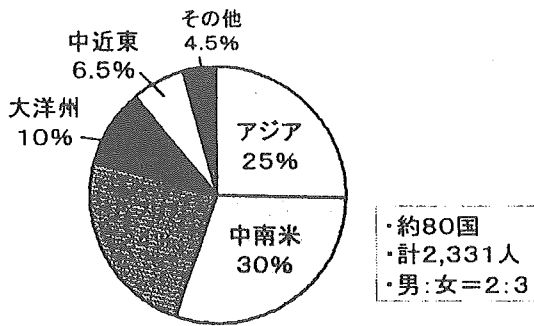


図1 JOCV 派遣地域 (2004年3月31日現在)

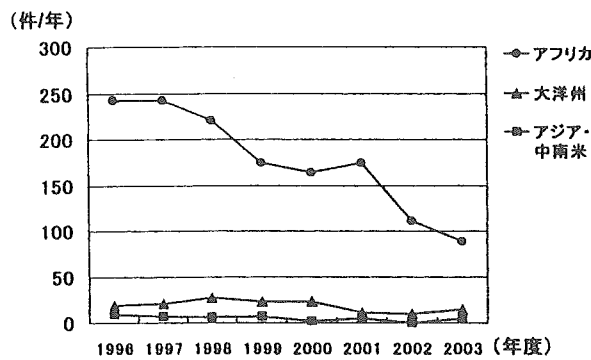


図2 JOCV 派遣地域別 マラリア件数・年次推移

り、マラリアの発生件数は年々減少傾向にある(図2)。

地元住民と同様の食生活となるJOCVでは、腸管感染症も多い。2003年活動中に発症・報告された腸管感染症としては、アメーバ赤痢が最も多く72件、次いでランブル鞭毛虫症が53件であった(図3)。これには、年2回実施する健康診断時の便検査で偶然指摘され、治療せずに経過観察された無症候例は含まれず、治療適応となった有症例のみが含まれる。一方、2003年の帰国隊員において、帰国直後の便検査で寄生虫感染を指摘された例は85件(6.8%)で、ランブル鞭毛虫症が最も多かった。帰国隊員のもとにこの検査結果が届けられるのは、実家に帰省した後である。そのため、地方の様々な医療機関で診療を受けることになる。JICA健康管理センターでは、これら医療機関の診療がスムーズに行われるよう、治療薬や感染症専門医のいる病院などの情報提供を行っている。

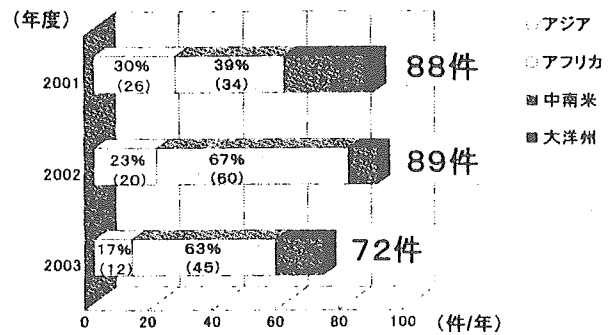


図3-1 JOCV アメーバ性腸炎 発生件数

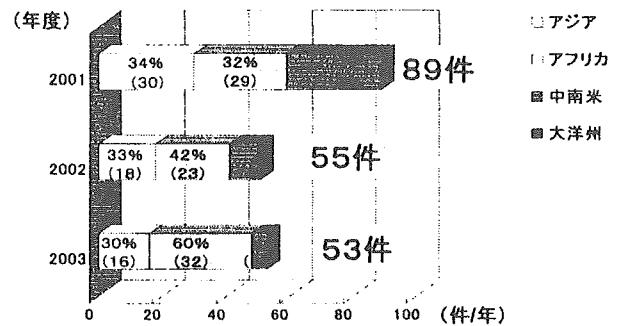


図3-2 JOCV ランブル鞭毛虫症 発生件数

### マラリア対策

2004年2月JICA健康管理センターは職員向けマラリア対策マニュアルを作成し、その基本姿勢を明文化した。同マニュアル策定後、JOCV以外の短期(3ヵ月以内)出張者に対しては、主にメフロキンが供給されるようになったが、JOCVにおいては、2~3年間の長期服用を前提としているため、安全性を考慮しクロロキン・パルドリン併用が勧められている。現状では、薬剤耐性や内服率低下などの問題も多く、今後は、現地顧問医との強力な連携のもと、派遣地ごとに地域性を考慮した予防対策を構築したいと考えている。

### 寄生虫感染に対する血清検査の動き

住血吸虫の流行地から帰国した隊員に対しては、長年、獨協医大熱帯病寄生虫学教室の協力により、 Manson 住血吸虫と日本住血吸虫の虫卵抗原に対する抗体検査を実施してきた。Manson 住血吸虫抗体に対しては、ビルハルツ住血吸虫と交叉反応があり、



3種類の住血吸虫症の血清診断が可能である。抗体検査陽性率は、マラウイを筆頭に、アフリカ諸国から帰国した隊員で高い。しかし、抗体陽性と判定されても、症状がなく、尿検査・便検査も異常ない例がほとんどである。早期診断が困難であるため、治療適応は拡大解釈し、抗体陽性者には全例治療を勧めている。しかし、治療後の抗体価の推移には個人差があり、治療効果判定が難しいという問題がある。最近、様々な寄生虫疾患の血清検査が可能となったが、症状も無いのにJOCV自ら希望し検査する例が散見される。適応と意義を検討した上で検査

するよう呼びかけている。

#### 今後の課題

航空機やインターネットの普及など、世界の国々との距離は縮まった感があるが、SARSの流行にみられるように、感染症を取り巻く状況もグローバル化している。世界中で活動しているJICAは、情報収集だけでなく情報提供という重要な役割を担っているといえる。今後は、世界に広がるネットワークを最大限活用し、また、社会での役割を視野に入れ、より良い健康管理システムを構築してゆきたい。

野外調査地における熱帯熱マラリア *in vitro* 薬剤感受性試験の応用

—ラオス人民民主共和国におけるマラリア疫学調査—

畑生 俊光<sup>1)、2)</sup>、田口 直<sup>1)</sup>、M. Kaiissar Mannoor<sup>3)</sup>、  
渡部 久実<sup>4)</sup>、當眞 弘<sup>3)</sup>、狩野 繁之<sup>2)</sup>

- 1) 群馬大学医学部保健学科
- 2) 国立国際医療センター研究所
- 3) 琉球大学医学部熱帯寄生虫病学
- 4) 琉球大学遺伝子実験センター

はじめに

マラリアは、熱帯・亜熱帯を中心とした約100カ国に蔓延し、年間推定150~270万人が死亡している原虫性疾患であり、早期診断・治療により完治する。1934年に開発されたクロロキンは、副作用の少ない有効かつ安価な抗マラリア薬として世界的に汎用されている。しかしながら、1960年前後に報告されたクロロキン耐性原虫の世界的な分布拡大により、および現在に至っては多剤耐性原虫の出現も報告され、マラリアの治療は一層困難になっている。このような現状の中、マラリア原虫の薬剤感受性に関する疫学情報は、一部地域を除いて正確に把握されているとは言い難く、クロロキン耐性原虫の流行があるとされている地域においても未だ第一選択薬としてクロロキンが使用されている場合がある。このような状況は、薬剤耐性原虫の薬剤感受性低下を增強・促進するのみならず、薬剤耐性原虫の拡散にも繋がると考えられる。この状況を打破するためには、現地で流行している原虫自身の正確な薬剤耐性を把握し、その

分布状況も併せて調査する必要がある。前述のような調査を行うためには、現地で比較的容易に薬剤感受性試験を行うことのできる技術開発と移転が必要と考えられる。

筆者らは、現在までにフィリピン、タイ・ミャンマー国境地域において、冷却装置付携帯型小型恒温槽と酸素吸収・炭酸ガス発生剤（アネロパック®；三菱ガス化学）を組み合わせた熱帯熱マラリア原虫培養システム（アネロパック熱帯熱マラリア原虫培養システム）を利用した *in vitro* 薬剤感受性試験技術を開発・応用し、その実用性を確認してきた<sup>1,2)</sup>。本報告では、同試験技術の実用性をさらに検証するために、2003年7月29日~8月18日にラオス人民民主共和国（ラオス：Lao PDR）東南部サラワン県に属する4ヶ村で、本システムと WHO *in vitro* microplate drug susceptibility test を併用した薬剤感受性試験を試みたので報告する。

ラオス人民民主共和国および調査地域の概要  
Lao PDR は、タイ・ミャンマー・カンボジ

## I 報告

ア・ベトナム・中国に囲まれた人口約530万人の内陸山岳国である。熱帯性気候に属し、夏季・乾季・雨季の3シーズンがある。地域的には、寒暖の差の大きな北部山岳地帯と熱帯性の南部メコン地帯に分類できる。都市部ではマラリア感染の危険性がほぼなくなったとされるものの、人口の約7割に当たる377万人がマラリア感染危険地帯に居住し、年間37万人がマラリアに感染していると報告されている。周辺地域であるカンボジアやタイでは、クロロキン高度耐性原虫の流行や多剤耐性原虫が報告されているが、Lao PDR については感染者実数や原虫の薬剤耐性度に関する疫学統計情報に乏しいのが現状である。

### Lao PDR 東南部サラワン県における調査

我々が調査を行った Lao PDR 東南部サラワン県は、首都ビエンチャンより車で約10時間、直線距離にして約450kmに位置しサラワンを県都とする。調査は、サラワン県に属する4ヶ村で行った(図1)。なお、この調査は、首都ビエンチャンにある Center of Malariology, Parasitology and Entomology (CMPE) の Dr. Viengsay Vanisaveth らと共同で行われ、採血およびインフォームドコンセントは

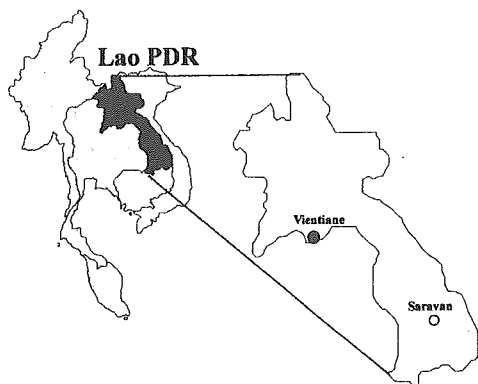


図1 ; Lao PDR 並びに調査地域であるサラワン県



図2 ; *In vivo* 薬剤感受性試験のために投薬されている患者。採血している人物が Dr. Viengxai.

CMPEの規定に基づいて行われた。また、我が国の文部科学省ならびに厚生労働省の共同倫理指針「疫学研究に関する倫理指針(平成14年6月17日)」に定められた規範に照らして適正に本調査を推進した。検査対象者は、4ヶ村の総計1,193名より採血し(図2)、簡易診断キット(Paracheck, Orchid)で熱帯熱マラリアの診断を行い、陽性者からの検体を *in vitro* 薬剤感受性試験に供した。

### アネロパック熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 薬剤感受性試験

マラリア原虫の培養には、低酸素(5~19%)高二酸化炭素(3~10%)のガス条件と37℃の温度条件が必要であり、一般的に精度の高い実験環境が必要である。また、原虫の培養を行う上で、比較的精度の高い実験手技あるいは実験者の熟練が必要とされる。さらに、マラリア原虫は保存・培養のための凍結融解を繰り返すことにより薬剤感受性が変化することが知られている。これらのことから、マラリア原虫採取後できるだけ迅速に、あるいは凍結融解を繰り返さない内に薬剤感受性の試験をすることが望ましいと考えられる。

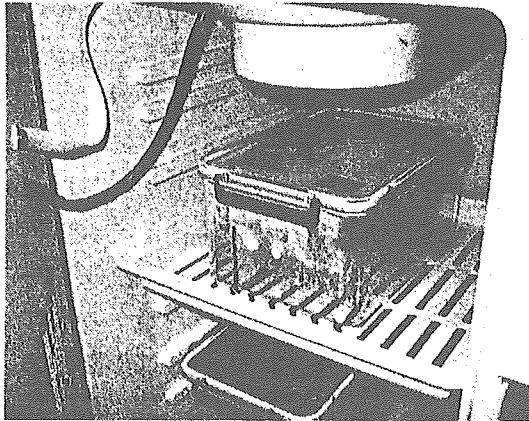


図3 ;ポータブルインキュベーターにWHOマイクロテストプレートを入れたアネロパック角形ジャーを入れるところ。角形ジャーは内部が間仕切りにより広さの異なる3つの小部屋に区分けされている。一番広い空間にWHOマイクロテストプレートを設置し、残りの空間には、それぞれアネロパックと水を入れる。

現地での熱帯熱マラリア原虫薬剤感受性試験は、図3に示すような機材セットを用いて行った(図3)。アネロパック熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 薬剤感受性試験に使用している酸素吸収・炭酸ガス発生剤(アネロパック®)は、アルミ個別包装されておりコンパクトで携行性に優れ、水・火気・触媒が不要で、専用の2.5L密閉容器内に本剤を設置するだけで迅速に設定ガス条件を作出できる。アネロパック®は、設定ガス条件により数種類市販されているが、今回我々は、アネロパック® CO<sub>2</sub>(ガス条件; 15% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>)を使用した。アネロパック®は、容器を開閉する毎に新しいものに交換した。

*In vitro* 薬剤感受性試験方法は、WHOマイクロテスト法<sup>3)</sup>とこの方法を改良したセミマイクロテスト法がある<sup>4,5)</sup>。WHO法は、96穴培養プレートの底に抗マラリア薬が塗布してあり、患者血液を培地で10倍に希釈した検体を50 μlずつ各穴に添加した後、24時間37℃で培養する。培養後、ギムザ染色塗抹標本を作成して観察し、原虫の増殖度を評価する方法である。後者は、24穴培養プレートを用い使用する薬剤をそれぞれ添加する方法である。後者のWHO法の改良点は、培養時間を原虫の成育にあわせて設定する点にある。具

体的には、薬剤の添加されていない検体をいくつか準備し、24時間培養後から原虫の分裂体への生育を一定時間毎に観察し、原虫が分裂体へ成育した時点で全ての検体のギムザ染色塗抹標本を作製し、観察・評価する。

今回の野外調査では、前述の熱帯熱マラリア原虫陽性者12名より分離した検体を用い、WHO法でクロロキンとメフロキンについて薬剤感受性を評価した(表1)。WHO法での原虫の薬剤感受性評価は次の通りである; 1) クロロキン: E穴(薬剤濃度160nM)で分裂体が確認できない場合は感受性、F穴(薬剤濃度320nM)で分裂体を確認できる場合は耐性、F穴で分裂体を確認できないがE穴で確認できる場合を境界型とする。2) メフロキン: F穴(薬剤濃度640nM)で分裂体が確認できない場合は感受性、G穴(薬剤濃度1280nM)で分裂体を確認できる場合は耐性とする。評価した患者分離株の内、9検体(75%)について薬剤感受性の判定が可能であった。クロロキンについて、9検体の内、4検体が耐性、5検体が感受性と判定された。メフロキンについては、9検体全てについて感受性と判定された。このことから、Lao PDRのサラワン県においては、すでに一定のクロロキン耐性熱帯熱マラリアの拡散が認められるが、多剤耐性マラリアの拡散は、今のところ始まっていないと推定できた。またWHO法を利用したアネロパック熱帯熱マラリア原虫 *in vitro* 薬剤感受性試験は、Lao PDRの様な比較的インフラ整備の遅れている発展途上国において

## I 報告

も利用できると考えられた。また、流行地で原虫自身の薬剤感受性を判断する上でも有用な技術であると考えられた。

### 終わりに

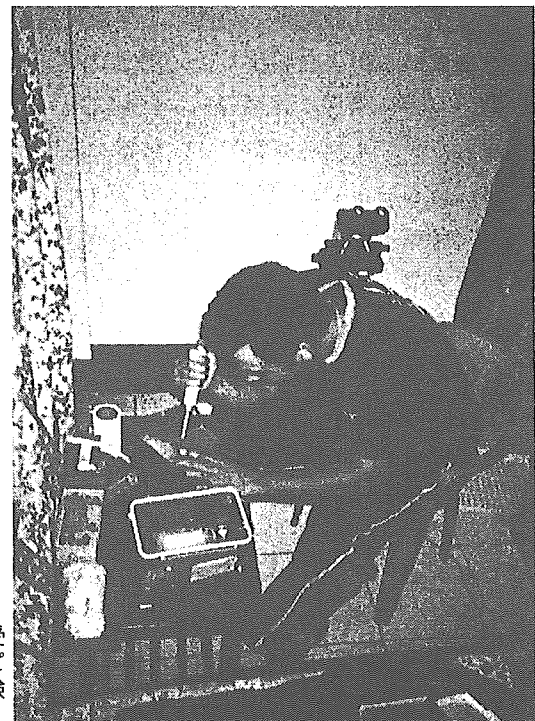
マラリア原虫の薬剤耐性度は、*in vitro* 薬剤感受性試験あるいは *in vivo* 薬剤感受性試験により判定される。マラリア流行地で行われる薬剤感受性試験は、*in vivo* 薬剤感受性試験での報告が圧倒的に多く、Lao PDRにおける熱帯熱マラリア原虫の薬剤感受性に関する知見も、*in vivo* 試験によるものがほとんどであり、*in vitro* 感受性試験による結果は報告されていない。両者ともその試験の性格上一長一短あると考えられる。*In vivo* 薬剤感受性試験の欠点としては、1) 判定までに比較的長い日数を要する、2) 様々な要因(薬剤の吸収、血中濃度等)に結果が左右されやすいと考えられ、正確な原虫自身の薬剤感受性を反映しているかは疑問、3) 試験期間中の患者が試験のフォローアップを拒否したり、来院しなくなるといった点が考えられる。一方 *in vitro* 薬剤感受性試験の欠点としては、1) 一般的に精度の高い実験環境が必要とされ、流行地で前述の実験環境を得ることが難しいこと、2) 原虫の培養を行う上で、比較的精度の高い実験手技あるいは実験者の熟練が必要とされる、の2点があげられる。しかしながら、薬剤感受性を正確に把握するためには、前述の欠点を克服して *in vitro* 薬剤感受性試験を行うことが必要であると考えられる。筆者らが使用したWHO *in vitro* microplate 法を併用したアネロバックマラリア

図4；ラボ代わりにしていたホテルの一室での薬剤感受性試験風景 10倍に希釈した検体を、マイクロピペットを使用して各穴へ添加する。田口氏が実験操作中。

原虫培養システムは、1) 取り扱い・持ち運びが容易であり、2) 設備の整った実験室並みの培養環境が提供でき、3) 使用に熟練を要しないとといった利点がある。今回のラオスでの野外調査の成果から、培養環境としては不適切な条件下でも十分 *in vitro* 薬剤感受性試験を行うことが可能であることを例証した。本システムのマラリア流行地への技術移転は、より質の高い医療サービスの提供や、より正確な疫学情報の取得を可能にし、薬剤乱用による新たな薬剤耐性マラリアの拡散防止につながると考えられた。

### 謝辞

本研究の成果には、「日本学術振興会科学研究費 基盤研究B(2) 海外学術調査「アジア諸国に蔓延する薬剤耐性マラリアのエビデンスに基づいた疫学研究」(1606012)」より研究助成を受けたことを付記する。また、現地



での調査研究に協力いただいた Center of Malariology, Parasitology and Entomology の Drs. Viengsay Vanisaveth、Boualy Keokhamphavanh、Samlane Phompida に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Mizuno Y., et al. Cultivation of *Plasmodium falciparum* isolates under the AnaeroPack® gas condition in a portable thermostatic incubator. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 23; 393-399, 2000.
2. Hatabu T., et al. Field application of *in vitro* drug susceptibility test using AnaeroPack® malaria culture system in Thai-Myanmaer border. Clin. Parasitol. 13; 75-77, 2002.
3. Rieckmann KH., et al., Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*- An *in vitro* micro-technique. Lancet Vol. 7, 9-13, 1978.
4. 林清華他 酸素吸収・炭酸ガス発生剤とポータブル小型恒温槽を用いた熱帯熱マalaria原虫の薬剤感受性試験。感染症学雑誌 Vol. 73, 1099-1103, 1999.
5. Hatabu T., et al., AnaeroPack® Malaria Culture System with Portable Thermostat: Its Field Application to *In vitro* Drug Susceptibility Testing of *Plasmodium falciparum*. Clin Parasitol. Vol. 11 (1), 130-132, 2000.

表1 培養血管と *In vitro* 薬剤感受性試験結果

検体番号	検体採取時の寄生率 (%)	薬剤感受性試験結果	クロロキン感受性*	メフロキン感受性*
A	0.015	成功	S	S
B	0.36	成功	S	S
C	0.001	失敗	—	—
D	1.97	成功	S	S
E	0.91	成功	R	S
F	0.001	失敗	—	—
G	0.01	成功	R	S
H	0.13	成功	R	S
I	0.002	成功	R	S
J	0.004	成功	S	S
K	0.007	成功	S	S
L	0.039	失敗	—	—

\*S; 感受性、R; 耐性

# 輸入マラリアの現状と治療・予防

木村 幹男\*・狩野 繁之\*\*

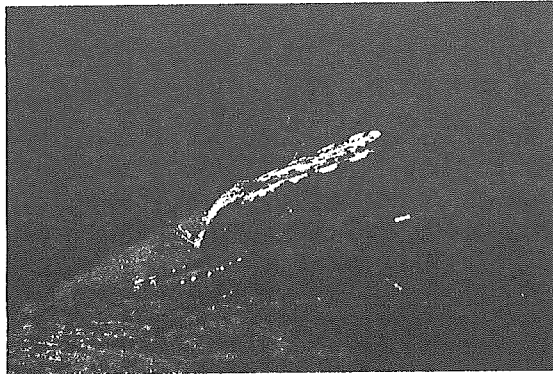


写真1 皮膚に留まって吸血中のハマダラカ  
翅には特有のまだらの模様を有し、皮膚に留まっているときには腹部を挙上している。国内にも数は少ないが、数種のハマダラカがいまだに生息している。

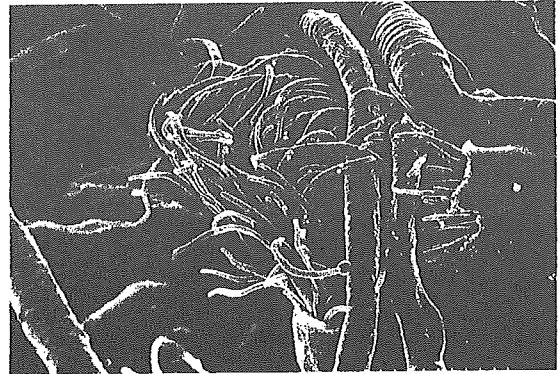


写真2 マラリア原虫のスポロゾイトの走査型電子顕微鏡像  
(国立感染症研究所昆虫医科学部提供)  
ハマダラカの中腸内で雄性、雌性の生殖体が合体・受精し、最終的に形成されたオーシストの中からスポロゾイト(多数の細い糸状)が遊出している。これがハマダラカの唾液腺に集まり、ヒトへの感染源となる。

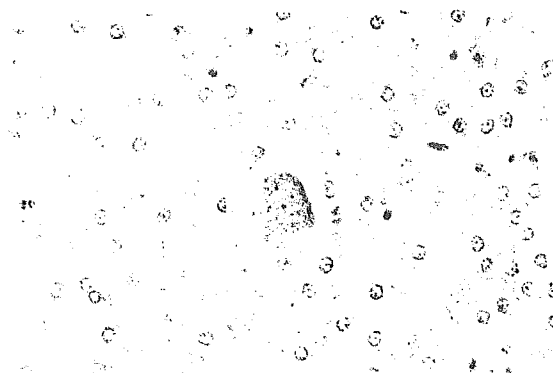


写真3 肝内型マラリア原虫の分裂体、ネズミマラリアでのHE染色  
肝細胞の2～3倍の大きさの分裂体が中央にみられる。成熟した肝内型の分裂体は直径がおよそ45～60 $\mu\text{m}$ で、中に1～3万個の分裂小体(メロゾイト)を包蔵する。

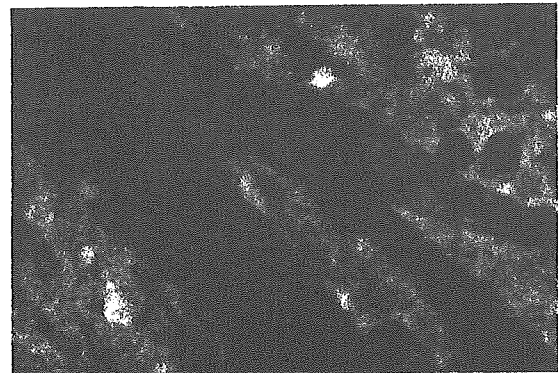


写真4 脳血管におけるマラリア原虫のsequestration, 脳スタンプ標本のギムザ染色  
熱帯熱マラリア原虫(粒状)感染赤血球が、脳微小血管の中に閉塞している。紡錘状のものは脳血管内皮細胞の核を示す。

\*Mikio KIMURA 国立感染症研究所感染症情報センター/室長  
\*\*Shigeyuki Kano 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部/部長

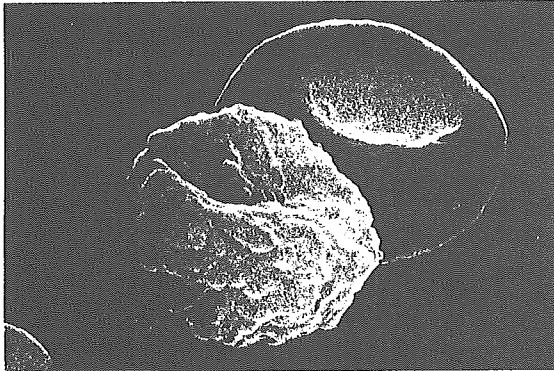


写真5 マラリア原虫感染赤血球表面のknob, サルマラリアでの走査型電子顕微鏡像に着色 (獨協医科大学・川合覚博士提供)  
右: 平滑な表面を示す非感染赤血球, 左: 多数のknobを有して不整な表面を示す感染赤血球。

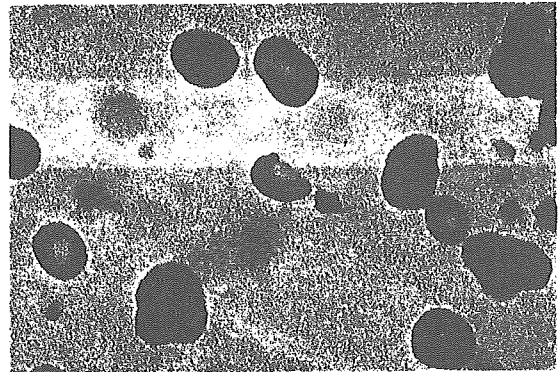


写真7 熱帯熱マラリア原虫の生殖母体, 血液塗抹標本のギムザ染色

バナナ, ソーセージあるいは鎌の形と形容される。原虫は赤血球膜に被われている。治療が迅速・適切に行われた場合など, 全経過を通じてみられないことも多い。ヒト体内では殆ど無害であり, 合体・受精による分裂・増殖はなく, 自然に消失する。しかし, ハマダラカに吸血されると雄性あるいは雌性生殖体となり, 中腸内で合体・受精して, 最終的に感染性を有するスポロゾイトが形成される(写真2を参照)。

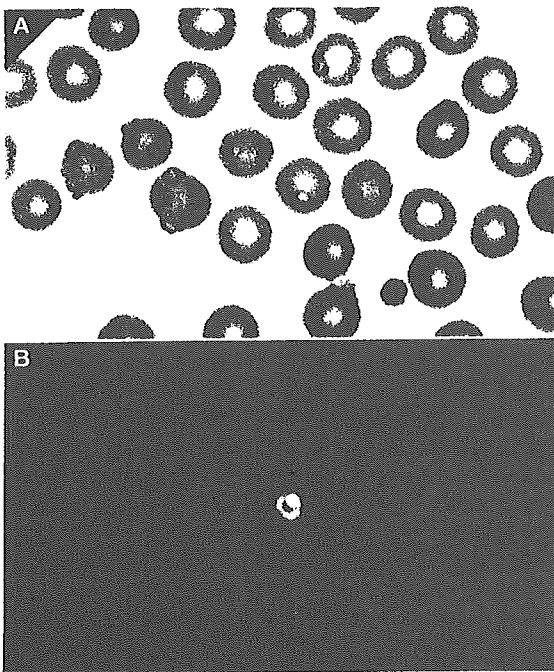


写真6 熱帯熱マラリア原虫の輪状体

- A. 血液塗抹標本のギムザ染色: 感染赤血球の大きさは普通で, 赤血球内斑点はなく, 原虫はときに赤血球内に偏在している。また, 原虫クロマチン(赤紫色)は複数がつながったり, 離れてみられることもある。
- B. 血液塗抹標本のアクリジンオレンジ染色: 黄色で丸い部分が原虫のクロマチン, 赤い輪状の部分が細胞質。

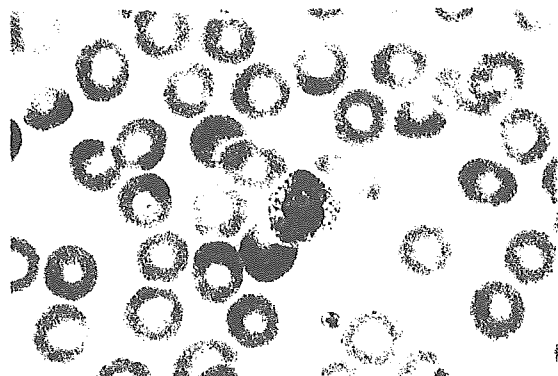


写真8 三日熱マラリア原虫の栄養体, 血液塗抹標本のギムザ染色

感染赤血球は大きく, 顕著な斑点(シュフナー斑点)がみられ, 原虫はアメーバ様の形態を示す。



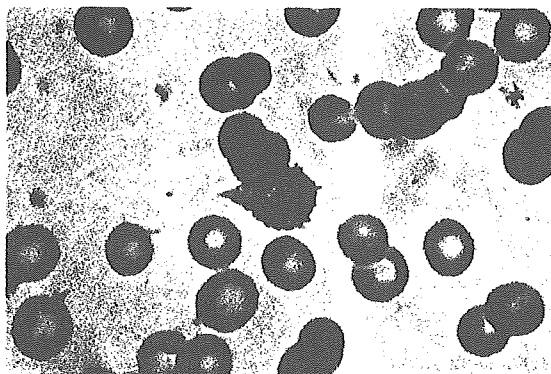


写真9 卵形マラリアの栄養体、血液塗抹標本のギムザ染色

感染赤血球はやや大きく、ときに卵形を示し、表面に棘を有し、長軸端が鋸歯状になることもある。また、シュフナー斑点を有する。原虫は三日熱マラリア原虫と比べて、アメーバ様の形態が顕著ではない。

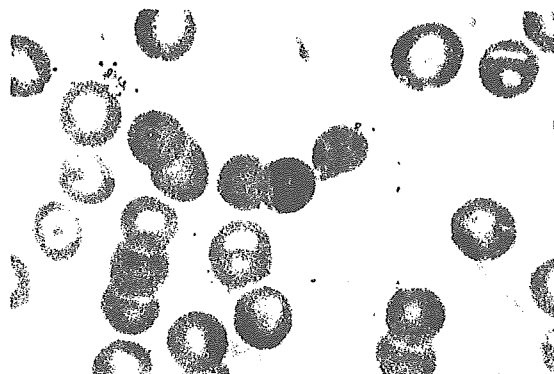


写真10 四日熱マラリア原虫の帯状体、血液塗抹標本のギムザ染色

栄養体(後期栄養体、アメーバ体)のステージであるが、特徴的な帯状体(band form)を示す。感染赤血球はやや小さく、斑点はみられない。



写真11 アフリカ小児での熱帯熱マラリアによる脳症  
意識障害と、開眼状態での左側への共同偏視を示す。マラリア流行地の小児の脳症では、致死率が20%あるいはそれ以上と言われる。

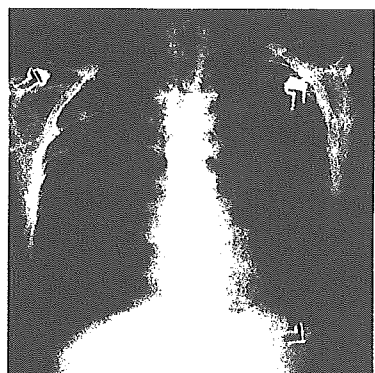


写真12 熱帯熱マラリアによる肺水腫/ARDSの胸部レ線像  
右全肺野、左上肺野に顕著な陰影がみられるが、心拡大はみられない。危険な合併症であり、治療に反応して原虫数が減少してから出現することも多い。



写真13 熱帯熱マラリアにおける出血傾向  
検査でDICの所見を呈しても、必ずしも真のDICは多くないとされている。

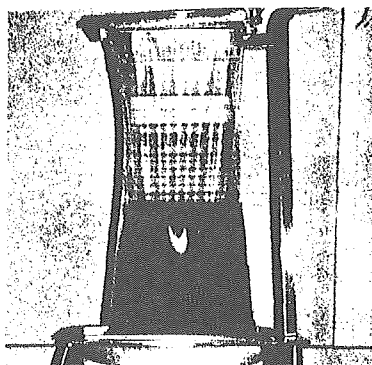


写真14 熱帯熱マラリアにおける黒水熱

高度の血色素尿症のため、ココア色を示す。ときに急性腎不全に至ることがある。重症例でキニーネ投与後に出現することが多いが、G6PD欠損者が酸化性薬剤(プリマキンなど)あるいは非酸化性薬剤のキニーネを服用して出現することもある。

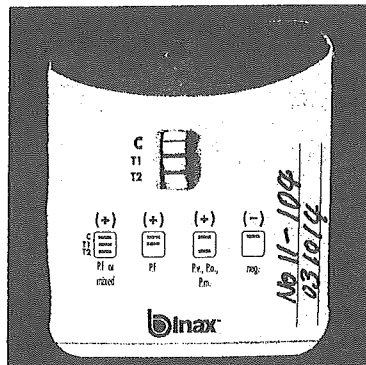


写真15 Now<sup>®</sup> Malaria(Binax社)による抗原検出

本症例は熱帯熱マラリアであることを示す(下半分の判定基準を参照)。  
C:コントロールのバンド, T1:熱帯熱マラリア原虫に特異的な抗原(histidine-rich protein 2)のバンド, T2:4種のマラリア原虫に共通な抗原(原虫由来アルドラーゼ)のバンド。

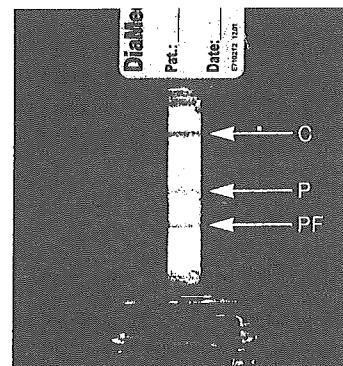


写真16 OptiMAL-IT(DiaMed社)による抗原検出

(防衛医科大学校・春木宏介博士提供)  
本症例は熱帯熱マラリアであることを示す。  
C:コントロールのバンド, P:4種のマラリア原虫に共通な抗原(原虫由来乳酸脱水素酵素)のバンド, PF:熱帯熱マラリア原虫に特異的な抗原(原虫由来乳酸脱水素酵素)のバンド。

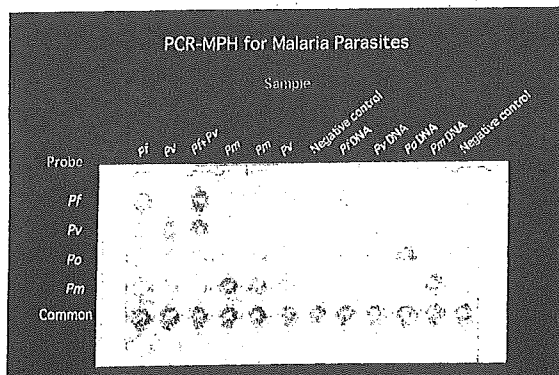


写真17 マイクロタイタープレート・ハイブリダイゼーションを用いたPCR法のプレート像

本法は岡山大学綿矢、湧永製薬山根らにより開発された。横1段目のウェルは熱帯熱マラリア原虫(Pf), 2段目は三日熱マラリア原虫(Pv), 3段目は卵形マラリア原虫(Po), 4段目は四日熱マラリア原虫(Pm)に特異的なプローブを固相化してある。縦1列目の検体は熱帯熱マラリア, 2列目は三日熱マラリア, 3列目は熱帯熱および三日熱マラリアの混合感染, 4および5列目は四日熱マラリア, 6列目は三日熱マラリア(弱陽性), 7列目は陰性対照を示す。8列目以降は検体として全血でなく、陽性および陰性対照からの抽出DNAを用いている。



写真18 典型的な“Bull's Eye”を呈するクロロキン網膜症の蛍光眼底像

マラリア流行地で生まれ育ち、過去に治療で服用したクロロキン塩基が総量150gを超していた症例。黄斑部周辺には網膜色素上皮の萎縮によるドーナツ状のwindow defect(過蛍光)がみられる。Window defectはアーケード血管下方まで拡大している(国立国際医療センター眼科・八代医師)。予防でクロロキンの服用を長期間続ける場合にも注意が必要である。

# 輸入マラリアの現状と治療・予防

木村 幹男\*・狩野 繁之\*\*

## はじめに

マラリアは流行地における morbidity と mortality, 経済損失などの要因として深刻な問題であるが, 先進国から流行地への旅行者や滞在者が増え, 逆に流行地から先進国への入国者も増えているので, 輸入感染症としても重要性を増している。特に, 不十分なマラリア予防, 発症後の受診の遅れ, 医療機関での診断の見逃しや遅れ, 治療の遅れや不適切な治療などがわが国のみならず, 欧米先進国でも問題となっている。本稿では輸入マラリアの疫学, 治療・予防の現況などについて述べ, 旅行者のマラリアを中心とする輸入マラリアの対策に資することを旨とする。

## I. マラリア概説

### 1. マラリア原虫の生活環

マラリアはハマダラカ属の蚊に媒介される疾患である。病原体は原虫に属し, ヒトに感染するマラリア原虫としては熱帯熱(病原体は *Plasmodium falciparum*), 三日熱(*P. vivax*), 卵形(*P. ovale*), および四日熱マラリア原虫(*P. malariae*)の4種類がある。蚊の刺咬により体内に入ったマラリア原虫は血中から速やかに肝細胞に侵入し(一次肝臓内ステージ), その後肝細胞内で分裂・増殖してから血中に放出され, それらは赤血球内に侵入して分裂・増殖を繰り返す(赤血球内サイクル)(図1)。一次肝臓内ステージでは無症状であり, 発熱を含むマラリアの症状は赤血球内サイクルにより引き起こされる。さらに, 三日熱, 卵形マラリアでは肝細胞内に潜伏する原虫(休眠原虫)が形成され, これが一定期間後に分裂・増殖すると再発を生ずる。

### 2. マラリアの症状・徴候

マラリアでは悪寒を伴う発熱を生ずるが, 三日熱, 卵形マラリアでは殆どの場合戦慄もみられる。熱帯熱マラリアは最も悪性のマラリアであるが, 戦慄がみられないことも多い。三日熱, 卵形マラリアでの1日おきの発熱, 四日熱マラリアでの2日おきの発熱は

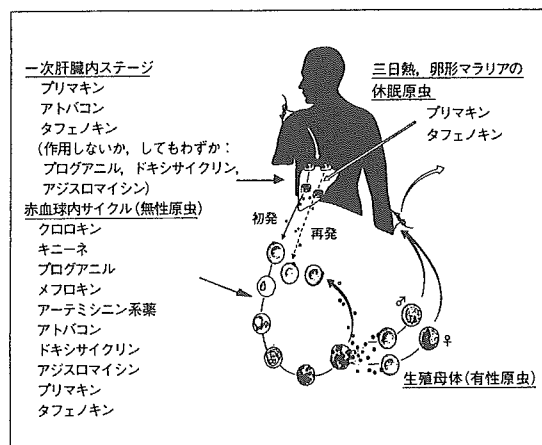


図1 ヒト体内におけるマラリア原虫の生活環と抗マラリア薬の作用(文献1より改変)

始めからではなく, 連日の発熱が数日間続いた後にみられることが多い。さらに, 発熱とともに頭痛, 筋肉痛, 関節痛, 全身倦怠感なども生ずる。ときに下痢, 悪心・嘔吐, 腹痛などの腹部症状や乾性咳嗽がみられることもあり, 感染性腸炎, 気管支炎や肺炎などと誤診されがちである。

マラリアは多くの場合, 発熱およびその随伴症状のみで終わるが, 熱帯熱マラリアで治療開始が遅れた場合, 治療が不適切な場合, 高齢者の場合などに脳症, 肺水腫/ARDS, 腎症, 肝障害, 重症貧血, DIC様出血傾向, 低血糖, 代謝性アシドーシスなどを生じて急速に重症化しやすく, 死亡の危険もあり, 重症マラリアと呼ばれる(表1)。マラリア診療の最大の留意点は重症マラリアの阻止である。

一般検査では血小板減少, LDH上昇, 総コレステロール低下, 総蛋白(アルブミン)低下などがみられるが<sup>3)</sup>, 発病初期にはこれらの所見が揃わないこともある。白血球数は正常~軽度減少のことが多いが, 特に重症化した場合などでは増加することもある。

\*Mikio KIMURA 国立感染症研究所感染症情報センター/室長

\*\*Shigeyuki KANO 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部/部長

表1 重症マラリアの合併症(文献2より改変)

合併症	機序	診断	治療
脳症, 反復痙攣	マラリア原虫感染赤血球による脳血管の閉塞	刺激しても覚醒しない昏睡, 他の脳症の原因を否定. 24時間に2回以上の反復する痙攣	誤嚥の防止, 正確な水電解質バランスの算定, 痙攣のコントロール
肺水腫/ARDS	体液過剰, 肺毛細管での透過性亢進, 心性ではない	呼吸状態, 胸部レ線像, 中心静脈圧などの総合判断	上半身挙上や起坐位, 酸素投与, 瀉血, 利尿剤, 血管拡張剤, 機械的人工呼吸法, 血液濾過や血液透析
急性腎不全	腎皮質の血流減少による急性尿細管壊死	24時間尿量<400mLで, 血清クレアチニン>3.0mg/dL	脱水との鑑別, 高カロリー低蛋白食, 血液透析や血液濾過
出血傾向	不明であるが, 真のDICは稀	歯肉, 鼻腔, 消化管などからの自然出血, あるいは真のDICの検査所見	ヘパリンは禁忌あるいは慎重投与, ビタミンK, 新鮮凍結血漿, 濃厚血小板
低血糖	キニーネのインスリン分泌作用, その他不明の機序	血糖<40mg/dL	50%ブドウ糖液50mLの静注後, 10%ブドウ糖液の点滴静注
重症貧血	不明であるが, 正常赤血球も破壊される	原虫数>10,000/ $\mu$ LでHb<5g/dL, あるいはHt<15%	必要に応じて輸血, ただし肺水腫/ARDSに注意
循環虚脱(ショック)	脱水, 消化管出血, 肺水腫/ARDS, 敗血症, キニーネ過剰	収縮期血圧<70mmHg, または核心温度と皮膚温度の差>10°C	原因に応じた治療
代謝性アシドーシス(乳酸アシドーシス)	微小血管閉塞による組織での嫌気性解糖, 肝や腎による乳酸処理の低下, 原虫による乳酸の産生	動脈血pH<7.35, あるいは血清HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <15mmol/L	循環血液量減少があれば補液, 重炭酸ナトリウムでの補正は肺水腫/ARDSに注意, しかも有効でないことも多い. アスピリンはアシドーシスを助長. 幼小児で貧血がある場合, とくに輸血が有効. 血液濾過や血液透析も考慮
肉眼的ヘモグロビン尿(黒水熱)	キニーネによる感作, 高度な血管内溶血	マラリアの急性期症状で, 単にG6PD欠損者に酸化性薬剤を用いた結果ではない肉眼的ヘモグロビン尿	キニーネの中止, 他の抗マラリア薬への変更

を失っているのにもかかわらず, 未だ免疫を保有していると誤解しており, マラリア予防をないがしろにする傾向がある. 彼らは友人や親戚を訪ねて里帰りしたときにマラリアに罹患する例が多いことからVFRs(visiting friends and relatives)と呼ばれ, 特に啓発を行うべき対象とされている<sup>5)</sup>. 熱帯熱マラリアでの致死率は国により大きく異なり, 最大はドイツで3.6%に上る一方, 英国では0.7%と低値であったが, どの程度実情を反映しているのかは問題である.

その後のヨーロッパでのマラリア症例については, 特にフランスでの報告数の増加が目立ち, 1998~2001年では年間2,900~4,200例が報告され, 実際には5,900~8,100例の発生があると推定されている<sup>6)</sup>. フランスではVFRsの割合が多いことから感染国の9割以上がアフリカで, 型別では8割以上が熱帯熱マラリア

であった. 英国では上記期間に年間1,100~2,100例, ドイツでは800~1,000例の報告がなされている.

ヨーロッパ人を主とする旅行者での地域別罹患率をみると, マラリア流行地の間で大きな差がみられる. マラリア全体としてはソロモン, パプアニューギニアなどの南太平洋諸島が最も高く, 西アフリカ, 東アフリカと続く(図2). インド亜大陸, 東南アジアでは上記アフリカの数分の一となり, 南米, 中米ではさらに低くなる. しかし, 熱帯熱マラリアに限定すると西アフリカが最も高く, 南太平洋諸島と東アフリカが同程度で続いている. 個々の旅行者に対するマラリア予防のアドバイスをする場合, この種のデータを生かしてきめ細かく行う必要がある.

前述のように各国でのサーベイランスデータの解釈には限界があるが, ヨーロッパでは1999年, 輸入感染症を扱う専門病院の参加を得て旅行者感染症の

## II. 輸入マラリアの現状

### 1. 海外における輸入マラリア

殆どの先進国でマラリアは報告疾患となっているが, サーベイランスの質や報告様式が様々であり, 現実をどの程度正確に反映しているかどうかは問題である. 各国の公式報告を元にして1985~1995年の期間を対象に, ヨーロッパ23カ国での輸入マラリアの解析が行われたが<sup>4)</sup>, 年間の総症例数は1985年に6,840例, 1995年に7,244例で, 最大は1989年の8,438例であり, 国別では英国, フランス, ドイツ, イタリアの順であった. 熱帯熱マラリアの占める割合はフランスが82.2%, イタリアが72.6%で, 英国の56.2%と比べると多かったが, これは両国においてアフリカからの移民が多いことを反映している. 彼らはマラリア非流行国に長期居住した結果, 以前に獲得したマラリアの免疫