

変異サイト解析

アルテミシニン耐性の公式レポート以前にアジア、アフリカ、南アメリカ、オセアニアの計 14 カ国から得られた 581 検体において K13 プロペラ遺伝子配列を決定した (1279bp~2137bp、427 から 708 アミノ酸)。25 の多型サイトがあり、21 (84%) の SNP は singleton であった (図 2)。非同義置換は 19、同義置換は 6 であった。

26 の塩基によるハプロタイプが見られた (図 3)。最も prevalent であったものは、Hap_1 (3D7 strain) であり (546/581, 94%) であり、全ての国において最も良く見られるタイプであった。22 (85%) ものハプロタイプは singleton haplotype であった。

K13 プロペラ遺伝子変異の地域分布

変異頻度には地域差がみられた (図 4)。16 の SNPs はサンプリング時にアルテミシニンが第一選択薬として使用されていた 3 国 (カンボジア、タイ、ミャンマー) に存在していた。この地域では 16% の原虫が何らかの変異を持っていた。一方、アルテミシニンを使用していない残り 11 カ国では 2% の原虫にしか変異は見られず、観察された SNP はいずれも singleton であった。

今回観察された SNP の多く (17SNPs 68%) はこれまで報告のない SNP であった。残り 8 つが報告のある SNPs のうち、3 つ (C580Y、G449A および R561H) はアルテミシニン耐性との関連が報告されている SNPs であった。最も頻度の高い SNP は C580Y であり、カンボ

ジアの株の 20% に見られた。一方、transfection によりアルテミシニン耐性を付与することが明らかになっており、かつ東南アジアに広く分布していることが報告されている 5 つのアルテミシニン関連変異 (M476I、Y493H、R539T、I543T) は観察されなかった。530 番の同義置換は地理的に離れたガーナとミャンマーにそれぞれ singleton として存在していた。

上述した 580 番のみに変異を認めるハプロタイプ (Hap_2) はカンボジアにのみ広く存在し、当地で自然選択を受けている可能性が示唆された。ハプロタイプ多様度はサンプル時に ACT を導入している国の方が有意に高い値を示した ($P = 0.0049$)。

D. 考察

1. マラリア迅速診断キットからの原虫 DNA 抽出の試み

マラリア診断装置の開発にあたり、その診断装置がどこまで低濃度のマラリア原虫を診断しうるのか、そしてそれはどこまで正確な診断能を持つのか、についてしっかり評価することは重要である。我々は、このようなフィールドテストから得られた結果をもとに対応策を考え、より高感度かつ高特異度でマラリア感染を診断できる装置へと開発機器の改良をすすめている。

現在我々は、マラリア診断の gold

standardとして種特異的PCRを用いている。同時に、厚層/薄層ギムザ染色標本による検討も実施、双方の結果を総合的に評価している。ギムザ標本はフィールドにおいてルーチンでおこなっている検査であり、結果の入手は容易であるが、PCRに用いる原虫DNAの入手はルーチンでは不可能である。本年度は、マラリア流行地での疫学研究の一環としてフィールドテストをおこなっており、DNA診断用血液サンプルの入手にあたっては、RDTでマラリア感染を示した患者に対し、現地医療スタッフ（現地医師）が、研究の目的と利益、不利益について説明、同意を得たうえで、患者から新たに採血し、血液を入手している。しかし、機器の開発が進むにつれて、より多くの検体を用いたフィールドテストが可能となってくるが、現在おこなっている方法では、かかる時間およびコストの点で、必要とされる検体数を満たすことが難しいことが予想される。そこで我々は使用済RDTキットおよび血液ギムザ染色標本から原虫DNAを抽出する方法について検討をおこなった。

RDTキットのニトロセルロース膜上には、通常5uLの血液が投下される。仮に、本診断キットの培養原虫を用いた診断限界である200万個の赤血球中に1個のマラリア原虫が感染している場合でも、RDTキットには5-10個のマラリア原虫が存在する。そこで、培養原虫を用いて200万個の赤

血球中に1個から10000個までの感染濃度を持つRDTを作成し、原虫DNAの抽出を試みた。その結果、200万個の赤血球中に1個の感染でも原虫DNAを抽出することが可能であった。

原虫の抽出にあたり、工夫を要した点は2つある。一つはニトロセルロース膜を全て使うこと、もう一つはDNA抽出にChelexを用いたboiling法を用いることである。通常はキアゲンから販売されているDNA miniキット等のクルードサンプルからのDNA抽出に最適化された方法を用いているが、RDTからの原虫DNA抽出では十分な結果が得られないことが近年明らかになっている。

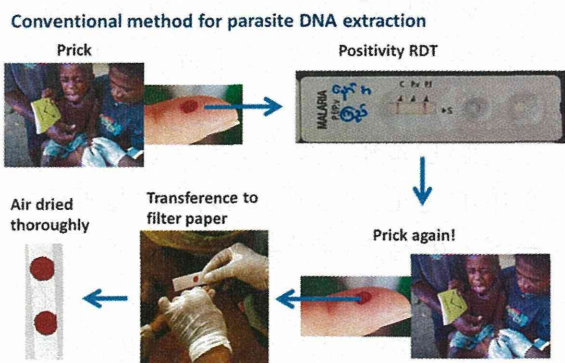
フィールドサンプルを用いた検討では、RDTサンプルの保存期間と抽出成功頻度に有意な相関が見られた。また、原虫陽性を示すバンドの強さとの間にも相関が見られた。

さらに、厚層/薄層ギムザ染色標本からのDNA抽出も試みた。本手法によっても、0.05%の感染率を示した臨床検体からDNAを抽出することができた。今後フィールドテストを行う中で、より低感染濃度の臨床検体スライドも入手される可能性がある。このような検体を用いて、DNA抽出を試みる予定である。

開発機器のフィールドテストに関して、本年度はRDTによるマラリア陽性患者を中心におこなった。これは、診断感度を上げることを機器開発の優先課題としたためである。しかし、

次年度は、診断感度の向上と平行して、診断特異度を限りなく 100%に近づけるためのフィールドテストも重点開発課題としている。特異度の評価には、RDT 陰性、顕微鏡診断陰性の症例と本診断機器の結果を対応させ、評価していくことが必要である。

しかし、ここで問題となるのは、上述した血液検体の入手である。とりわけ、マラリア陰性と診断された患者は、基本的に新たな採血の必要性がなく、そこからの血液入手は困難が大きい。しかし、今回の検討により、200 万個の赤血球中に 1 個であっても RDT から原虫 DNA を抽出しうる事が示された。まだ検討を有する点はいくつかあるが、次年度のフィールドテストにおいては、この結果をふまえたサンプリング戦略を立てることが可能である。



これまでは採血を 2 度おこない、原虫 DNA 抽出用検体を採取していた。大量検体をテストするにはこの方法では様々な負担がある。

これまで、ルーチンの検査後に新たな採血をお願いしていたが、新しい方法では、マラリア感染の疑われた患者におこなうルーチン検査に本機器に

よる診断を加えてもらう。患者からは診断装置で用いる数マイクロの血液を余分にいただくことになるが、新たな採血を必要とせず、かつルーチンでおこなわれる指頭採血で十分なため、実質上のさらなる患者負担は 0 と言える。

2. アルテミシニン耐性関連遺伝子 K13-propeller の変異解析

本マラリア診断装置はマラリアの定量診断を **primary function** としているが、感染種の鑑別及び薬剤耐性の診断も可能な装置に **grade-up** されていく予定である。

現在、グローバルなマラリア治療はアルテミシニン誘導体が中心となっている。アルテミシニンと同等もしくはそれを越える治療効果を持つ抗マラリア薬はいまだ開発されておらず、アルテミシニン耐性の出現・拡散がグローバルなマラリア対策に与える影響は計り知れない。

アルテミシニン耐性原虫の出現が 2007 年、カンボジア・タイ国境地域で確認された。その後の調査により、アルテミシニンに対する感受性低下マラリア原虫はカンボジア・タイ国境を中心に広範囲に分布していることが明らかとなった。タイ・ミャンマー国境では、2001 年に 0.6%だった感受性低下原虫の頻度は、2010 年には 20%まで上昇している。

しかし、現在 WHO は感染患者へのアルテミシニン投与 3 日後の血中原

虫陽性の有無により、ACT感受性低下原虫を同定することを推奨している。本手法の実施にあたっては、必ず治療が適切になされたかを確認し、患者を定期的に follow up する必要がある。しかし実際には、治療により症状の軽快した患者から採血をすることは容易ではなく、そもそも患者が follow-up に来ないことも多い。このため、様々な地域におけるアルテミシニン耐性原虫頻度の掌握は、効果的なマラリア対策の実施にあたり、最も重要な疫学情報のひとつであるにも関わらず、科学的解析に必要な質と量をもったデータを得ることが困難となっている。

薬剤耐性原虫の出現とその広がりを検討する際に、分子疫学的手法を用いる利点は、簡便かつ客観的なデータが得られることである。本診断装置は個人レベルでのマラリア診断に用いられることを第一とするが、同時に地域におけるマラリア疫学のアセスメントへの応用も想定している。薬剤耐性への応用を考えた場合、データの信頼性については、選択した分子マーカーの質に大きく依存する。分子マーカーとしてはターゲットとする薬剤耐性に機能の点で直接関係する遺伝子、あるいはそのような遺伝子と強くリンクする一塩基多型が用いられる。

これまでアルテミシニン耐性関連遺伝子はなかなか同定されてこなかったが、本年、ターゲットマーカーとしてK13プロペラ遺伝子が発見された。K13プロペラ遺伝子は、アルテミシニ

ン耐性の直接的な原因遺伝子である可能性が高い。しかし、その原虫内の局在や機能についてはほとんどわかっていない。当初4つのSNPsがアルテミシニン耐性と関連していることが報告された。

今回、全流行地を網羅する大規模サンプルを用いてK13プロペラ遺伝子のベースライン多型について検討した。その結果、アルテミシニンを使用していない集団において2%に変異が見られた。変異箇所は10であり、ほぼ全てが singleton であった。またこれらはいずれもアルテミシニン耐性と関連する変異として報告されている変異と一致しなかった。

以上の結果から、K13プロペラ遺伝子のベースライン多型レベルは極めて低く、アルテミシニンの使われていない集団にみられる多型とアルテミシニンにより選択された多型が一致していないことから、アルテミシニン分子マーカーとして非常に有用であることが期待される。

しかし本年、東南アジア、アフリカを中心とした広域にわたる大規模サーベイの結果が報告され、フィールドからの原虫では23ものSNPsが存在、その多くがアルテミシニンの治療効果低下と関連していることが明らかになっている。このように、アルテミシニンが使用されている地域では、K13プロペラ遺伝子には、数多くのSNPsが存在しており、それぞれの意義についてはまだ十分にあきらかになっていない。さらなる検討により、

地域固有のアルテミシニン耐性関連 SNP を明らかにし、オンチップ PCR 解析に向けた条件の洗い出しを進めることが、マラリアの定量から感染種～薬剤耐性診断まで包括する総合マラリア診断装置としての本開発機器の進化につながる。

E. 結論

超高感度マラリア診断装置の開発に向けた医学、生物学的研究として、

① 使用済マラリア迅速キットからのマラリア原虫遺伝子の抽出法の最適化とその評価を行った。培養原虫を用いた系での本診断装置の感度と同様の感度で原虫 DNA の抽出、PCR での原虫確認をおこなうことができた。本手法を用いることで、対象患者にさらなる採血なしで、フィールドテストをルーチン化することが可能である。

② 本装置の最終型は種の診断および薬剤耐性の診断も可能な装置に grade-up されていく予定である。その際、薬剤耐性分子マーカーとして、本年 1 月に発見されたアルテミシニン耐性責任遺伝子 (K13 プロペラ遺伝子) のベースライン多型を解析した。解析サンプルは全流行地を網羅する 581 例で結果を得ることができた。その結

果、耐性に関連するとされている SNP はアルテミシニン開始以前の検体には見られなかった。今後、アルテミシニン開始後の検体を検討することにより、耐性診断分子マーカーとして、本診断機器で用いることが可能な SNP を同定する予定である。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告 (総括) に纏めて記入

G. 研究発表

(学会発表)

第 84 回日本寄生虫学会大会

演題名:アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫出現以前の大規模検体を用いた耐性候補遺伝子

K13-propeller のベースライン多型解析

英語演題名:Large-scale analysis of K13-propeller gene in Plasmodium falciparum isolates obtained before the first report of artemisinin resistance

平成 27 年 3 月 22 日、杏林大学

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 培養熱帯熱マラリア原虫を用いた RDT からの原虫 DNA 抽出結果

Target	Extracted RDT position	PCR amplify				
		2pRBC/ul	20pRBC/ul	200pRBC/ul	2000pRBC/ul	10000pRBC/ul
PCR Dx (ssrRNA)	全量: Whole	×	●	●	●	●
PCR Dx (ssrRNA)	遠位: Distal	×	×	×	×	●
PCR Dx (ssrRNA)	近位: Proximal	×	×	●	●	●
Pfprt K76T	全量: Whole	×	●	●	●	●
Pfprt K76T	遠位: Distal	×	×	×	●	●
Pfprt K76T	近位: Proximal	×	×	●	●	●
mt DNA (CoxI)	全量: Whole	●	●	●	●	●
mt DNA (CoxI)	遠位: Distal	×	●	●	●	●
mt DNA (CoxI)	近位: Proximal	×	●	●	●	●
beta-tubulin	全量: Whole	×	●	●	●	●
beta-tubulin	遠位: Distal	×	×	×	×	●
beta-tubulin	近位: Proximal	×	●	●	●	●

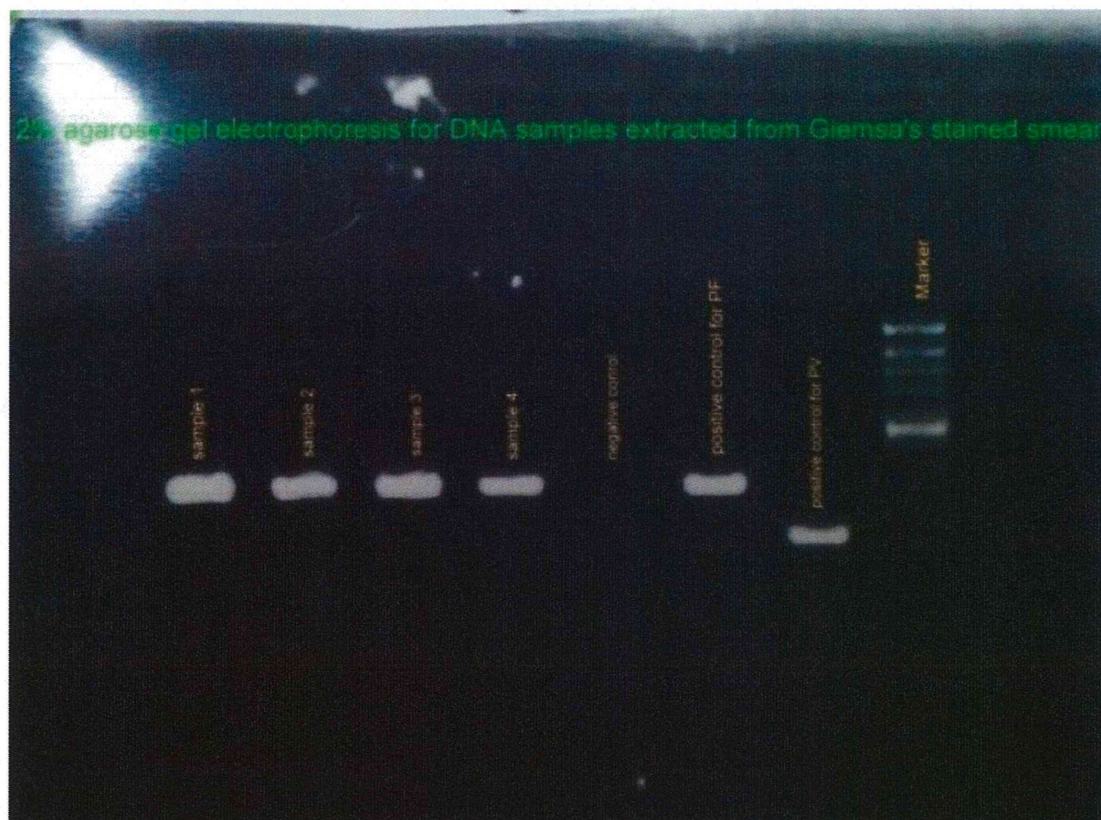
表2 ミャンマーから得られたフィールド検体を用いた RDT からの原虫 DNA 抽出結果 (採取後 3 ヶ月以内の DNA 抽出)

Townships in Rakhine	Number of RDTs			Number of Amplification		
	Strong	Medium	Weak	Strong	Medium	Weak
Ann	7	5	8	6	4	3
Gwa	7	6	7	5	2	3
Ramee	7	6	7	6	5	0
Total	21	17	22	17	11	6
Percent(%)				80%	65%	27%

表3 ミャンマーから得られたフィールド検体を用いた RDT からの原虫 DNA 抽出結果 (採取後 3 ヶ月～1 年 4 ヶ月の DNA 抽出)

Townships in Tanintharyi	Number of RDTs			Number of Amplification		
	Strong	Medium	Weak	Strong	Medium	Weak
Kawthaung	7	7	6	3	2	2
Myeik	6	7	7	2	2	1
Palaw	6	7	7	3	4	3
Total	19	21	20	8	8	6
Percent(%)				42%	38%	30%

図1 血液ギムザ染色後のスライドからの原虫 DNA 抽出

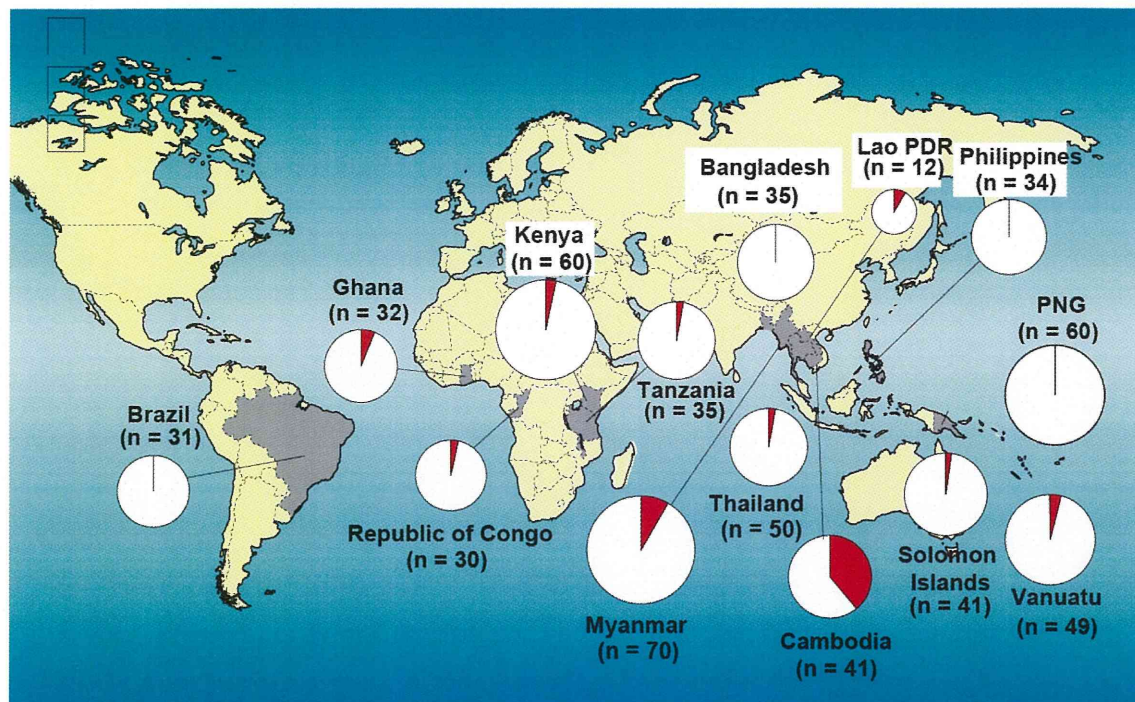


左から順に、原虫感染率 0.05%、0.1%、0.5%、1%の臨床検体、negative control、positive control (Pf) , positive control (Pv)

図2 K13 プロペラ遺伝子の変異 (581例の熱帯熱マラリア原虫)



図4 K13 プロペラ遺伝子変異の地理的分布



赤は K13 プロペラ遺伝子に変異を持っている原虫の割合を示す。

厚生労働科学研究委託費（医療機器開発推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

実用化の課題に関する情報収集と解決法への提案に関する研究

業務担当責任者 遠藤弘良 東京女子医科大学国際環境・熱帯医学講座教授

研究要旨

本研究事業で開発されるマラリア原虫定量診断装置を途上国の実地フィールドで実用化する際の課題点を抽出し、その解決法への基盤を形成することを目的とした。現行の迅速診断キット（RDT: Rapid Diagnosis Test）、ギムサ染色による顕微鏡検査、PCR の3つの診断方法とその感度、特異度、費用、診断技術者に求められる研修等を比較検討した結果、本診断装置はPCRに比較優位を持つと言えるが、実用化され、多くの途上国で活用されるための課題として、精度管理の在り方、耐久性、消耗品の供給を上げることができた。

A. 研究目的

本研究事業で開発される診断機器を実地フィールドで実用化する際の課題点を抽出し、解決法への基盤を形成することを目的とした。

B. 研究方法

ミャンマー（アジア）、パプアニューギニア（オセアニア）、ウガンダ（アフリカ）を担当責任者ならびに研究協力がそれぞれ訪問し、現地の医療機関、研究施設、フィールドにおいてマラリア診断業務に関わる担当者からの聞き取り調査、診断が行われている現地の状況調査、さらに文献検索等による情報収集ならびに分析により研究を行った。

ミャンマーでは2014年12月にヤンゴンの国立マラリア研究施設を訪問し、JICAの同国マラリア対策専

門家の中村氏から聞き取り調査ならびに資料収集を行った。

パプアニューギニアでは2014年12月に東セピック州の主要都市ウェワクの3医療施設であるボラム病院（BH）・ウィルイクリニック（WC）・タウンクリニック（TC）と、同州ダグア地区のダグアヘルスセンター（DHC）、また同地区17集落のコミュニティヘルスポランティア（CHV）を対象に調査を行なった。2013～2014年に各医療施設とCHVによって実施されたマラリア診断に関する情報収集を行った。

ウガンダでは2014年10月のマラリア流行期に東ウガンダ共和国北部にあるグル県のSt.MaryLacor病院にて調査を実施した。なおLacor病院はグル大学医学部の研修病院に位置づけられている。

C. 研究結果

1. ミャンマー

中村氏が行ったミャンマーにおけるマラリア診断の RDT と顕微鏡検査の感度、費用、診断技術者の研修、消耗品等の詳細な比較は表 1 の通りである。ミャンマーでは顕微鏡検査が gold standard となっており、JICA のプロジェクトサイトにおける RDT の感度は 98% となっている。研修の必要性は RDT は 1 日に対し、顕微鏡検査は未経験者の場合は最低 3 週間を必要としている。種々のコストを総合して計算した結果の 1 検体あたりの検査コストは RDT が 1 米ドルに対し、顕微鏡検査は 0.19 米ドルと試算されている。

JICA プロジェクト対象地域の中で患者数の多い Bago Division におけるマラリアの検査総数(RDT と顕微鏡検査の合計)は 2007 年から 2013 年までに漸減しており、また顕微鏡検査での確定診断数は減少し、一方 RDT による確定診断数が増加しているという報告が出されている。すなわち病院のような二次施設でも RDT の利用が進んでいるとのことである。

2. パプアニューギニア

調査地域におけるマラリア診断のツールは Rapid Diagnostic Test(RDT) : ACCESSBIO 社製 CareStart™ Malaria が主であり、顕微鏡診断が可能な施設は BH のみであった。医療施設の情報管理状況の理由よりデータ集計年と月数に違いはあるが、各施設における RDT 検査

数・陽性数・陽性率・陽性原虫種の内訳を表 2 に示す。CHV は DHC の管轄下にあるため、検査データは DHC と統合されている。

BH においてのみ顕微鏡診断は実施されているが、情報管理が行なわれていないために、検査結果データの入手は困難である。また、RDT、顕微鏡診断の感度・特異度についての調査は実施されていない。参考情報として、同国の他地域において行なわれた先行研究の結果を表 3 と表 4 に示す。また費用・実施者・熟練度については表 5 の通りである。

3. ウガンダ

現在、ウガンダの National Malaria Control Policy(NMCP adopted in 2012)では全医療施設およびコミュニティにおいて年齢を問わず顕微鏡検査または RDT による parasite-based diagnosis が推奨されている¹⁾。RDT は CareStart Malaria HRPII(Pf)(AccessBio 社、USA)が推奨されている。また顕微鏡検査が gold standard とされており、マラリア診断 PCR を日常的に実施できる施設は限られていると予想される。

ウガンダでは一次施設としての Community と二次の保健センター(HC II-IV)、三次の病院に分かれている。表 6 にマラリア診断に関連した一次・二次施設の特徴をまとめる。また感度・特異度について参考情報として、同国で実施された先行研究の結果を表 7、表 8 に示す。

北部グル県においては滞在中、特に週末には停電が頻発しており、電圧も不安定であったが、病院検査室には自家発電機があり、ディープフリーザー、インキュベーター等は電源が落ちないように管理されていた。なお街中には薬局が比較的多く、推奨されている抗マalaria薬(ACT の Coartem)や RDT(0.7 米ドル)を購入することができた。

D. 考察

今回調査対象とした3か国いずれも一次施設では RDT の普及率が高く、その簡易さと感度の高さにより二次施設においても RDT が採用される傾向にあると言える。RDT が普及している別の理由として、中村氏による、患者は自分の目で感染の証拠を確認でき、納得することにより正しい治療行動に移る、という考えを反映した結果とも言える。したがって本研究で開発中の診断機器が仮に RDT と競争力を持つ価格と簡易さを達成できたとしても、患者にとっての「ブラックボックスの中」の診断結果の受容という点で、RDT に代わることは難しいと言える。

一方、顕微鏡検査について見てみると、例えばウガンダでは多くの開発途上国と同様、顕微鏡検査による確定診断が Gold standard となっており、今回の調査地である北部グルの Lacor 病院でも同様であった。先行研究から、熱帯熱マalaria (Pf) に限っても RDT(+), 顕微鏡検査(-)であった 1268

例中、PCR により 836 例 (65.9%) が Pf と診断されている。今回の調査でも RDT(+), 顕微鏡検査(-)は 15/101 例あった。しかし、臨床的に問題となるのは高感染率症例を見つけられない、または低感染率と判断することであり、顕微鏡検査に熟練しているなら RDT(+), 顕微鏡検査(-)症例は極めて低感染率症例と考えられ、臨床的に大きな問題は起きにくいと考えられる。

一方、薬剤耐性の観点から考えると、PCR が施行された HRP2(+), 1510 例中、Pf(-)は 422 例(27.8%)であった。これらは Community や HCII のような RDT のみで診断している施設では投薬治療の対象となる。Lacor 病院でもマalariaを疑って Coartem(ACT)を飲んでから外来受診する患者も多く Coartem が一般にも流通していることがよく分かった。今後、これらがアルテミシニン耐性の熱帯熱マalaria原虫の出現に影響する可能性を考えると、診断を RDT のみに頼っている施設にこそ、簡便に感染率を測定できる機器があれば、よりその有意性を発揮できるのではないかと考えられる。

今回の調査を通じて把握できたマalaria診断の現状に基づき、本研究で開発中の診断機器が顕微鏡検査さらには PCR に対して十分に比較優位性を持つと考えられる。しかし途上国において実用化さらに普及が進むためには、単に価格と使い易さのみならず、以下の課題があると考えられる。

①精度管理

顕微鏡検査の場合は検査に使われるプレパラート標本が検査後も残すことができ、これを別の検査者が検査できることになる。すなわち精度管理が可能となる。精度管理はどのような検査法についても重要な要素であり、本診断装置が途上国においてどのような精度管理を行うことができるかが課題となる。

②耐久性

途上国の高温・多湿という気候状況に加え、塵埃に対する耐久性を備えることが必要となる。また頻発する停電による機器への影響も考慮する必要がある。途上国では故障が多いと、故障したのが担当者のせいと受け止められやすく、その責任を避けるために使用しなくなるという傾向がある。現実問題として見逃すことができない。

③消耗品

機器そのものの耐久性が高いとしても、消耗品の供給が途絶えれば使用されなくなってしまう。流通のインフラ整備が遅れている途上国では消耗品の供給体制の確保も重要な課題となる。

E. 結論

現行の迅速診断キット（RDT: Rapid Diagnosis Test）、ギムサ染色による顕微鏡検査、PCR の3つの診断方法とその感度、特異度、費用、診断技術者に求められる熟練度等を比較検討した結果、本診断装置は顕微鏡検査、PCR に比較優位を持つと言えるが、実用化され、多くの途上国で活用されるための課題として、精度管理の在り方、耐久性、消耗品の供給を上げることができた。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告（総括）に纏めて記入

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 RDT と顕微鏡検査の比較 (中村)

項目	臨床診断 (ミャンマー全 域)	確定診断(プロジェクトサイトにおいて 導入)		備考
		RDT(迅速診断)	顕微鏡検査	
感染原虫の同定	不能	熱帯熱マラリアのみ (現行の RDT)	可能	
感度	20~40%	98%	Gold Standard	
治療	Presumptive Treatment	Specific Treatment	Specific Treatment	
治療判定	不能	抗原検出系のため不 能	可能	
研修の必要性	臨床診断(悪寒、 発熱、頭痛、マラ リア流行地との 関わり)	1日	最低3週間(未経験 の場合)	
消耗品の温度管理		要	不要	
精度管理		要+	要++++	
消耗品のローカルマーケ ットでの Availability		困難	あり	
消耗品の継続したサブラ イ (CMSD)		ドナー依存	ルーチン配布可能	CMSD サプライは基本的に病 院のみ
研修費用	0	\$5 (日当)	> \$210 (3週間)	
必要な機材	不要	不要	顕微鏡	
機材コスト	不要	不要	\$1,000/unit	
必要な消耗品	不要	RDT (薄層クロマト グラフによる抗原検 出)	スライドグラス、ラ ンセット、ギムザ染 色液、アルコール綿	スライドグラス: \$0.03、 ギムザ液: \$0.02、 ランセット: \$0.03 アルコール綿: \$0.01
消耗品コスト	0	\$ 0.5 (WHO) ~ \$1.0/test (JICA)	\$0.09/test	
コスト (10年間)	0	\$10,000	\$1,900	1000 症例/年 X10 年年 顕微鏡の寿命: 10 年と仮定
検査コスト	0	\$1	\$0.19	約 1/5 顕微鏡価格を含む
医療施設への適応	全域(スクリーニ ング)	SHC, Communities	Hospital, RHC	
疫学指標としての精度	低	高(熱帯熱のみ)	高(全種)	

表2 医療施設別の検査結果

医療施設	レベル	集計年・月数	検査法	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Mix</i>	総陽性数	総検査数
BH	3	2014年	RDT	730	170	1212	2112	6956
		8ヶ月分		10.50%	2.4%	17.4%	30.4%	100%
WC	2	2013年	RDT	198	141	1214	1553	3292
		11ヶ月分		6.0%	4.3%	36.9%	47.2%	100%
TC	2	2013年	RDT	663	126	703	1492	2896
		8ヶ月分		22.9%	4.3%	24.3%	51.5%	100%
DHC	2+1	2013年	RDT	198	91	606	895	1599
		5ヶ月分		12.4%	5.7%	37.9%	56.0%	100%

表3 異なる RDT の感度と特異度 (Siba V.ら¹⁾)

診断法	感度	特異度
Tubex	51.1%	88.3%
TyphiDot	70.0%	80.1%
TR-02	89.4%	85.0%

実施期間:2009年3月～2010年9月、実施地:東ハイランド州 ゴロカ郡
 対象者:Goroka General Hospital と Lopi Urban Clinic の外来診察の患者(1歳～60歳)
 対象数:530人、診断法:RDT3種 ①TubexTF(スウェーデン製)、②TyphiDot(マレーシア製)、③TR-02(マレーシア製)

表4 RDT と顕微鏡検査の感度と特異度の比較 (Manning L.ら²⁾)

マラリア原虫種	診断法	感度	特異度
<i>P.Falciparum</i>	顕微鏡	85.9%	98.7%
	RDT	98.0%	89.2%
<i>P.Vivax</i>	顕微鏡	80.9%	99.0%
	RDT	48.9%	99.0%
<i>Mix</i>	顕微鏡	77.5%	99.8%
	RDT	69.6%	63.4%

実施期間:2006年10月～2009年12月、実施地:マダン州、対象者:Modilon Hospital の患者(0.5歳～10歳)対象数:797人
 診断法:顕微鏡、RDT MR2(オーストラリア製)

表5 各レベルにおける診断の費用・実施者・熟練度の比較

	費用(K1.00 = 約 47円)	実施者	熟練度
一次 Community	費用に関する制度はなし 一部の CHV によっては診断治療費として K2.00 の徴収がされているが、主に CHV による活動は無料で行なわれている。	CHV	中
二次 Health Center Clinic	無料 (5 歳未満) K3.00 (5 歳以上 15 歳未満) K5.00 (15 歳以上)	Health Center: Nursing Officer Community Health Worker Clinic: Health Extension Officer Nursing Officer Community Health Worker	高 高
三次 Hospital	K10.00	顕微鏡診断 Laboratory Technician RDT Doctor Health Extension Officer Nursing Officer Community Health Worker	高 高

(注) 同国における医療専門職の職位は Doctor・Health Extension Officer・Nursing Officer・Community Health Worker の順に高い。CHV は国家資格ではない。

参考文献

1. Siba V, Horwood PF, Vanuga K, et al. (2012) Evaluation of Serological Diagnostic Tests for Typhoid Fever in Papua New Guinea Using a Composite Reference Standard. CVI 19(11):p.1833-1837.
2. Manning L, Laman M, Rosanas-Urgell A, Turlach B, Aipit S, et al. (2012) Rapid Antigen Detection Tests for Malaria Diagnosis in Severely III Papua New Guinean Children: A Comparative Study Using Bayesian Latent Class Models. PloS ONE 7(11):e48701. Doi:10.1371/journal.pone.0048701

表6 各レベルにおける検査方法の比較

	スタッフ	RDT	Microscopy
Community	Community volunteer	○	×
Health center II	Nurse	○	×
Health center III	Clinical officer	○ (顕微鏡ない場合)	○
Health center IV	Doctor	○ (顕微鏡ない場合)	○

表7 異なる診断基準によるマラリア診断精度の比較 (Hopkins H.ら²⁾)

診断法	診断基準 (Gold standard)					
	感度 (%)			特異度 (%)		
	Microscopy	PCR (Pf のみ)	PCR (全種)	Microscopy	PCR (Pf のみ)	PCR (全種)
HRP2	97.2	98.8	97.8	71.0	87.8	87.9
pLDH	88.2	77.1	76.9	91.7	98.4	99.1
Microscopy	-	76.0	76.1	-	98.4	99.4

実施期間：2006年5月～2007年2月

実施地：ウガンダ国全土7ヶ所の定点医療施設

対象者：各施設を期間内に受診した外来患者

対象数：7000人（各施設1000人ずつ）

診断法：以下 RDT2種、microscope, PCR

- ① Paracheck (HRP2法, Orchid Biomedical Systems社, India)
- ② Parabank (pLDH法, Zephyr Biomedicals社, India)