

当院で初めて経験した熱帯熱マラリアの1症例

河上 菜美¹⁾ 野中 有利¹⁾ 黒木 泰則¹⁾ 山口 公大²⁾

1) 高山赤十字病院 検査部

2) 高山赤十字病院 内科

抄 録：マラリアは100カ国余りで流行しており、亜熱帯・熱帯地域を中心に感染者が多く、年間2億人以上の罹患者と200万人の死亡者とされている。全世界では流行地への旅行者が帰国してから発症する例が年間3万人程度とされており、日本国内での報告数は、1990年代は増加傾向を示し、2000年には年間154例に達したが、最近は50～70例で推移している。マラリアの中でも特に熱帯熱マラリアは重症化しやすいとされており、早期の適切な対応及び治療が必要である。今回、我々は熱帯熱マラリアの症例を当院にて初めて経験したので報告する。

索引用語：熱帯熱マラリア、ギムザ染色、PCR法

I はじめに

マラリアは100カ国余りで流行しており、亜熱帯・熱帯地域を中心に感染者が多く、年間2億人以上の罹患者と200万人の死亡者とされている。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に問題となるのは、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、2004年以降、マカク属のサルで感染が問題となっていた *P. knowlsi* のヒトでの集団感染が、マレーシア、ボルネオ島で明らかになった。以後、媒介蚊である *Anopheles leucosphyrus* が生息するインドネシア諸国、フィリピンなどからの感染例の報告が続き、2012年にはマレーシアから帰国した日本人での発症例も報告されている¹⁾。全世界では流行地への旅行者が帰国してから発症する例が年間3万人程度とされており、日本国内での報告数は、1990年代は増加傾向を示し、2000年には年間154例に達したが、最近は50～70例で推移している。

今回、我々はマラリアの中でも重症化しやすいとされている熱帯熱マラリアの症例を経験したので報告する。

II 症例

20歳代 男性

主訴：発熱

現病歴：

2015年4月15日～7月10日および7月24日～8月12日にタンザニアへ渡航。8月13日に東京に到着後、8月15日に地元へ帰省した。8月20日に発熱(39.0℃)、悪寒を認めたため当院救急外来を受診した。

身体所見：

体温39.1℃、血圧103/75mmHg、脈117bpm、SAT 96%、咽頭発赤軽度、扁桃腫脹(-)、頸部リンパ節触知せず、心雑音なし、胸部ラ音なし、腹部平坦、圧痛(-)、脾腫(-)、下腿浮腫(-)、明らかな刺口なし。

来院時検査所見：

WBC 6200 / μ l, RBC 543×10^4 / μ l,

Hb16.5 g/dl, PLT 25.2×10^4 / μ l

T-Bil 0.6 mg/dl, AST 17 IU/l, ALT 10 IU/l,

LDH 147 IU/l, BUN 11.6 mg/dl

CRE 0.86 mg/dl, CRP 0.27 mg/dl,

PCT (1+)0.5～1.9でCRPとPCTがわずかに異常を認めた。(表1参照)

表1 来院時検査所見

血算		生化学		凝固	
WBC	6200/ μ l	T-Bil	0.6 mg/dl	PT 秒	12.3
BASO	0.3%	TP	7.6 g/dl	PT%	96.0
EOSINO	0.2%	A/G	2.0	PT INR	1.06
NEUT	87.0%	Alb	5.1 g/dl	APTT 秒	31.7
MONO	6.5%	ALP	182 IU/l	免疫	
LYMPH	6.0%	AST	17 IU/l		
RBC	$543 \times 10^4/\mu$ l	ALT	10 IU/l	RPR	(-)
HGB	16.5g/dl	LDH	147 IU/l	RPR 量	0.1
HCT	46.8%	γ -GTP	17 IU/l	TPAb 定性	(-)
MCV	86.2 fl	Na	138mEq/l	TPAb 量	0.0
MCH	30.4pg	K	4.7 mEq/l	PCT	(1+)0.5~1.9
MCHC	35.3%	Cl	101 mEq/l		
PLT	$25.2 \times 10^4/\mu$ l	BUN	11.6 mg/dl		
		CRE	0.86 mg/dl		
		e-GFR	96.8		
		CRP	0.27 mg/dl		
		血糖	109 mg/dl		

Ⅲ 検査方法及び結果

1.マラリアの顕微鏡による形態診断

1) 検査材料の採取及び塗抹標本の作製

抗凝固剤としてEDTA-2Kを用いた血液を検体とした。末梢血液塗抹標本作製し、ギムザ染色後、患者赤血球形態を観察した。なお、ギムザ染色については一般的な血液像の染色（pH6.6の染色液）のほかに、pH7.4の染色液を用いた染色方法をおこなった。

薄層塗抹標本作製手順は、通常の血球の形態検査で行うものと同様に行い、以下のような手順でpH7.4の染色液を用いた染色方法をおこなった²⁾。

末梢血液塗抹標本を速やかに乾燥させ、メタノールで2分間固定した。水道水1mLに対してギムザ染色原液を1~1.5滴滴下し、pH試験紙にてpH7.4付近であるか確認し染色液とした。

pH7.4付近にならなかった場合は水道水または

ギムザ染色原液で調製した。メタノール固定薄層塗抹標本を水平に保ち、染色液をかけて約30分間染色し、リン酸緩衝液で洗浄後、風乾し観察した。

2) 末梢血液塗抹標本の観察結果

pH6.6の通常の染色液を用いた染色方法とpH7.4の染色液を用いた染色方法で、染色結果を比較すると、通常のpH6.6のギムザ染色（図1）よりpH7.4の染色液を用いたギムザ染色（図2）の方が、赤血球が淡い青紫色に染まり、輪状体はpH6.6のときより鮮明に染まった。

末梢血液塗抹標本を観察した結果、複数の輪状体が1つの赤血球に感染していることが確認でき、寄生率は約3%だった。生殖母体、アメーバ体(栄養体)は認めず、感染赤血球の膨大は認められなかった。以上より、熱帯熱マラリアが最も疑われた。

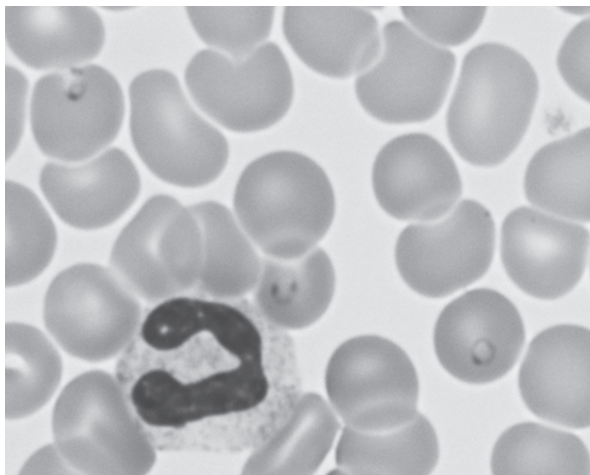


図 1. pH6.6 の染色液を用いたギムザ染色結果

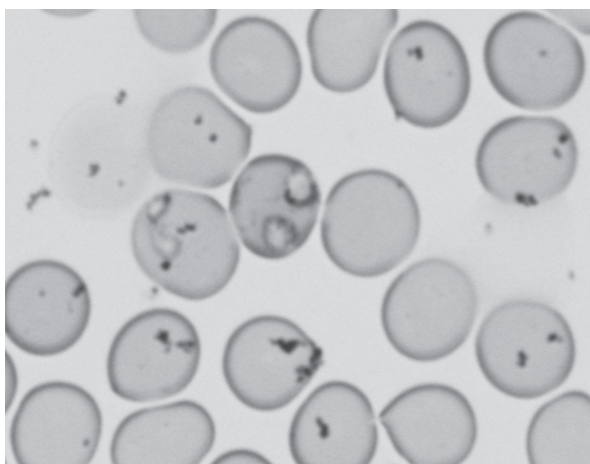


図 2. pH7.4 の染色液を用いたギムザ染色結果

2. 国立感染症研究所におけるギムザ染色標本の観察及びマラリアの遺伝子検査

末梢血液塗抹標本より赤血球中にマラリア原虫が観察された。マラリアは4類感染症に分類されていることから、保健所に連絡し、保健所から国立感染症研究所へギムザ染色標本1枚と患者血液をしみ込ませた濾紙を検体として提出した。その検体を用いて国立感染症研究所にてギムザ染色標本の顕微鏡観察およびPCR法が実施された。

1) ギムザ染色標本の観察結果

国立感染症研究所にてギムザ染色標本の観察をした結果、以下の根拠により熱帯熱マラリアと考えられると報告があった。

- ・感染赤血球のサイズが膨大していない
- ・寄生率が高い
- ・観察される原虫のほとんどが輪状体である

・複数の輪状体が1つの赤血球に感染している場合が多く観察される
当院で実施した標本の観察結果と同じ結果であった。

2) 検体からのDNA抽出

DNA抽出用キットQIA(キア)ampDNA Mini Kit(QIAGENキアゲン51304,51306)の手順書に従い、乾燥濾紙検体からDNA抽出をおこなった。

なお、手順書内でのプロテアーゼ処理をQiagen Protease Kを用いて56℃・60分間の処理に変更した。また、最後におこなうAEバッファーでの溶出量は0.05mlとし、これをPCR用テンプレートDNA試料とした。

3) PCRによるDNAの増幅

検体中に含まれるDNAは極微量であると想定されたため、感度を上げるためにNested (ネステッド)-PCRを適用した。

(1) 1st-PCR

プライマーは病原体検出マニュアルに記載されているPlasmodium-P1:5' -ACGATCAGATAC

CGTCGTAAATCTTならびにPlasmodium-P2:5' -GAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATを用いた。プライマーはゲル濾過精製したものをを用いた。DNAポリメラーゼとしてTAKARAのEx Taq HotStart を使い、添付された試薬類を用いてテンプレートDNA量を除いたPCR反応液を調製し、19 μ lを0.2mlPCRチューブに分注した。テンプレートDNAは1 μ lを加えた。なお、陽性対照試料にはP.falciparum(熱帯熱)、P.vivax(三日熱)、P.malariae(四日熱)、P.ovale(卵形)の18S rRNA遺伝子を含むプラスミド各1ngを20 μ lのPCR反応に用いた。

PCRの温度反応条件は、98℃・10秒の熱変性後、98℃・10秒間、60℃・30秒間、72℃・30秒間を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した。最後に72℃・10分間反応させ、4℃で保冷した。

(2) Nested(2nd)-PCR

特異的なリバープライマーは以下のものを用いた。

- ・P.falciparum (熱帯熱)

falciparum-F2:5' -CAA TCC AAA AGT CAC
CTC GAA AGA TG

・ P.vivax(三日熱)

vivax-V1:5' -CAA TCT AAG AAT AAA
CTC CGA AGA GAA A

・ P.ovale(卵形)

ovale-O2:5' -ACT GAA GGA AGC AAT CTA
AGA AAT TT

・ P.malariae(四日熱)

malariae-M1:5' -GGA AGC TAT CTA AAA
GAA ACA CTC ATA T

フォワードプライマーは1st-PCRに用いた Plasmodium-P1を用いた。本プライマーは、それぞれのPlasmodiumの4種に特異的な18S rRNA領域を増幅し、nested-PCRによってP.falciparum特異的(101bp)、P.vivax特異的(104bp)、P.ovale特異的(115bp)、P.malariae特異的(115bp)なDNA増幅をおこなうプライマーである。

テンプレートDNAは1stPCR産物を水で20倍に希釈したものを1 μ l 2nd-PCR反応に使用した。

PCRの反応条件は1st PCRと同一であり、反応サイクルのみ20サイクルでおこなった。

サーマルサイクラーの機種はApplied Biosystems社のABI Veritiを用いた。

4) 結果

Nested(2nd)-PCR産物5 μ lを2%アガロースゲル電気泳動で展開し、以下のような結果が得られた。(図3)

熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、卵形マラリア、四日熱マラリアそれぞれの陽性コントロールのバンドとマラリア4種それぞれに特異的な18S rRNA領域を増幅し、Nested-PCRによってそれぞれに特異的なDNA増幅をおこなって得られた検体を比較すると、熱帯熱マラリアに特異的な領域の増幅を行なうプライマーを用いた検体のみ、陽性コントロールのバンドと同位置にバンドを確認することができた。

Nested-PCRの結果では、熱帯熱マラリアの陽性コントロールと同一の長さのDNA産物を検出した。

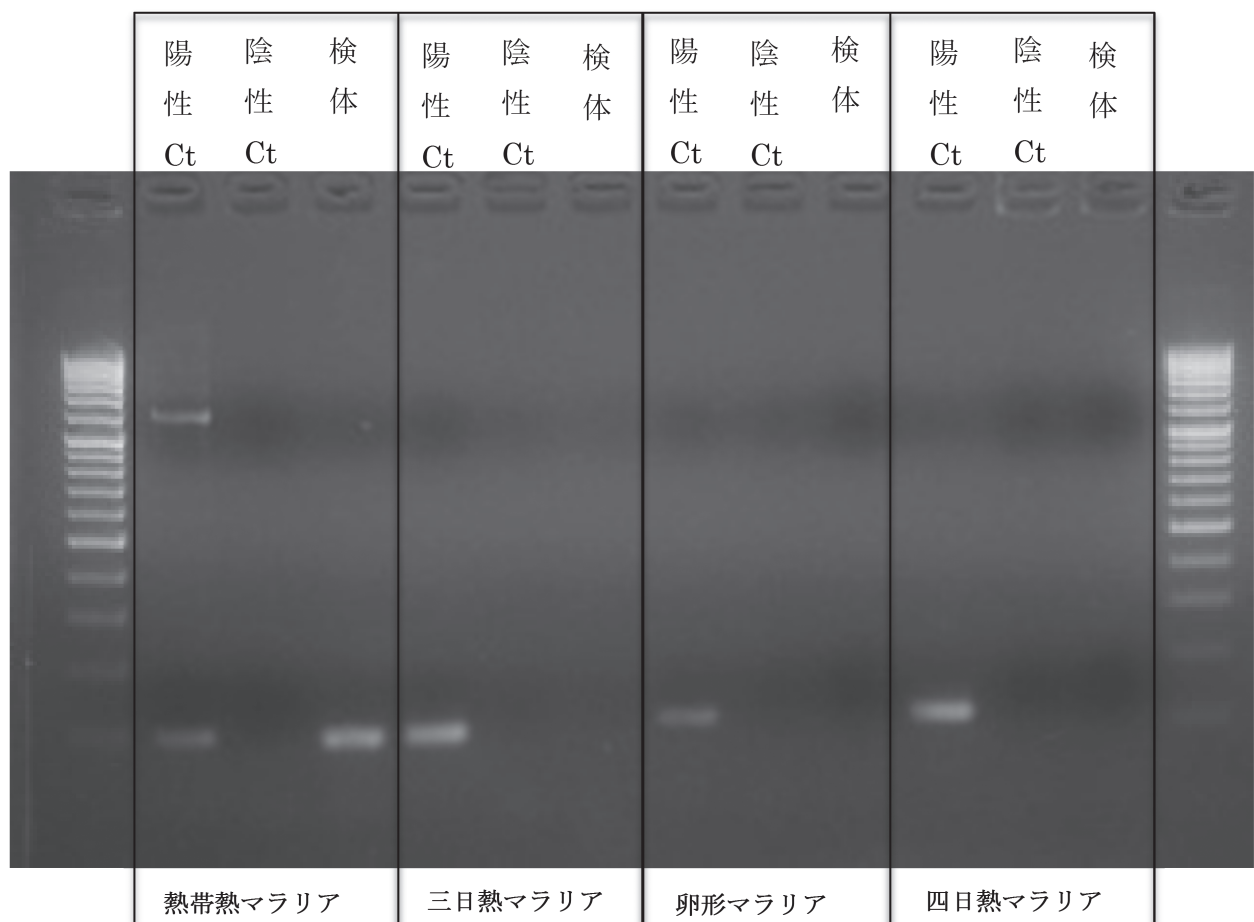


図3. 電気泳動結果

Ⅳ 考察

マラリアの発症症状は、発熱、疲労感、頭痛、腹部不快感、嘔気、嘔吐、筋肉痛などといった症状が現れるが潜伏期間は熱帯熱マラリアでは1～3週間、その他のマラリアでは10日～4週である。発熱は必発で通常38℃以上を示すため、海外旅行後の高熱ではマラリアも疑う必要があり、渡航先の聞き取りも重要である。日本を含むマラリアの非流行地域では免疫を持たない人が感染すると急速に病態が進行し重症化しやすく、早急に診断を行い治療が重要になる。特に熱帯熱マラリアは発症から5日以上経過すると40%重症化する可能性がある³⁾。マラリアの診断には、顕微鏡検査が基本であり、末梢血塗抹標本からの赤血球内の原虫等の検出で原虫種の鑑別および感染量の推定まで行う事ができる。その一方でPCR法は高感度で検出できるが、本院では迅速検査キットがなく国立感染症研究所にPCR法の依頼をした。

今回我々は、末梢血塗抹標本染色でpH6.6ギムザ染色液とpH7.4ギムザ染色液を用いて染色を実施し顕微鏡検査を行った。その結果pH6.6でも輪状体は確認できたが、pH7.4での染色法のほうがより鮮明に観察ができた。末梢血塗抹標本における輪状体の観察及びPCR法にて熱帯熱マラリアであると確定診断に至った。

Ⅴ 結語

マラリアは適切な対応を行わないと短期間で重症化し死に至る疾患で、早期の診断と治療が重要となる。日本においても海外からの旅行者の増加、日本人の旅行の多様化及び海外出張・貢献の増加により、今後患者数は増加するのではないかと懸念される。各マラリアの症例に対して適切な対応及び治療が必要なため、検査技師は今後専門的な知識が要求される。検査者の経験と技量によるところが大きいので、マラリアが強く疑われる場合は他の検査法も併用することが望ましいと考えられる。

Ⅵ 参考文献

- 1) 国立感染症研究所、マラリアの検査法マニュアル 2013
<http://www0.nih.go.jp/niid/para/atlas/japanese/manual/malaria.pdf> [accessed 2016年3月7日]
- 2) 金井正光監修：臨床検査法提要、第33版、金原出版株式会社、東京、2010
- 3) 海老沢功、小原博、他：熱帯熱マラリア治療における開始遅延の意義 日本熱帯医学会雑誌 19：49-56、1991