

病原体検出マニュアル

コクシジオイデス症
(Coccidioidomycosis)

平成 25 年 8 月

version 1. 1

目次

1. コクシジオイデス症 (Coccidioidomycosis)
2. 検査に関する注意事項
3. 検査方法
 - 1) 分離培養法
 - 2) 同定法
 - ア) 病理組織学的診断法
 - イ) 抗原検出法
 - ウ) 抗体検出法
 - エ) 遺伝子診断法
4. 感染症法届出基準
5. 参考文献
6. 連絡先
7. 関連図表

1. コクシジオイデス症 (Coccidioidomycosis)

コクシジオイデス症は、コクシジオイデス属による感染症であり、その原因真菌であるコクシジオイデス属として *Coccidioides immitis*、*Coccidioides posadasii* の 2 つの菌種が現在までに知られている¹⁾。*C. posadasii* はかつては non-California (non-CA) *C. immitis* と呼ばれていたが、2000 年以降に現在の菌種の名前が付与された²⁾。この両者は遺伝学的に異なる菌種であることが確認されているが、いずれにしろヒトに対する病原性に大きな差はないようで、これらコクシジオイデス属は地球上でもっとも病原性の強い真菌である。このため、コクシジオイデス属の不用意な培養は、実験室内感染の原因となるため、本症の検査にあたっては細心の注意を払う必要がある。

コクシジオイデス症は、日本においては輸入真菌症 (imported mycoses)、もしくは地域流行型真菌症 (endemic mycoses) の一つとされ³⁾、最大の流行地は米国カリフォルニア州、アリゾナ州である¹⁾。隣接するネバダ州、ユタ州、ニューメキシコ州、テキサス州やメキシコも流行地として確認されており、そのほかベネズエラ、アルゼンチンなど中南米でも患者発生が散発的に確認されているが、現在のところ、コクシジオイデス属の感染は上記の地域にほぼ限定される⁴⁾。わが国で確認されたコクシジオイデス症は、平成 25 年現在で総数 70 例程度であるが⁵⁾、ほとんどの例が米国やメキシコなどへの流行地への渡航歴を有しており⁶⁾、現在までコクシジオイデス属のわが国での生息、ならびに国内感染事例は確認されていない*。従って、診断にあたってはこれらの地域への渡航歴がきわめて有用な手掛かりとなる。また、コクシジオイデス症は、真菌感染症の中で唯一感染症法に規定されており、感染症は 4 類感染症に、また *C. immitis* が三種病原体に指定されている。しかし病原体としては、実際には *C. posadasii* も *C. immitis* 同様の扱いを行うべきであろう。

コクシジオイデス属は二形性真菌であり、おもに上記流行地域の乾燥した土壤に生息する。土壤などの環境中や人工培地上では分節型分生子 (arthroconidia) を形成し感染性が強いが、ヒトの体内では球状体 (spherule) に包まれた内生孢子 (endospore) として存在する^{1) 4)}。コクシジオイデス属はヒトへの感染は土壤から空气中に舞い上げられた分生子 (孢子) を吸入することで成立する⁴⁾。通常は、呼吸器感染症として発症するが、感染者の約 60% は不顕性感染で推移し¹⁾、残りが発病するとされている。コクシジオイデス症の病型として、急性肺コクシジオイデス症、慢性肺コクシジオイデス症、播種性コクシジオイデス症があり³⁾、急性肺コクシジオイデス症では発熱、咳嗽、胸痛、頭痛、関節痛などインフルエンザ様症状が認められる。慢性肺コクシジオイデス症は感染者の約 5% が移行するとされ、さらに稀ではあるが一部は播種性コクシジオイデス症に進展する。コクシジオイデス症は、他の一般的な真菌感染症と異なり、基礎疾患を有さないヒトにも発病するが、免疫不全者では重篤化する。本症の危険因子として、AIDS、臓器移植、副腎皮質ホルモン、TNF 阻害薬、糖尿病、心疾患、妊婦 (妊娠後期) があげられ¹⁾、また人種間でも黒人やフィリピン人は罹患しやすいといわれ

ている。

コクシジオイデス症の治療における第一選択薬はフルコナゾール（FLCZ）もしくはイトラコナゾール（ITCZ）が使用されているが、重症例ではアムフォテリシン B（AMPH-B）も使用される³⁾。また軽症例では自然治癒も認められるが、わが国では診断がつけば全例治療を行った方が良いとされる³⁾。

*1 例のみ国内発生例（実験室内感染）が確認されている。

2. 検査に関する注意事項

C. immitis、*C. posadasii*は、いずれも BSL3 に分類されており、感染力がきわめて強く取扱いには十分な注意が必要である。これらの病原真菌は分生子を空気中に大量に飛散させ、これを吸入することによりヒトは真菌に暴露され、感染、発症に至る。また、ごく微量の分生子への暴露によって感染が成立することが示唆されており⁷⁾、検査室で臨床検査技師や研究者が感染する事故が起きており、死亡例も報告されている⁸⁾。本邦におけるコクシジオイデス感染症を正確に診断できる機関は限られており、コクシジオイデス症の可能性が疑われた場合は、国立感染症研究所などの専門機関（下記）に対応について相談することが望ましい。

一方、コクシジオイデス症においては一般の感染症とは異なり、患者と直接接する医師や看護師あるいは家族などが患者から直接感染する可能性は極めて少ない。ただし、臨床検体を長期間放置すると菌が発育し分生子を形成して飛散させる可能性がある。また、まれに喀痰などに菌糸形で排菌される場合もあるので、菌が含まれている可能性のある臨床検体（喀痰、ドレナージの廃液など）は病室内、病棟内などに放置せず、迅速に滅菌処理をする必要がある。

●コクシジオイデス症の診断等に関する連絡先

1) 国立感染症研究所 真菌部

東京都新宿区戸山 1-23-1 電話 03-5285-1111（代表）

2) 千葉大学真菌医学研究センター 臨床感染症分野

千葉市中央区玄鼻 1-8-1 電話 043-222-7171（代表）

1) 臨床検体および臨床分離株の取り扱い

人工培地上に発育したコクシジオイデス属は、分生子が飛散しやすく、容易に実験室内感染を引き起こすことから、一般の臨床検査室での不用意な培養は厳に慎むべきである。臨床症状や海外渡航歴などからコクシジオイデス症が疑われる症例で、臨床検体からコクシジオイデス属の分離培養の必要性がある場合には、必ず BSL3 の検査室を備えた施設でのみ行う。また、国立感染症研究所や千葉大学真菌医学研究センターなどの専門施設に必ず培養後の対応などについて相談すべきである。

コクシジオイデス属は、生体内では分節型分生子を形成しないため、肺生検、喀痰、気管支洗浄液などの臨床検体は BSL2 実験室内の安全キャビネットでも取り扱い可能である。しかし、人工培地上で発育したコクシジオイデス属は大量の分節型分生子を形成し、わずかな衝撃や気流の変化によって分節型分生子が飛散するおそれがあるため、臨床検体からの分離培養は密閉可能な斜面培地を用いて行い、分離培養は BSL3 検査室で行う。以降の実験操作において開栓せずにシリンジで消毒液などを注入できるように、シリコン栓またはフィルターキャップを用いる。コクシジオイデス属は人工培地上で発育すると、白色の糸状菌様のコロニーを形成する（図 1）。

- 顕微鏡観察 コロニーが完全に浸漬するようにホルマリン液を容器内にゆっくりと注入する。ホルマリンの注入は開栓せずにシリンジにて行う。1週間室温で放置した後、かきとり標本を作製する(図2)。以上の操作は、BSL3安全キャビネット内にて行う。
- 遺伝子抽出 顕微鏡観察と同様の手順で、70%エタノールをゆっくりと注入し、1週間室温で静置する。エタノールで不活化された菌を寒天培地ごとかきとり、遺伝子抽出に用いる。

上記の検査手順は、検査従事者が菌に暴露される危険性が高いため、現実的には国立感染症研究所などの専門機関に同定を依頼するのが望ましい。国立感染症研究所に分離株の同定を依頼する場合は、あらかじめ担当者に連絡をとり、輸送法や事故対応について打ち合わせを確実に行った後、決められた手順に従って分離株を送付する。

一般検査室において、寒天平板培地上にコクシジオイデスの可能性がある真菌が発育してしまった場合は、衝撃で分生子を飛散させないようにシャーレ蓋側面にビニールテープを巻いて密封し、すみやかに滅菌処理する。

2) 検体の輸送

コクシジオイデス症が疑われる臨床検体または臨床分離株は、WHOの「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」に基づき、国連規格の輸送容器を用いて適切な方法で梱包する。冷蔵保存は生菌分離の確率を著しく低下させるため、検体は常温で輸送することが望ましい。

分離された菌株が *C. immitis* (*C. posadasii* も同様に取り扱いの方が現実的である) であると同定された場合、感染症法で規定されている特定病原体第三種の輸送規定に従わなくてはならない。都道府県公安委員会に届け出を行い、運搬証明書の交付を受けたうえで輸送を行う(参考: 感染症法に基づく特定病原体等の管理規制について <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou17/03.html>)。

3. 検査方法

1) 分離培養法

喀痰、気管支肺胞洗浄液(BAL)、肺生検標本、経皮的肺穿刺、皮膚病変などの検体を BHI 寒天培地に塗布し、30° C で培養する。寒天培地は通常のシャーレではなく、フィルターキャップ付きの斜面培地もしくはフラスコ容器に作製する。

2) 同定法

ア 病理組織学的診断法

喀痰などのスミアでは球状体が確認される場合があるが、変性が強く、確定診断に至るケースは少ない（パパニコロ染色、PAS 染色、Grocott 染色など）。

組織内でコクシジオイデスは、内生孢子を内蔵した球状体、および球状体から放出された内生孢子、各種発達段階にある球状体として観察される。PAS 染色および GMS 染色を推奨する。

イ 抗原検出法

米国 Immuno Mycologies 社などから抗原検出キットが市販されているが、一般化されていない。

ウ 抗体検出法

米国 Meridian Bioscience 社などから抗体検出キットが市販されているが、一般化されていない。

エ 遺伝子診断法

病原真菌の rRNA 遺伝子は、18S、5.8S、26S、5S の 4 つのサブユニットから構成され、これらのサブユニットの長さは菌種によらず、ほぼ同じである。18S と 26S の間にある internal transcribed spacer (ITS) および 26S と 18S の間にある intergenic spacer (IGS) 領域は、菌種により長さが著しく異なることが知られている。また、26S サブユニットの部分塩基配列 (Domain1/Domain2: D1/D2) は、同種間で 99%以上の類似度を示すことが分かっている。

杉田らの検討によると、同一種内の ITS 領域の類似度は 99%以上であり、変種以上の関係では 99%未満であることが示されている⁹⁾。これらの理由から、現時点では 26S および ITS 領域の塩基配列類似度に基づく同定基準は、おおむね妥当であると考えられている。

また、Umeyama らにより、コクシジオイデス特異的プライマーとして、*C. immitis* と *C. posadasii* を区別可能なものが報告されている¹⁰⁾。

実際の手順としては、まずエタノールで不活性化された菌体を寒天培地ごとかきとり、ガラスビーズで菌体を破碎したのち、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Inc.)を用いて DNA を抽出する。

抽出した DNA を鋳型として、rRNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS)領域、または rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit)を増幅するプライマーおよびコクシジオイデス特異的プライマー (表 1) にて PCR を行い、増幅産物が得られた場合には、この産物について塩基配列解析を行ったのち、国際的に公表されているデータベース (BLAST, Mycobank など) を参照して菌種を同定する。

表 1 同定に用いるプライマー配列

D1/D2 領域を増幅するプライマー

NL1 5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA

NL4 5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG

ITS 領域を増幅するプライマー

ITS1 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC

コクシジオイデス特異的プライマー

Coi9-1F 5'- TACGGTGTAATCCCGATAACA

Coi9-1R 5'- GGTCTGAATGATCTGACGCA

4. コクシジオイデス症届出基準

(1) 定義

真菌の *Coccidioides immitis* の感染症である。

(2) 臨床的特徴

強風や土木工事などにより土壌中の *C. immitis* の分節型分生子が土埃と共に空中に舞い上がり、これを吸入することにより肺感染が起り、そのうち約 0.5% の患者が全身感染へと進む。この病原体を取り扱う実験者、検査従事者などの 2 次感染の危険性が高い。本邦では、慢性肺コクシジオイデス症がみられることが多く、CT などの画像診断において、結節や空洞病変が確認される。

(3) 届出基準

ア 患者（確定例）

医師は、(2) の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見からコクシジオイデス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、コクシジオイデス症患者と診断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

イ 無症状病原体保有者

医師は、診察した者が(2) の臨床的特徴を呈していないが、次の表の左欄に掲げる検査方法により、コクシジオイデス症の無症状病原体保有者と診断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

ウ 感染症死亡者の死体

医師は、(2) の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、コクシジオイデス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、コクシジオイデス症により死亡したと判断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を直ちに行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

エ 感染症死亡疑い者の死体

医師は、(2) の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、コクシジオイデス症により死亡したと疑われる場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出

を直ちに行わなければならない。

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	喀痰、気管支洗浄液、肺又は皮膚の病理組織
鏡検による病原体の検出	
免疫拡散法による抗体の検出	血清、髄液

5. 参考文献

- 1) Brown J, et al. Coccidiomycosis: epidemiology. *Clinical epidemiology* 5: 185-197, 2013.
- 2) Fisher MC, et al. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94: 73-84, 2002.
- 3) 亀井克彦ほか. コクシジオイデス症. 輸入真菌症の診断・治療指針、協和企画（東京）、p48-61、2011.
- 4) Hector RF, et al. Coccidiomycosis-a fungal disease of the Americas. *Pros Med* 2: 0015-0018, 2005.
- 5) 千葉大学真菌医学研究センター. 輸入真菌症患者発生最新状況. URL: <http://www.pf.chiba-u.ac.jp/>
- 6) 国立感染症研究所. 真菌症 2012 年現在. 病原微生物検出情報 34: 1-2, 2013.
- 7) Cox RA, et al. Coccidiomycosis: host response and vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 17: 804-839, 2004.
- 8) Singh K. Laboratory-acquired infections. *Clin Infect Dis.* 2009 Jul 1;49(1):142-7.
- 9) 杉田隆ほか. DNA 塩基配列解析による病原真菌の分離・同定. *真菌誌* 45: 55-58, 2004.
- 10) Umeyama T, et al. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1859-1862, 2006.

6. 執筆者

国立感染症研究所 真菌部

梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継

堺市衛生研究所

田中智之

神戸市環境保健研究所

杉浦義紹

7. 連絡先

宮崎義継

国立感染症研究所 真菌部

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話: 03-5285-1111 (内線 2301)

ファックス: 03-5285-1272

電子メール: ym46@niid.go.jp

8. 関連図表



図1 寒天培地上（左：potato dextrose agar、右：Sabouraud agar）に発育した *C. posadasii*

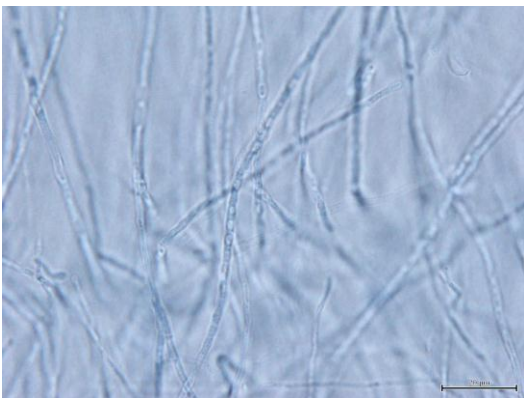


図2 *C. posadasii* の菌糸と分節型分生子（×1,000）