

病原体検出マニュアル

播種性クリプトコックス症
(Disseminated cryptococcosis)

2018年12月

Version 1.0

目次

1. 播種性クリプトコックス症 (Disseminated cryptococcosis)
2. 検査方法
 - 1) 分離培養法
 - 2) 同定法
 - ア) 墨汁法による直接鏡検
 - イ) 抗原検出法
 - ウ) 遺伝子診断法
3. 感染症法届出基準
4. 参考文献
5. 執筆者
6. 連絡先

1. 播種性クリプトコックス症 (Disseminated cryptococcosis)

播種性クリプトコックス症は、クリプトコックス属真菌による感染症のうち、本菌が脳脊髄液や血液などの無菌的臨床検体から検出された感染症、または脳脊髄液のクリプトコックス莢膜抗原が陽性となった感染症である。

播種性クリプトコックス症の原因となるクリプトコックス属真菌は、*C. neoformans* と *C. gattii* に大別される¹⁾。*C. neoformans* は世界的に広く生息しており、わが国のクリプトコックス症のほとんどが *C. neoformans* によるものである^{2,3)}。一方 *C. gattii* は、従来熱帯から亜熱帯地域を中心に生息し感染症例の発生は限局的であったが、1999 年以降、カナダ・バンクーバー島から米国北部太平洋岸を中心にアウトブレイクが発生し、流行地域の世界的な拡大が懸念されるようになった⁴⁾。さらに *C. gattii* 感染症の国内発生例と考えられる報告も認められている⁵⁾。このような公衆衛生的背景を基盤に、平成 26 年 9 月に感染症法が改定され、播種性クリプトコックス症は五類全数把握疾患としてサーベイランス対象疾患となり、その発生件数が年間約 120 例程度であることが明らかとなった⁶⁾。

クリプトコックス属は酵母様真菌であり、土壌などの環境中に棲息する菌がハトなどの鳥類の糞中で増殖し、乾燥によって空気中に浮遊した真菌を吸入して感染が成立する¹⁾。これまでにヒト-ヒト間での感染は報告されていない。肺以外にも環境から感染する臓器として皮膚があり、傷害された皮膚に直接感染し潰瘍等を形成する例もまれにみられる。下気道に侵入した菌体は、厚い莢膜をはじめ様々な病原因子を発現することによってマクロファージや好中球といった自然免疫系を回避する。そのため宿主側は Th1 細胞などによって産生される interferon- γ (IFN- γ) などのサイトカインによって活性化マクロファージや多核巨細胞が誘導・集簇し形成される肉芽腫によって、菌体を封じ込めると考えられている。AIDS 患者に代表される CD4T 細胞数が減少し細胞性免疫が低下した状態では、クリプトコックスの増殖を抑制することができなくなり、播種性クリプトコックス症の発症率が高くなる。HIV 患者の少ない本邦ではステロイドや免疫抑制剤投与が半数の症例で認められていた⁶⁾。その他にもクリプトコックス症の危険因子として、慢性腎不全、膠原病、糖尿病、血液疾患、悪性腫瘍などが挙げられるが、健常人にも発症する。特に *C. gattii* は *C. neoformans* と比べ健常人に多く発症し、中枢神経系感染症を合併する頻度が高く重症化しやすいことで知られている⁷⁾。脳髄膜炎を合併した場合は、発熱や頭痛に加え、嘔気・嘔吐や項部硬直などの髄膜刺激症状、性格変化や意識障害などの神経症状を認めることもある。

播種性クリプトコックス症治療の第一選択は、リボソーマルアムホテリシン B (L-AMB)とフルシトシン (5-FC)の併用であり、維持療法としてフルコナゾール (FLCZ)の経口あるいは静注が行われる⁸⁾。*C. gattii* 感染症に対する治療のエビデンスは少なく、*C. neoformans* に準じた抗真菌薬の選択が推奨されている⁸⁾。

2. 検査方法

1) 分離培養法

未培養の臨床材料は、真菌の分離、遺伝子学的検査、血清検査のいずれか、または複数ないし全てを行うかどうかを考慮し、検体を分割する。

全検体（小さな組織片など分割できない場合）または検体の一部を、寒天培地または液体培地（無菌の液性検体など）に塗布・添加し、所定の培養器で、適切な温度下（25℃と 37℃など）で培養する。4 週間培養して真菌の生育が認められない場合は、培養陰性と判定する（培養期間は、検体毎に考慮する）。

a. 組織検体

無菌検体は、無菌的（遺伝子検査を行う場合には DNA 等の汚染がないよう）に操作する。必要に応じて、細断・すりつぶし等の処理を行う。細断に際しては、滅菌したピンセット、ハサミあるいは使い捨てのメス等を用いる。

検体そのもの、あるいは細断・すりつぶした検体の全量または一部を寒天培地に塗布し、培養する。

b. 血液検体

全血は、全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。血清・血漿は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。

c. 液性検体（血液以外の無菌検体）

必要に応じて、遠心分離し、沈き部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。

d. その他の検体

上記以外の検体については、用途に応じその都度考慮する。

2) 同定法

ア) 墨汁法による直接鏡検

脳髄膜液などの臨床検体や培養菌液を用いて、墨汁法による直接鏡検で莢膜を有する酵母を確認する（図1）。

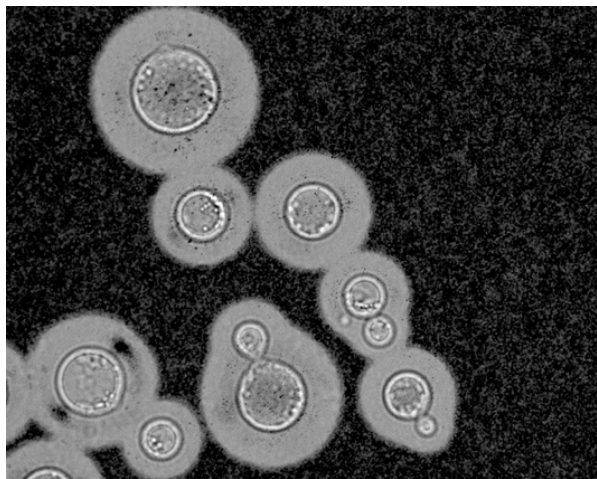


図1 墨汁法による *C. gattii* の莢膜の観察

イ) 抗原検出法

C. neoformans の莢膜多糖抗原である GXM (glucuronoxylomannan) 抗原をラテックス凝集法で半定量的に検出する方法が用いられる。国内ではセロダイレクト®栄研クリプトコックス(セロダイレクト:栄研化学、東京)とパストレックス®クリプトプラス (パストレックス:バイオ・ラッド ラボラトリーズ、東京)の2キットを使用可能である。双方とも血清・脳髄膜液を検体として極めて高い感度と特異度を示すことが知られている。

ウ) 遺伝子診断法

【原理および概要】

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⁹⁾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。

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、*Cryptococcus neoformans* および *C. gattii* の区別は、ITS 領域でも可能であるが、その DNA 塩基配列の差異は 1%程度であり、IGS 領域の塩基配列を比較することによって、より容易に区別が可能となる。

【実際の手順】

<培養菌の場合>

遺伝学的同定法は、一般的に推奨された同定法に準拠しておこなう。標準株の遺伝子を対照として、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、この産物についてシーケンスを行ったのち、国際的に公表されているデータベースを参照して菌種を同定する。

(ア) DNA の抽出

培養した菌を集菌し、DNA 抽出キットのマニュアルに従い DNA を抽出する。

(イ) PCR

1)で抽出した DNA を template にして、panfungal primer (D1/D2 LSU および ITS 領域:プライマーは原則 ITS5-NL4 を使用) または特異的な primer を用いて増幅する。

<未培養臨床検体の場合>

検体に応じたキットを用いて DNA を抽出する。非固定検体の場合は、ITS5-NL4 プライマーを使用する。ホルマリン固定検体では、ITS1-ITS2, ITS3-ITS4, NL1-NL4 プライマーの組合せで行う。

<PCR reaction の組成>

クリーンベンチで premix 化したものを用いる。

上記と異なるクリーンベンチで陰性対照を添加する。その後に、抽出 DNA (臨床検体由来のみ) を添加する。

所定の実験台で、培養菌からの抽出 DNA および、最後に陽性対照を添加する。

DNA ポリメラーゼの添付文書に従い、アニール温度 55°C もしくは 60°C、伸長時間 1 分で行う。サーマルサイクラーを用いて PCR を行う。

i) 生菌より抽出した DNA からの PCR

DNA	x μ l
100 μ M primer 5'	0.5 μ l
100 μ M primer 3'	0.5 μ l
<i>TaKaRa ExTaq</i>	0.25 μ l
10X ExTaq Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
PCR 用純水	37.75 -x μ l
<hr/>	
計	50 μ l

ii) 臨床検体より抽出した DNA からの PCR

DNA	x μ l
100 μ M primer 5'	0.5 μ l
100 μ M primer 3'	0.5 μ l
2xMightyAmp buffer	25 μ l
MightyAmp DNA polymerase	1 μ l
PCR 用純水	23-x μ l
<hr/>	
計	50 μ l

(ウ) PCR 産物の確認・コンタミの予防

1.5% agarose gel で泳動し、増幅産物の有無、大きさを確認する。キャリーオーバーによる汚染を判別可能とするマーカー入り陽性対照を作製し、常に、使用する。また、試薬の調製、検体処理、泳動などは物理的に隔絶された場所で行う。試薬調製・DNA の添加に用いるチップおよび 1.5 ml チューブは、毎回新しい包装を開封する。専用のピペットマン・チューブラックを用いる。

陽性対照(pCR4-ITS-NL-Hph-PC)で増幅が確認され、陰性対照で増幅が認められない上で、抽出 DNA からの増幅産物が確認できない場合、遺伝子検査陰性と判定する。陰性対照には PCR グレードの水、抽出に用いた生理食塩水、抽出バッファーを、用途に応じて用いる。臨床検体由来の PCR では、抽出・精製の際に検体を入れない陰

性対照を設定し、検体と同様の抽出・精製過程を経た溶出液を、PCR の陰性対照とする。

(エ) シークエンス

PCR 増幅産物が確認できれば、増幅産物を精製後、それぞれ、PCR に用いたプライマーで、シークエンスを行う。BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit を用い、マニュアルに従い試薬を混和する。

(オ) ホモロジー検索

国際的に公表されているデータベースである BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および Mycobank (<http://www.mycobank.org>) を参照して、99%以上の相同性を基準として、菌種を同定する。比較対象となる菌株は CBS もしくは ATCC の標準株とする。99%以上の相同性が得られない場合、再度同定を試み検索する。再同定でも同定できない場合は可能性の高い上位菌種を列挙し、参考結果とする。クリプトコックス属に関しては IGS 領域の塩基配列まで決定し、同定する。

表 1 Panfungal primer

● D1/D2 primer

NL1	5- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AA-3
NL4	5- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3

● ITS primer

ITS1	5- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3
ITS2	5- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC -3
ITS3	5- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3
ITS4	5- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3
ITS5	5- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3

表 2 特異的 primer

● クリプトコックス IGS primer

IGS1F	5- ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA -3
IGS1R	5- GTG ATC AGT GCA TTG CAT GA -3

IGS2F	5- CAG GAA GTT AAG CTG AAG AG -3
IGS2R	5- AGT GTT TGA GCC TAC CAC GTA -3

※同時に IGS1F-IGS1R および IGS2F-IGS2R の組み合わせで PCR を行う。

3. 感染症法届出基準

(1) 定義

Cryptococcus 属真菌による感染症のうち、本菌が髄液、血液などの無菌的臨床検体から検出された感染症又は脳脊髄液のクリプトコックス莢膜抗原が陽性となった感染症である。

(2) 臨床的特徴

潜伏期間は不明である。免疫不全の者である場合と免疫不全でない者である場合とでその臨床的特徴が異なる。

ア 免疫不全の者である場合

脳髄膜炎として発症することが多く、発熱、頭痛などの症状を呈する。リンパ節腫大や播種性病変として皮疹、骨、関節などの病変も認められる。

イ 免疫不全でない者である場合

中枢神経系の病変では、痙攣、意識障害などの重篤な症状がみられる症例から、発熱、頭痛等の典型的な脳髄膜炎症状を欠く症例まで様々である。中枢神経系の腫瘍性病変としてみられる場合は、腫瘍との鑑別が必要となる。慢性の脳圧亢進による性格変化などの症状のみを呈する場合もある。

中枢神経系以外の眼、皮膚、骨（骨髄）等への播種では局所に応じた症状を呈する。

(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、症状や所見から播種性クリプトコックス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、播種性クリプトコック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7日以内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 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、播種性クリプトコックス症が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、播種性クリプトコック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7日以内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。

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体
病理組織学的診断（組織診断又は細胞診断で莢膜を有する酵母細胞の証明）	髄液、病理組織
ラテックス凝集法によるクリプトコックス莢膜抗原の検出	髄液、血液

4. 参考文献

- 1) Heitman J, et al. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. pp237-259. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. 2011 ASM Press, Washington, DC.
- 2) Mihara T, et al. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated Cryptococcus in Nagasaki, Japan. *Med Mycol* 51:252-60, 2013.
- 3) Umeyama T, et al. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66:51-5, 2013.
- 4) Byrnes EJ 3rd, et al. Molecular evidence that the range of the Vancouver island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J Infect Dis* 199:1081-6, 2009.
- 5) Okamoto K, et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. *Emerg Infect Dis* 16:1155-57, 2010.
- 6) 播種性クリプトコックス症の発生動向 2014年第39週～2015年第37週、IASR 36:183-4, 2015.
- 7) Chen SCA, et al. *Cryptococcus gattii* infection. *Clin Microbiol Rev* 27:980-1024, 2014.
- 8) Perfect JR, et al. Clinical practice guideline for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50:291-322, 2010.
- 9) 杉田隆, 西川朱實: DNA塩基配列解析による病原真菌の分離・同定. *真菌誌* 45 (2): 55-58, 2004.

5. 執筆者

国立感染症研究所 真菌部

梅山 隆、中村茂樹、宮崎義継

6. 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丁目23-1

電話：03-5285-1111（内線 2301）

FAX：03-5285-1175

電子メール: shinkin-kensa@niid.go.jp