

令和5年度 希少感染症診断技術研修会

2024年2月15日 【真菌・寄生虫】 13:50 – 14:10

「カンジダ・アウリス (*Candida auris*)」

国立感染症研究所 真菌部 第一室長

阿部 雅広

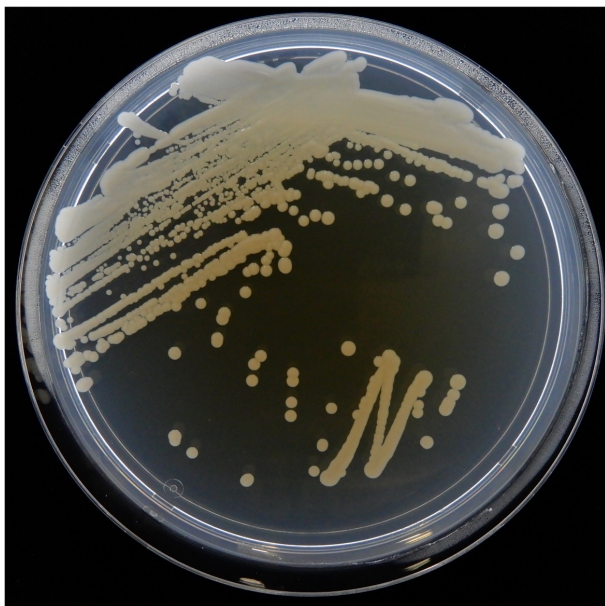
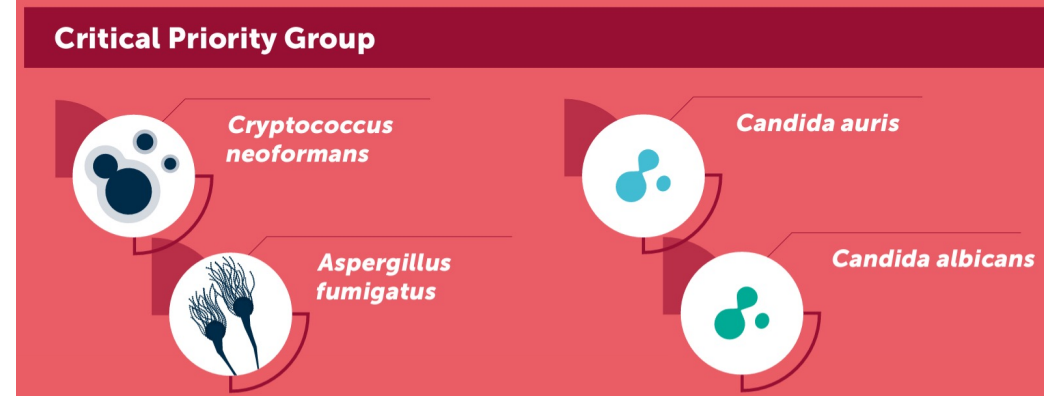
カンジダ属とヒトにおける感染症

- カンジダ属による感染症は表在性カンジダ症と深在性カンジダ症に大別される
 - 表在性カンジダ症：口腔カンジダ症、外陰部腔カンジダ症など → 一般的に重症度は低い
 - 深在性カンジダ症：最も典型的なものはカンジダ血症 (血流感染症) → 重症度が高い病態
- 臨床上頻度が高い病型は表在性カンジダ症であるが、カンジダ血症は頻度の高い深在性真菌感染症の一つであり、致死率も高く正確な診断・治療が重要である
- 最も分離頻度の高い菌種は*Candida albicans*であるが、近年は*non-albicans Candida*の割合が増加しており、薬剤耐性カンジダ属も各国から報告される
 - *C. glabrata*、*C. parapsilosis*、*C. tropicalis*、*C. krusei*、*C. lusitaniae*など原因菌種は多彩
 - エキノキャンディン系耐性*C. glabrata*やアゾール系耐性カンジダ属など様々な耐性株の報告
- *Non-albicans Candida*の中でも、近年では*Candida auris*が世界的に大きな問題となっており、新興真菌感染症に位置付けられ対策が進められている

カンジダ・アウリス (*Candida auris*)

- *Candida auris*は慢性中耳炎患者の耳漏から分離され、2009年に本邦から初報告された菌種である
- 本邦での分離は耳漏が主体であるが、近年、世界各国から血流感染症由来の株が報告され対策が進められている
 - WHO：**Critical Priority Group**に指定
 - CDC：**Urgent threat**として全数把握疾患に指定
- 複数のcladeがあり、cladeにより主な感染症の型が異なる
 - Clade II：慢性中耳炎 (非侵襲性)
 - Clade I/III/IV：血流感染症 (侵襲性)

Fig. 1. WHO fungal priority pathogens list (WHO FPPL)



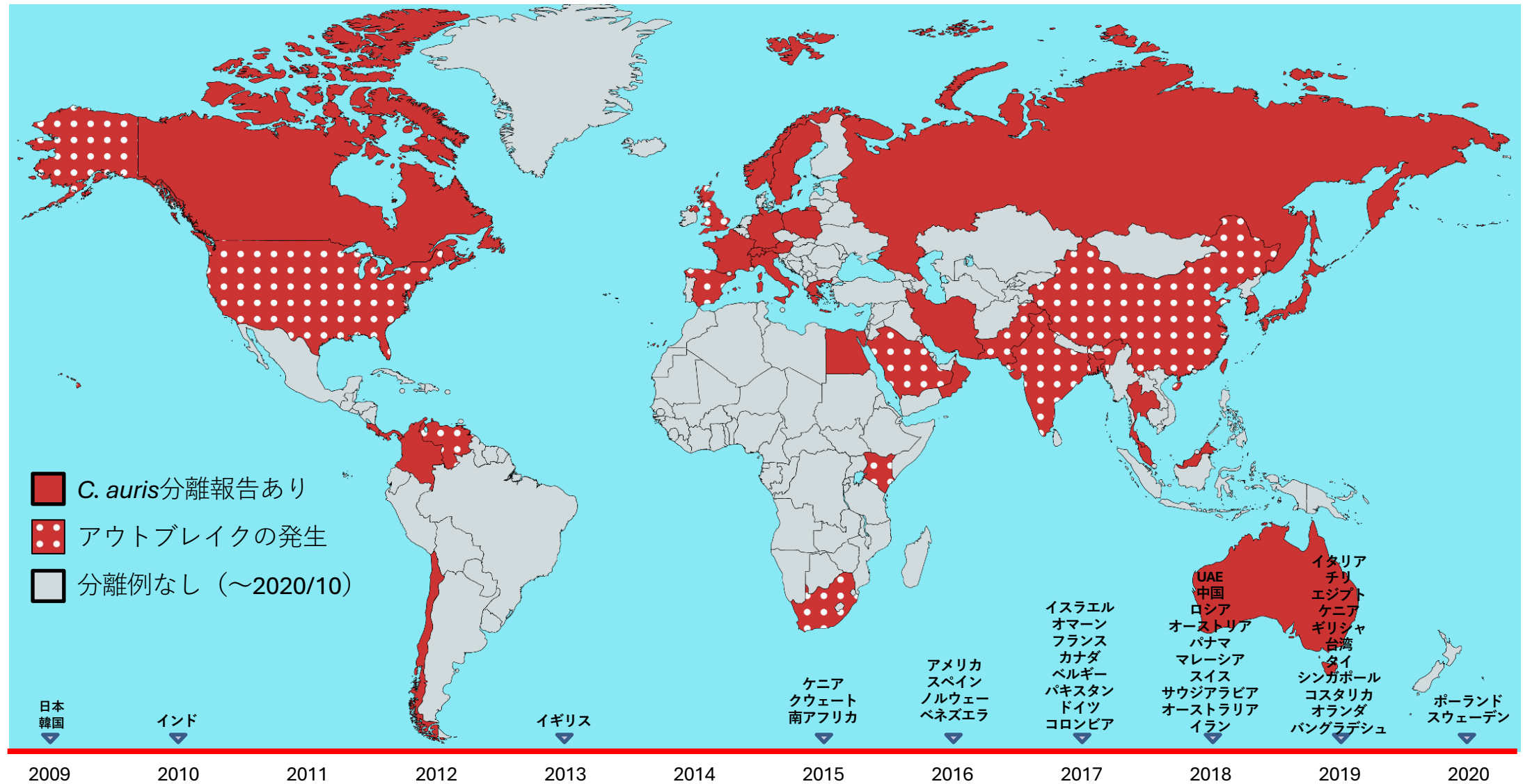
ポテトデキストロス寒天培地



CHROMagar *Candida* Plus



Candida aurisの世界的な拡がりとおウトブレイク



**今後、本邦でも複数のC. auris侵襲性感染症・
アウトブレイク発生が予想され、早期対策が必要**

Expert Rev Anti Infect Ther. 2020, 18(6):551-562
PLOS Pathogens. 2020, 16(10): e1008921.

本邦初の *Candida auris* 血流感染症死亡例の報告

Journal of Infection and Chemotherapy 29 (2023) 713–717



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Infection and Chemotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jic



Case Report

The first case of clade I *Candida auris* candidemia in a patient with COVID-19 in Japan

Yusuke Ohashi ^a, Takashi Matono ^{a,*}, Shotaro Suzuki ^b, Shumpei Yoshino ^c,
Mohamed Mahdi Alshahni ^d, Aya Komori ^d, Koichi Makimura ^d

^a Department of Infectious Diseases, Aso Iizuka Hospital, Japan

^b Department of General Internal Medicine, Aso Iizuka Hospital, Japan

^c Department of Intensive Care Medicine, Aso Iizuka Hospital, Japan

^d Teikyo University Institute of Medical Mycology, Japan



➤ 国内初の clade I *Candida auris* 血流感染症例の報告 (正確には海外からの輸入例)

Candida aurisは何故問題か？

診断

正確な診断が困難

- 従来の検査法では他菌種と誤同定
- 確定診断のために遺伝子検査または質量分析装置が必要となる
→ 全ての施設で実施可能ではない
- 培養偽陰性・菌種誤同定による見逃しから院内での拡大が生じうる
→ 正確な診断が感染予防・治療上重要

予防

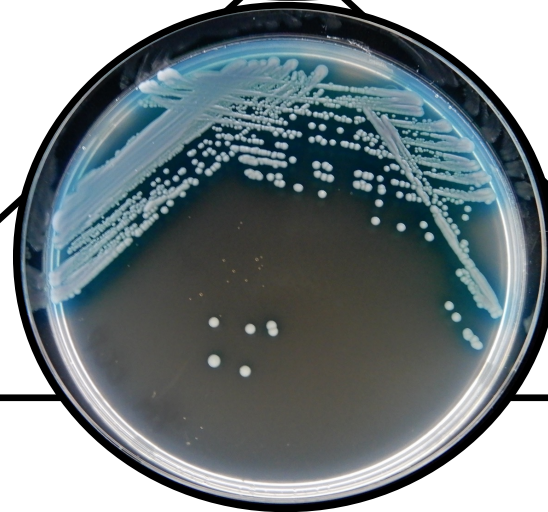
ヒト・環境中で長期間生存

- 高いバイオフィルム形成能を示す株の存在
- 消毒薬耐性が強く、環境中で長期間生存
- ヒト皮膚にも年単位での長期間定着あり
→ 医療機器を介した院内アウトブレイク多数
→ 感染予防の観点からも特に注意すべき真菌種

治療

高い抗真菌薬耐性率

- 他の菌種と比較しても抗真菌薬耐性率が高い
 - 93%がフルコナゾール耐性
 - 41%が2種類以上の抗真菌薬耐性
 - 全ての抗真菌薬に耐性株の存在も報告
- 耐性機序解析・新規薬剤開発は不十分
→ 標準治療確立・新規治療薬開発が大きな課題



Candida auris簡易同定法とその限界

<培地による簡易同定法：CHORMagar Candida>

- コロニーの色調は白色～クリーム色の他、桃色・紫色など多彩である
- *Candida parapsilosis*を初め、他菌種も類似のコロニー性状を示すため、特異性に欠ける

<改良版簡易同定法：CHORMagar Candida Plus>

- コロニーの色調は白色～青色であり、**青色のhalo**を伴う点の特徴である
- CHROMagar *Candida*より特異的に *C. auris*を検出可能であるが、他菌種でも類似のhaloを伴うコロニー性状となることがあり、確定ではない

<機械同定法 / 生化学的性状による同定法>

同定方法	誤同定されうる菌種
Vitek 2 YST	<i>Candida haemulonii</i> <i>Candida duobushaemulonii</i>
API ID 32C	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida sake</i> <i>Saccharomyces kluyveri</i> <i>Candida famata</i>
MicroScan	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida lusitaniae</i> <i>Candida parapsilosis</i>

<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/>



**より精度の高い
同定法が必要**

Candida aurisに関するマニュアル：診療の手引き

カンジダ・アウリス (Candida auris)

診療の手引き

第1.0版

Dec 2023

📄 診療の手引きのダウンロード

※本手引き（第1.0版）は、2023年11月の情報を基に作成しました。今後の知見に応じて、内容に修正が必要となる場合があります。厚生労働省、国立感染症研究所等のホームページから常に最新の情報を得るようにしてください。



疫学



特徴



診断



治療



感染
防止対策



報告対象と
報告先



相談先



執筆分担者

* 令和5年度 厚生労働科学研究費補助金の助成研究班
「AMRに関するアジア太平洋ワンヘルス・イニシアチブ（ASPIRE）
の実行のための体制整備に資する研究」の成果

(<https://dcc-irs.ncgm.go.jp/topics/candida-auris/>にて公表中)

Candida auris診断に関する現時点での見解

(ア)簡易スクリーニング

クロモアガーカンジダの場合：カンジダ・アウリスは白色・ピンク色・紫色など様々な色調を呈し他のカンジダ属と類似の形状を示すため、おおよそのスクリーニングに止まる [21]。

クロモアガーカンジダプラスの場合：カンジダ・アウリスのスクリーニングも可能な選択培地であるクロモアガーカンジダプラスでは青色のハローを伴い、白色～青色の色調を呈するとされている。しかしながら、コロニーの性状や色調だけで正確な同定はできない場合があるため、選択培地による目視による判定は疑いにとどめ、より信頼性のある方法による同定を試みる必要がある [22, 23]。

(イ)確定診断

- 現時点では質量分析法あるいは遺伝子検査法によってカンジダ・アウリスと同定された場合に確定例となる [24, 25]。
- ただし、質量分析法でカンジダ・アウリスと誤同定される場合も報告されているため、当面の間は遺伝子検査によって最終確認を行うこととする [24]。

※遺伝子検査の実施については、国立感染症研究所 真菌部にご相談ください。

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-fungi.html>
shinkin-kensa@nih.go.jp

(ウ)診断に関する問題点

- 上述したように選択培地での目視では疑い例をスクリーニングすることにとどめて、正確な同定のために更に検査を進めることが必要となる。
- 生化学的性状あるいは機械同定の場合は他菌種と誤同定されるケースがしばしば認められ、信頼性が低い。質量分析による同定では、同定に使用するデータベースにより類縁の酵母と誤同定する可能性が排除できない [24, 25]。
- 最終確定に使用する遺伝子検査は、現状ではrRNA (ITS・D1/D2) 領域の塩基配列、あるいは全ゲノム配列の相同性に基づいて判断しているが、信頼性が高い簡易遺伝子検査法の開発が進められている。

※令和5年5月1日発出の事務連絡「多剤耐性で重篤な感染症を引き起こす恐れのあるカンジダ・アウリス (Candida auris) について (情報提供及び依頼)」に基づき作成

<簡易スクリーニング検査>

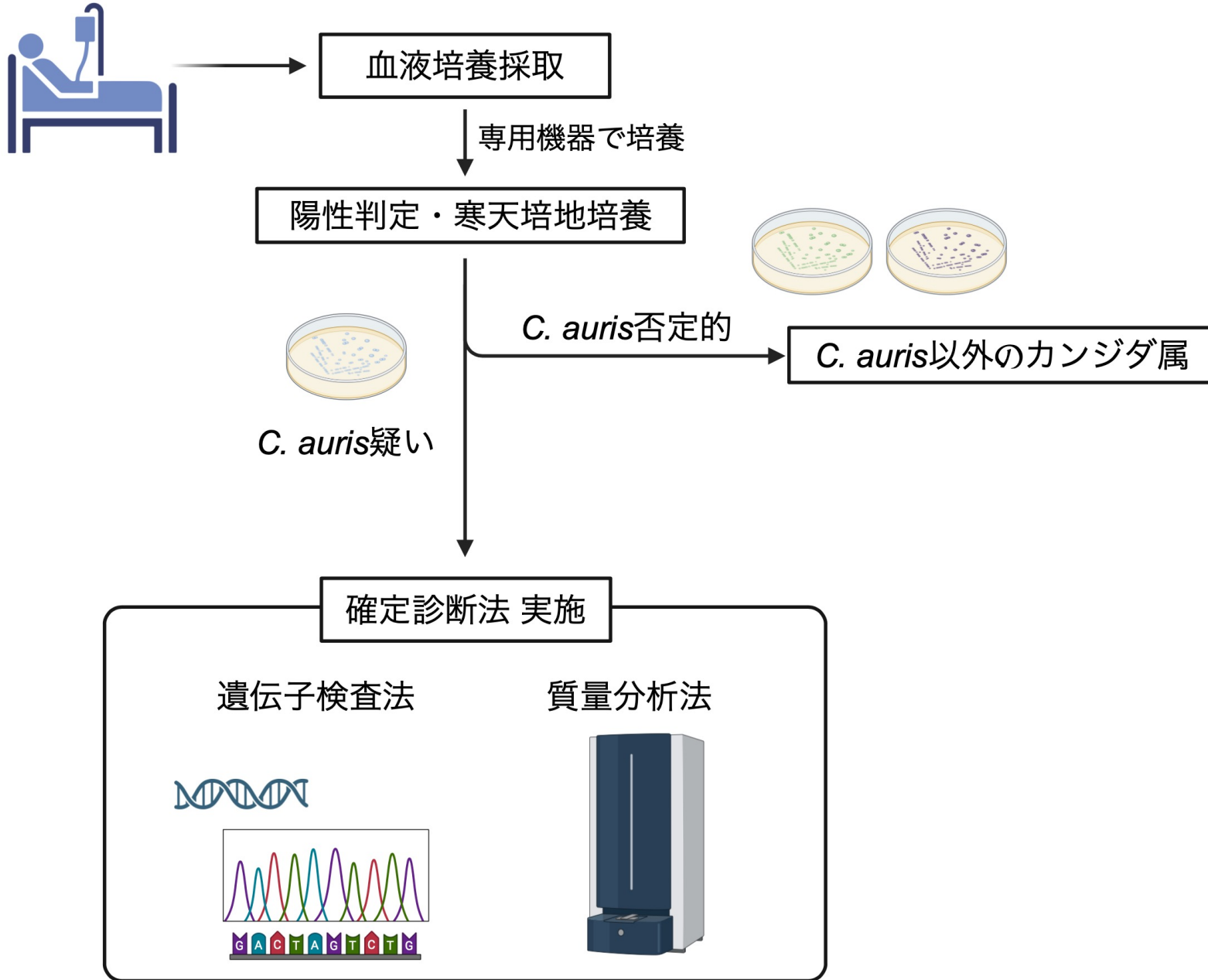
- CHROMagar *Candida* :
おおよそのスクリーニングにとどまる
- CHROMagar *Candida* Plus :
正確な同定ができない場合もあるため、
目視判定は疑いにとどめ他の方法を試みる

<確定診断>

- 遺伝子検査法 :
rRNA領域 (ITS・D1/D2) 領域の塩基配列解析
- 質量分析法 :
遺伝子検査法と並び信頼度の高い検査
同定に使用するデータベースによっては、
他菌種と誤同定される可能性がある

(<https://dcc-irs.ncgm.go.jp/topics/candida-auris/>より抜粋)

Candida auris検査：臨床現場における流れ



Candida auris診断：遺伝子検査法

検査手順

1. 検体準備：

真菌培養用寒天培地に植菌し、
37°Cでコロニーが形成されるまで培養

2. PCR：

rRNA遺伝子間に存在するITS領域、rRNA遺伝子中のD1/D2 large subunitを増幅するプライマー(原則ITS5 – NL4を使用)を用いてPCRを実施

* 増幅が認められない場合はITS1 – NL4 で実施

3. PCR産物の確認：

PCR反応液の1/10量を1.5% agarose gelで電気泳動し、増幅産物の長さを確認(*Candida auris*の場合、約1kbのDNA断片が増幅される)

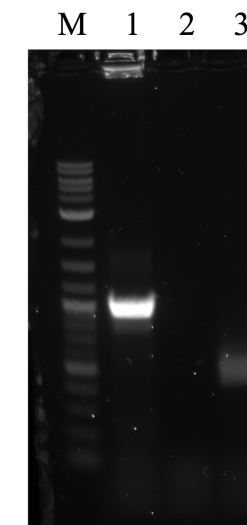
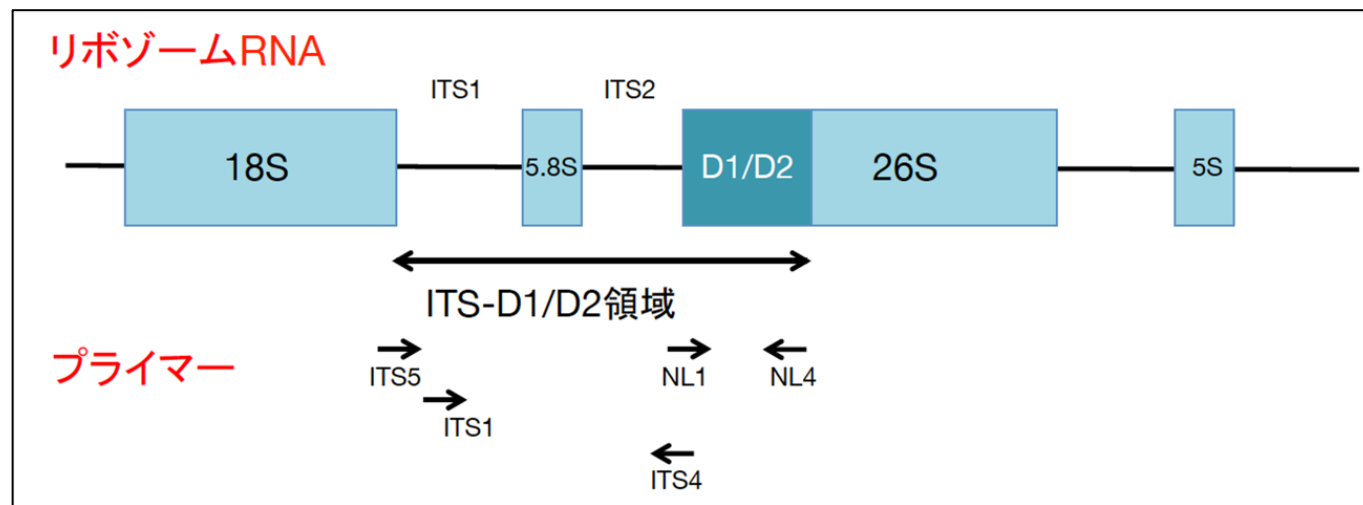
4. PCR産物の精製・塩基配列決定：

PCR反応液の残量を精製し、シーケンスにて塩基配列を決定(シーケンス用プライマー：ITS1、ITS4、NL1、NL4)

5. 塩基配列解析：

決定した塩基配列を用い、国際的に公表されているデータベースと照合し、相同性検索を行い塩基一致率を基準として菌種を同定

(データベースの一例：Mycobank <<https://www.mycobank.org>>)

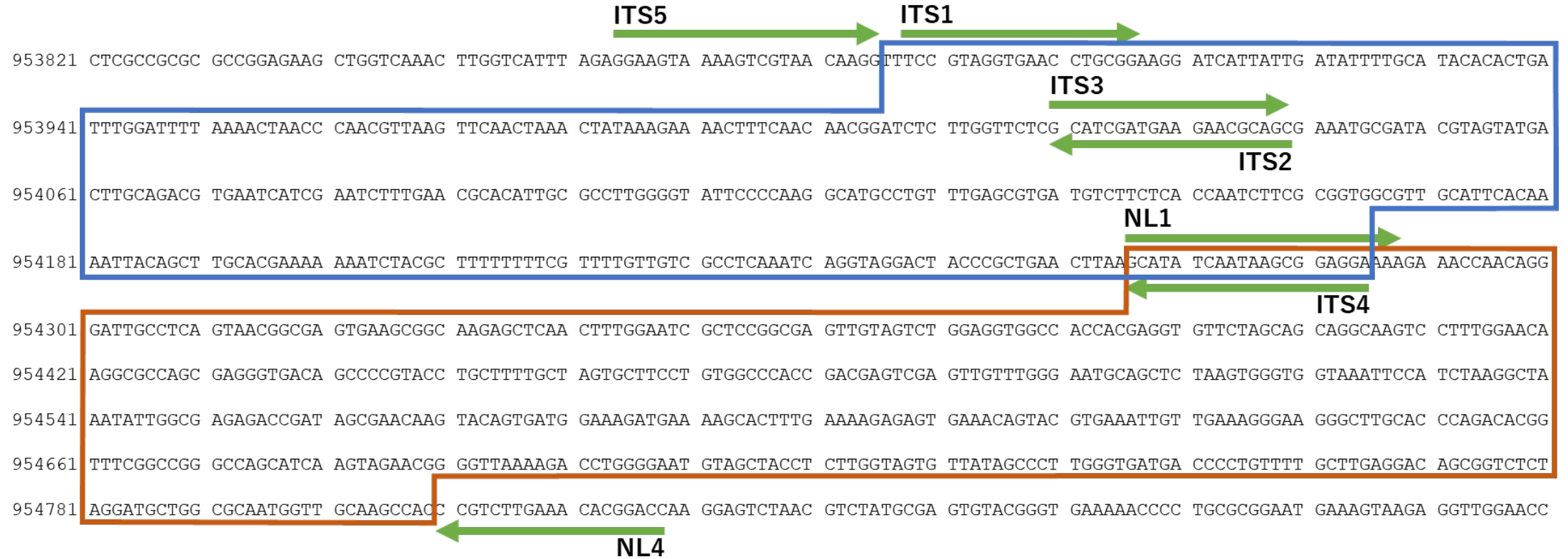


ITS5-NL4

- M NEB 1kb Plus DNA Ladder
- 1 検査菌株
- 2 陰性コントロール
- 3 陽性コントロール (pCR4-ITS-NL-Hph-PC)

Candida auris 診断：塩基配列解析領域

(ACCESSION No. CP043535, *Candida auris* strain B11220 chromosome 5の953864-954828：965塩基 (増幅領域))



- ITS領域 塩基配列解析部位(400塩基)
- D1/D2領域 塩基配列解析部位 (544塩基)

Candida auris診断：質量分析法

- 酵母様真菌同定における信頼度は高く、確定診断の一つとして使用可
 - Bruker社：MALDI Biotyper
 - bioMérieux社：VITEK-MS
- 真菌同定に用いる際の注意点：前処理の必要性
 - 菌体・マトリクスのみでは解析できず、ギ酸による前処理が必要
 - エタノール・ギ酸抽出法、ギ酸オンプレート法など
- *Candida auris*同定に用いる際の注意点：データベースの更新
 - MALDI Biotyper：MBT Compass Library ver.4以降で登録あり
 - VITEK-MS：Saramis ver 4.14以降で登録あり

<感染研 真菌部での検証>

機器：Bruker Biotyper
データベース：
MBT Compass reference
Library (ver.12)
一致率：100%











菌株	質量分析結果		
	<i>Candida auris</i>	Non- <i>C. auris</i>	
<i>Candida auris</i>	23	0	23
Non- <i>C. auris</i>	0	5	5
	23	5	28

Candida auris 迅速診断：特異的real-time PCRによる解析

Exclude regions common to *Candida* spp.
(from genome database)

Choose the appropriate primers
(with Primer3)

In silico screening
(with *Candida auris* genome)

- 
-  *Candida auris*
 -  *Candida albicans*
 -  *Candida glabrata*
 -  *Candida parapsilosis*
 -  *Candida haemulonii*
 -  *Candida duobushaemulonii*
 -  *Candida lusitanae*
 -  *Candida tropicalis*
 -  *Candida krusei*

Genome database

Primer Design

Primer design algorithm

- ✓ GC content : 40 ~ 60%
- ✓ 3' base is other than T
- ✓ Amplification product : 140 - 160bp
- ✓ No consecutive 4-base repeats
- ✓ No complementary regions between primer pairs

Primer Screening

Primer screening algorithm

- Use 166 *Candida auris* genome
- Exclude primers not matching some strains
- Check complementarity / dimer possibility
- Exclude primers not suitable for this criteria
- Pick up primers for next steps

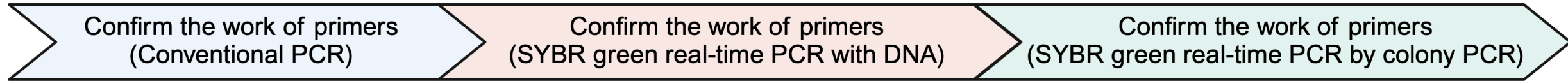
No. of targets /
primer candidates

5124 regions

622 pairs

15 pairs

Candida auris迅速診断：特異的real-time PCRによる解析



Primer selection

Primer selection with *C. auris* DNA

- ✓ Check the length of the band
- ✓ Check the number of the bands (Confirming the single band)

5' 3' 5' 3'

Primer selection

Primer selection from real-time PCR

- ✓ Confirming the sensitivity
- ✓ Check the specificity (with 8 other *Candida* species)
- ✓ Check single peak on melting curve

Fluorescence

Amplification

Threshold

No amplification

Copies per reaction (Ct)

Primer selection

Primer selection from real-time PCR (by colony PCR method)

- ✓ Confirming the sensitivity / specificity
- ✓ Check single peak on melting curve

Fluorescence

Amplification

Threshold

No amplification

Copies per reaction (Ct)

No. of primer candidates

15 pairs

4 pairs

1 pair

*C. auris*を特異的に検出可能な系を確立 → 地方衛生研究所と共有

Candida auris診断法のまとめ

- 一般的に使用される機械同定・生化学的性状による同定では誤同定が生じるため、信頼のおける同定法として使用できない
- CHROMagar *Candida*による目視判定はスクリーニング検査にとどまり、CHROMagar *Candida* Plusは信頼度は上がるが確定診断にはならない
- 現時点での確定診断法は遺伝子検査法または質量分析法である
- 質量分析法を用いる際は、機器及びデータベース情報を確認する
- 迅速診断法として*C. auris*特異的領域を対象としたreal-time PCR法を確立し、地方衛生研究所等と共有予定である(確定診断法ではない)
- Real-time PCR法はインターカレーター法 (SYBR Green) であるが、現在Probe法による迅速診断系も開発中であり、共有を予定している

Candida auris対策：国立感染症研究所の取り組み

迅速診断法 開発

- Real-time PCR法に基づく *C. auris* 特異的迅速診断系の構築
- 抗*C. auris*抗体作製、ベッドサイドで利用可能な迅速診断系構築

臨床・ 疫学研究

- カンジダ血症後方視的解析による臨床像の評価、分離菌株解析
- 全国規模での*C. auris*分離菌株収集、解析による正確な発生動向把握

*Candida auris*感染症 の制御・克服

有効な 新薬開発

- 新薬候補化合物スクリーニング、作用機序解析と *in vivo* 評価
- 抗*C. auris*抗体作製技術の抗体医薬への応用と *in vivo* 評価

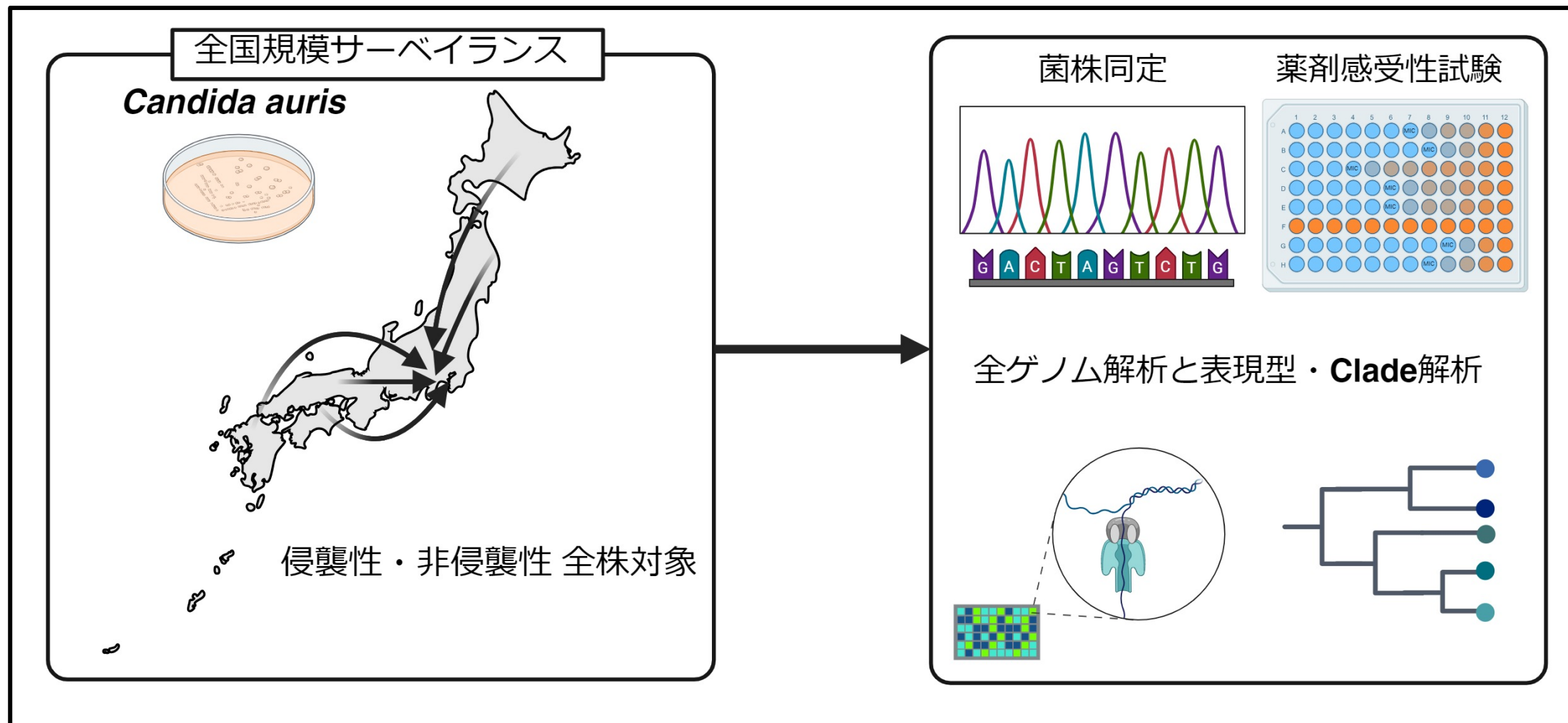
教育・啓発 セミナー

- 開発した迅速診断法の普及
- 疫学研究データの公表
- *C. auris*に関する知識の普及および診断・治療マニュアル作成・公表

Candida auris対策：国立感染症研究所の取り組み

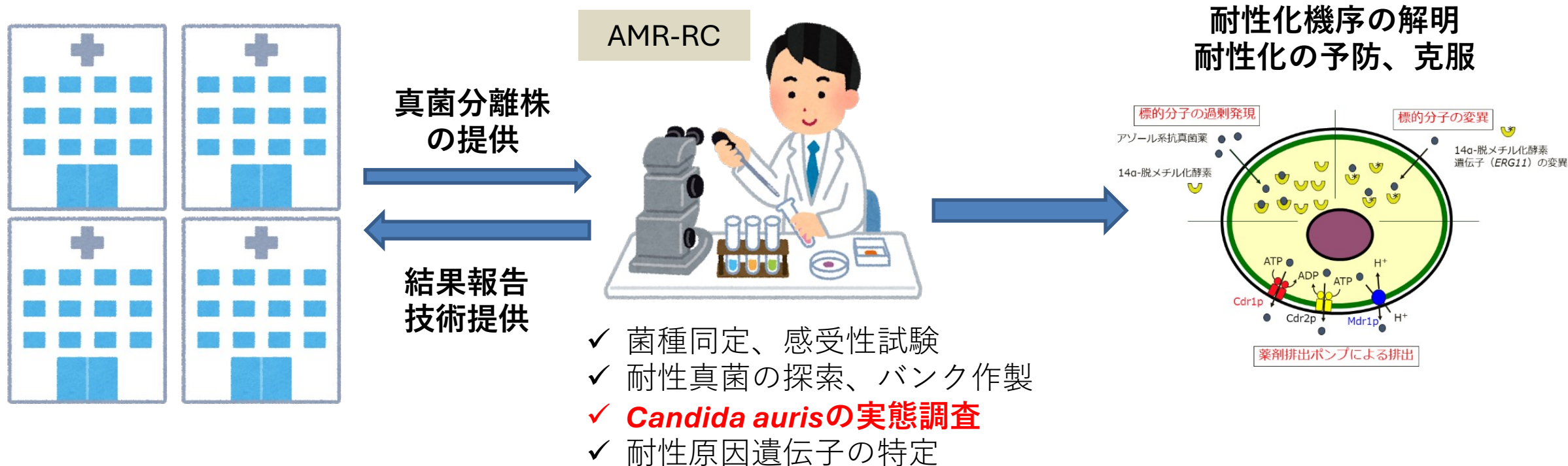
疫学研究：*C. auris*分離菌株サーベイランス

- 厚生労働省事務連絡に基づき全国からの菌株収集体制の構築



Candida auris対策：国立感染症研究所の取り組み

疫学研究：JARBS-Candida program



収集対象（国内の血液分離カンジダ属菌のなかで以下の基準を1つでも満たすもの）

- ① 薬剤感受性試験で耐性と判定された菌株
- ② *C. albicans* / *C. glabrata*以外の菌種と判定された菌株
- ③ 菌種不明の菌株