

令和4年度 希少感染症診断技術研修会

2023年2月16日 13:10-13:30

真菌症の検査:

コクシジオイデス症とクリプトコックス症

国立感染症研究所 真菌部 上野 圭吾

コクシジオイデス症—Coccidioidomycosis—の概要

原因菌: *Coccidioides immitis*

Coccidioides posadasii

流行地: 渡航歴 乾燥地帯, 米国南西部など

菌の形態/環境中: 分節型分生子

病態・病変 呼吸器, 播種, 皮膚

ヒト間の伝播: 報告されていない

国内報告数: 57例 1999—2020年 発生動向調査
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10411-report-ja2020-20.html>

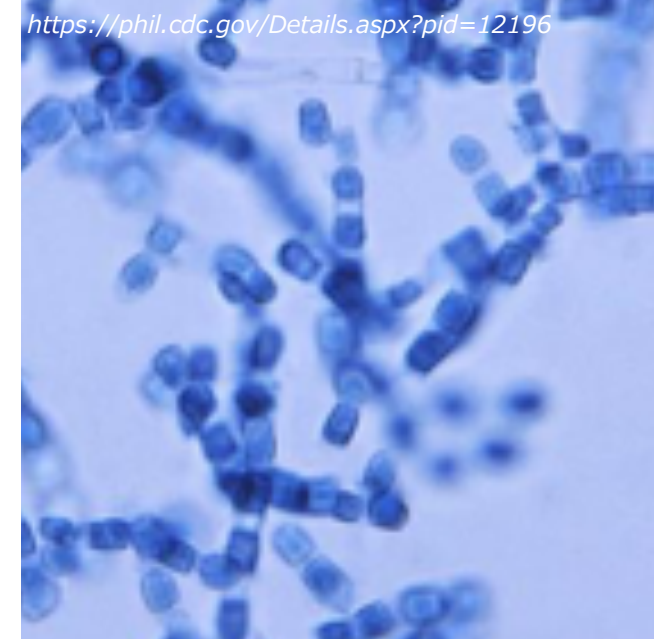
飛散・感染性: 高い飛散性と感染性

実験室のBSL: 封じ込め実験室 (BSL3)

感染症法: 4類感染症 検査室事故に注意

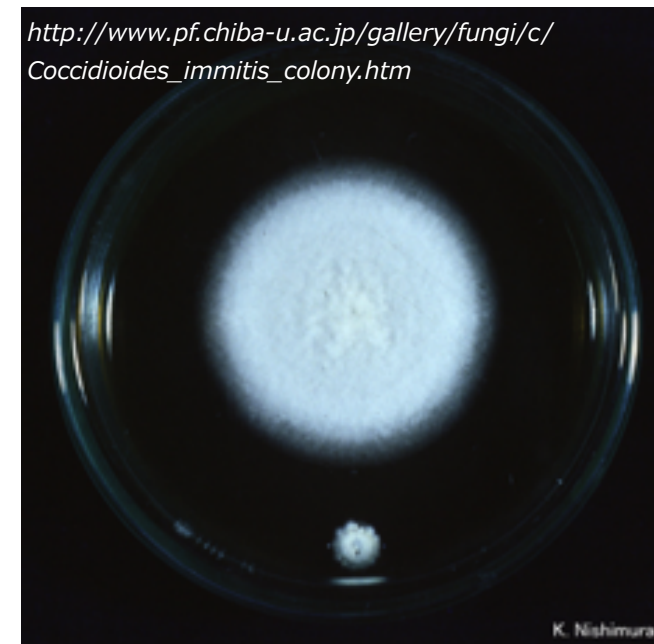
特定病原体: 三種病原体 (*Coccidioides immitis*)

分節型分生子
(LPCB染色)



米国CDC・フォトギャラリー

白色コロニー



千葉大 真菌セ・フォトギャラリー

コクシジオイデス症の診断に有効な4つの検査:

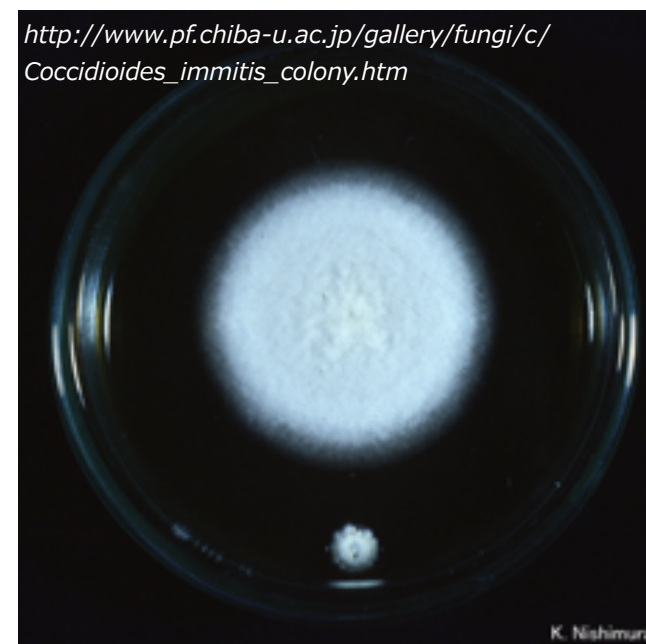
培養検査, 病理検査, 抗体検査, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

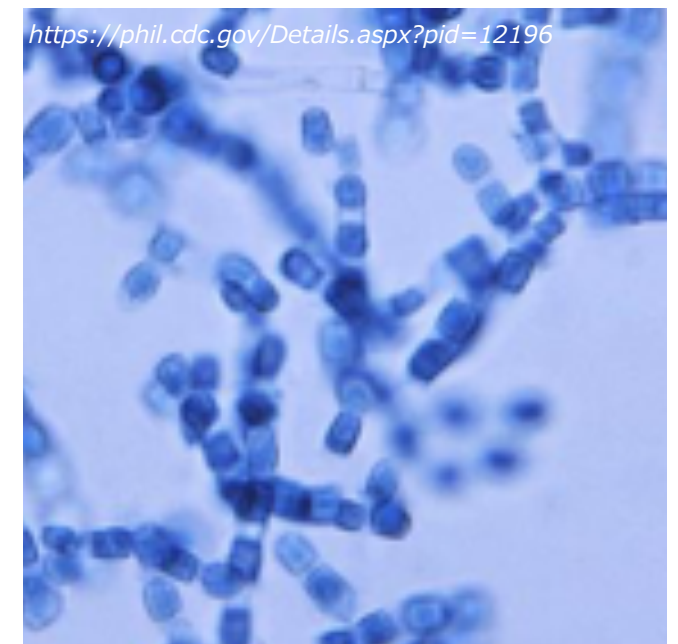
1. 培養にはBSL3実験施設が必要であるため, 専門機関に事前に相談する.
 - 国立感染症研究所 真菌部
 - 千葉大学 真菌医学研究センター 臨床感染症分野
2. 密閉可能な斜面培地に生検検体 (BSL2) をのせて室温で送付する.
3. コロニー, 菌糸, 分節型分生子の形態を観察し, 遺伝子検査に供する.
4. コクシジオイデスを疑う真菌が発育した場合, 慎重に密封して滅菌する.



特殊フィルターで飛散防止. 培養後, 通気穴からホルマリン等を注入



千葉大 真菌セ・フォトギャラリー



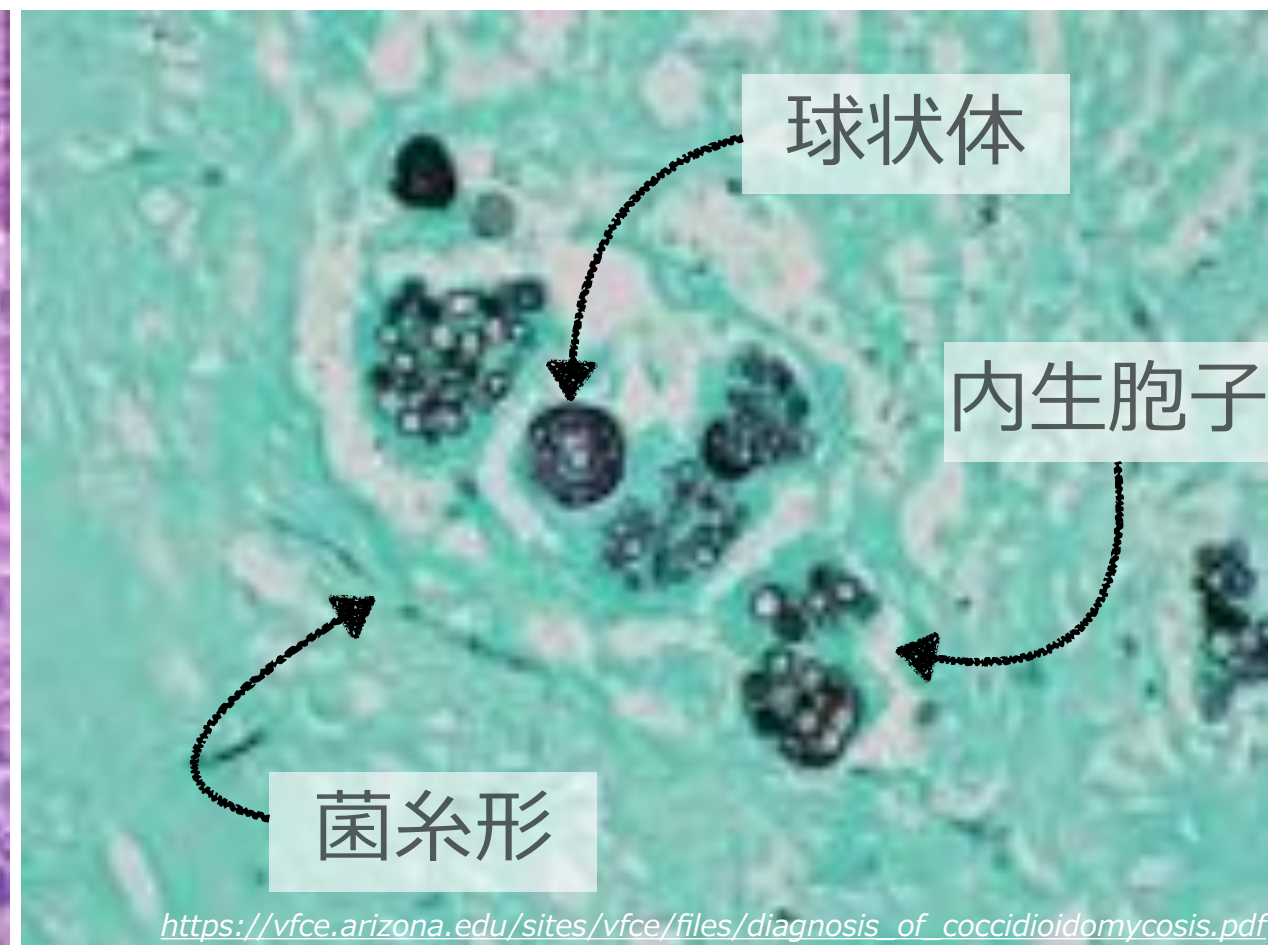
米国CDC・フォトギャラリー

コクシジオイデス症の診断に有効な4つの検査: 培養検査, **病理検査**, 抗体検査, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>



HE染色



Grocott染色

鑑別のポイント: 内生胞子を含んだ球状体が観察できるか?

1. 喀痰の塗抹標本: Papanicolaou染色, PAS染色, Grocott染色など
2. 生検検体の病理標本: HE染色, PAS染色, Grocott染色など

コクシジオイデス症の診断に有効な4つの検査: 培養検査, 病理検査, **抗体検査**, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

IMMY社



<https://www.immy.com/cab>

酵素免疫測定法 (EIA)

IMMY社



<https://www.immy.com/cta>

免疫クロマトグラフィー法 (LFA)

- 血清や脳脊髄液中のコクシジオイデス特異的IgM, IgGを検出する
- 感染1-3週間でIgMが, 感染3-4ヶ月でIgGが検出される
- 脳脊髄液をEIA, IgM/IgG二重陽性, 感度94% 特異度90% PMID: 32759879

コクシジオイデス症の診断に有効な4つの検査:

培養検査, 病理検査, 抗体検査, **遺伝子検査**

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

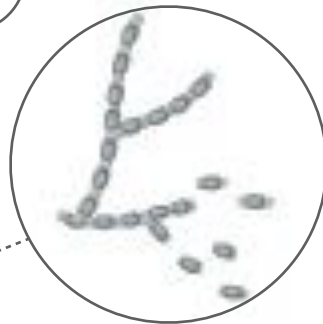
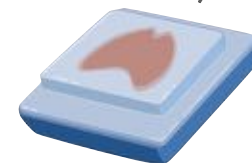
検体毎に工夫するDNA抽出法

1. Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Kit
2. Qiagen, QIAamp DNA FFPE Tissue kit
3. 煮沸法 (PBS+0.01% Tween-80, 100°C, 5分間)

生検検体



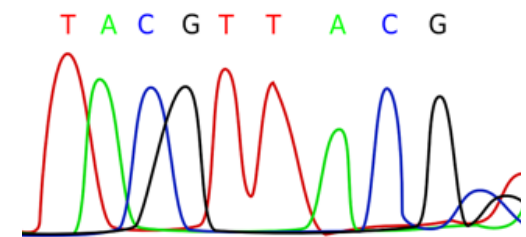
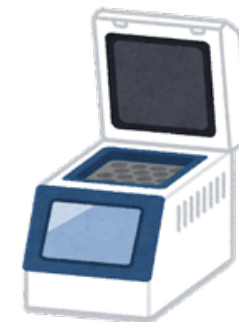
組織ブロック



培養後の菌株

PCRによるDNAの増幅と塩基配列の解析

1. 真菌特異的rRNA遺伝子 *Sugita et al., Med Mycol J, 2004*
2. コクシジオイデス特異的領域 *Umeyama et al., J Clin Microbiol, 2006*
3. コクシジオイデス特異的Ag2/PRA遺伝子 *Bialek et al., J Clin Microbiol, 2004*



短いPCR産物

クリプトコックス症—Cryptococcosis—の概要

原因菌: *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus gattii

感染源: 鳥糞 (*Cn*), ユーカリ (*Cg*)

菌の形態: 莢膜を有する酵母形

病態・病変: 呼吸器, 中枢神経系への播種

リスク因子: CD4+ T細胞の減少 (*Cn*)

GM-CSF自己抗体 (*Cg*)

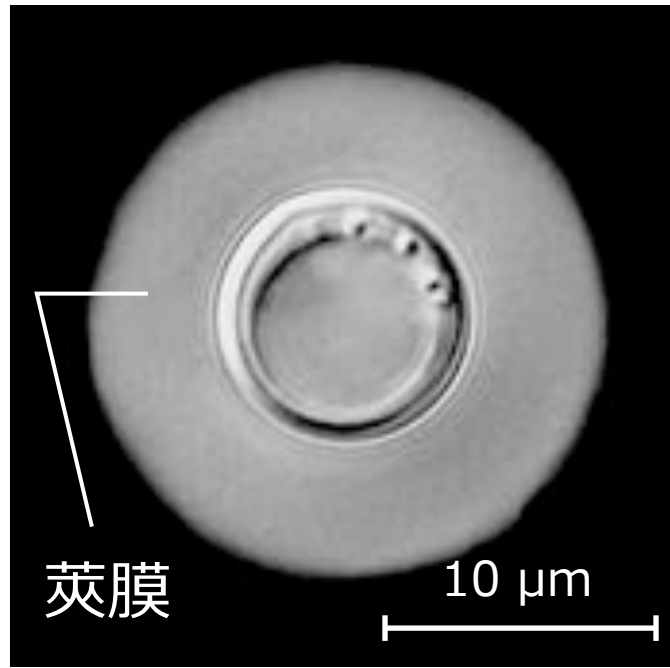
ヒト間の伝播: 報告されていない

感染症法: 5類感染症 播種性クリプトコックス症

年間報告数: 120-182 2014-2020年 発生動向調査
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10410-report-ja2020-30.html>

実験室のBSL: 基本実験室 (BSL2)

有莢膜酵母



墨汁法による莢膜の観察

ムコイド型集落



YM寒天培地, 25°C 7日間

クリプトコックス症の診断に有効な4つの検査:

培養検査, 病理検査, 莢膜抗原検査, 遺伝子検査

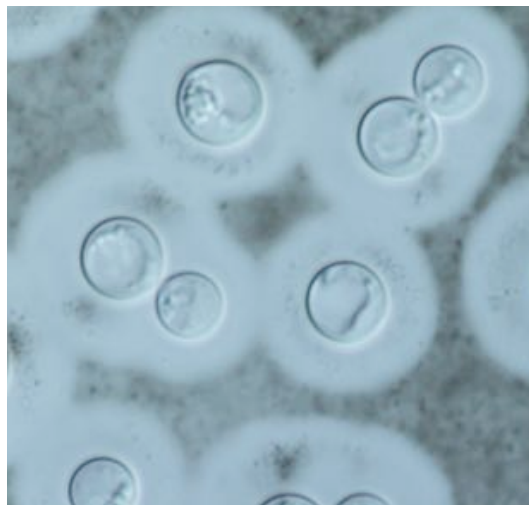
病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

汎用培地

1. サブロー寒天培地 (含む抗生物質) など富栄養培地 *分離培養用
2. カナバニン-グリシン-ブロモチモールブルー (CGB)培地 *Cg判別

C. gattii R265

Low conc.

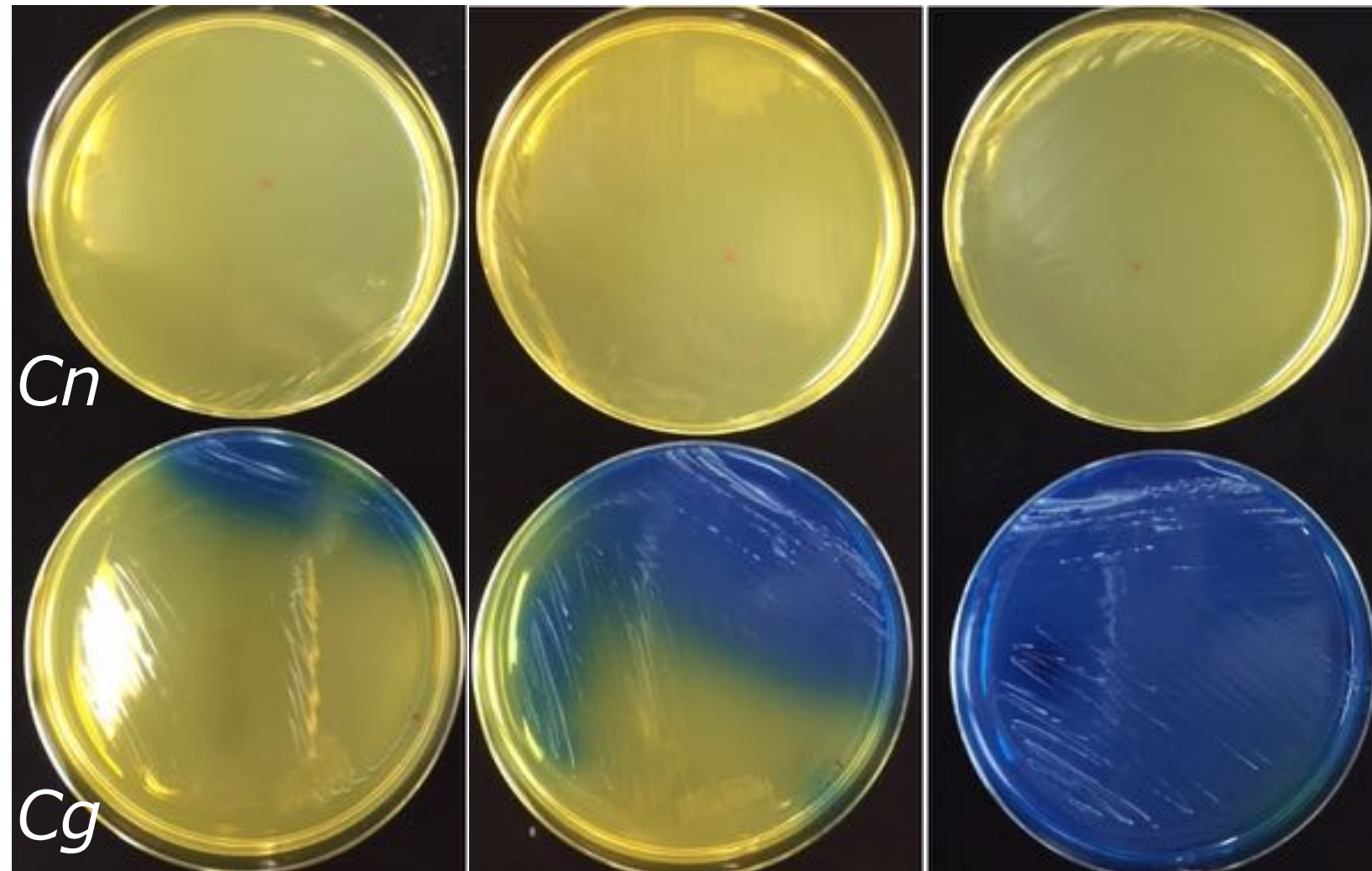


High conc.



墨汁法

CGB agar, 25-30°C



24 h

48 h

72 h

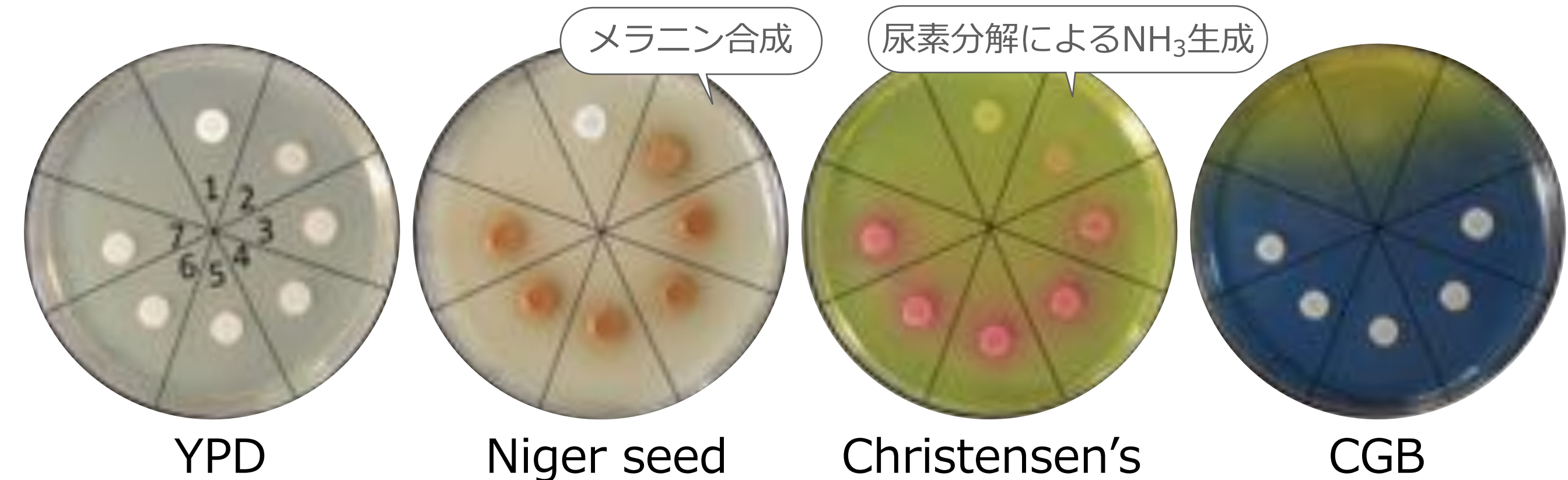
クリプトコックス症の診断に有効な4つの検査:

培養検査, 病理検査, 莢膜抗原検査, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

その他の生物活性試験

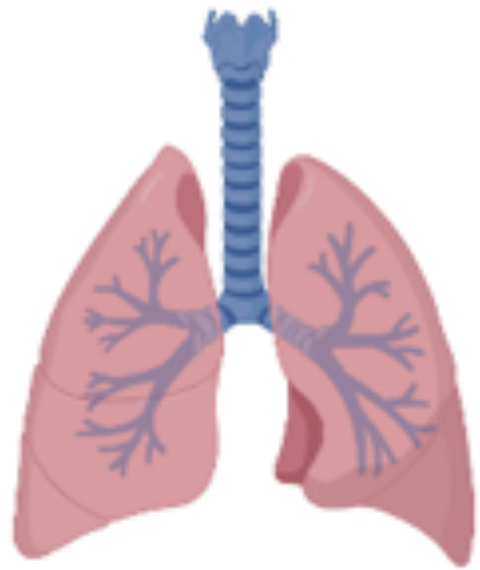
1. フェノールオキシダーゼ試験 **Candida* sp.は陰性
Caffeic acid agar, *Bird seed agar*, *Niger seed agar*, *L-DOPA agar*
2. ウレアーゼ試験 *子嚢菌は陰性, 担子菌は陽性
Christensen's agar, *Stuart's broth*



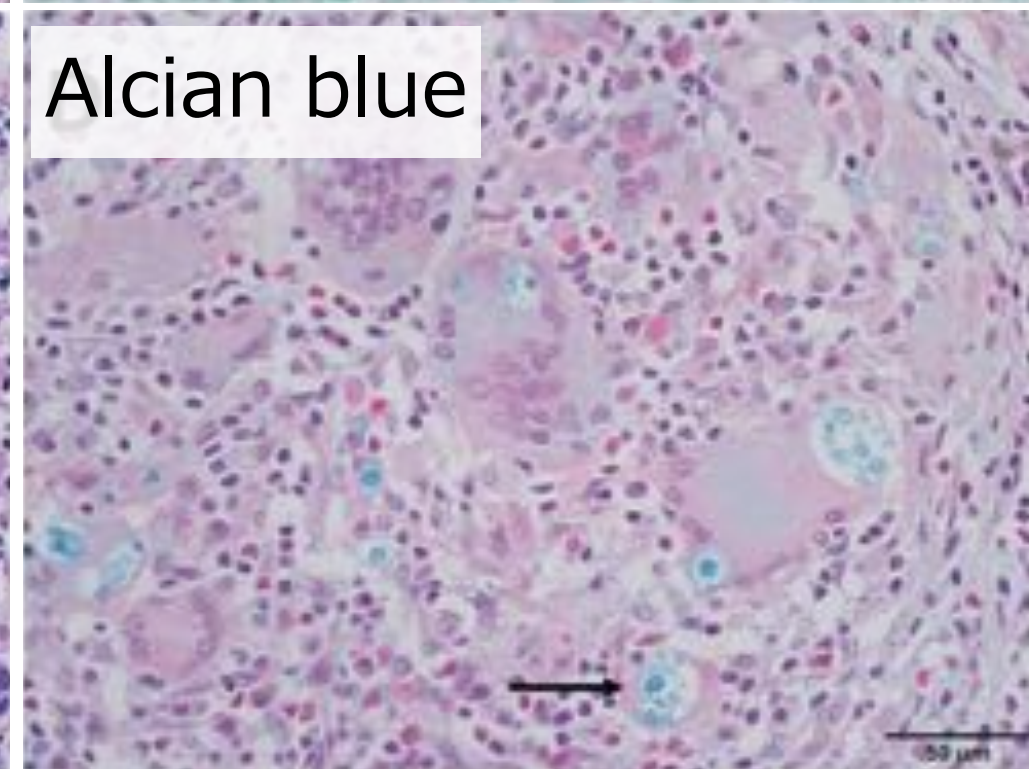
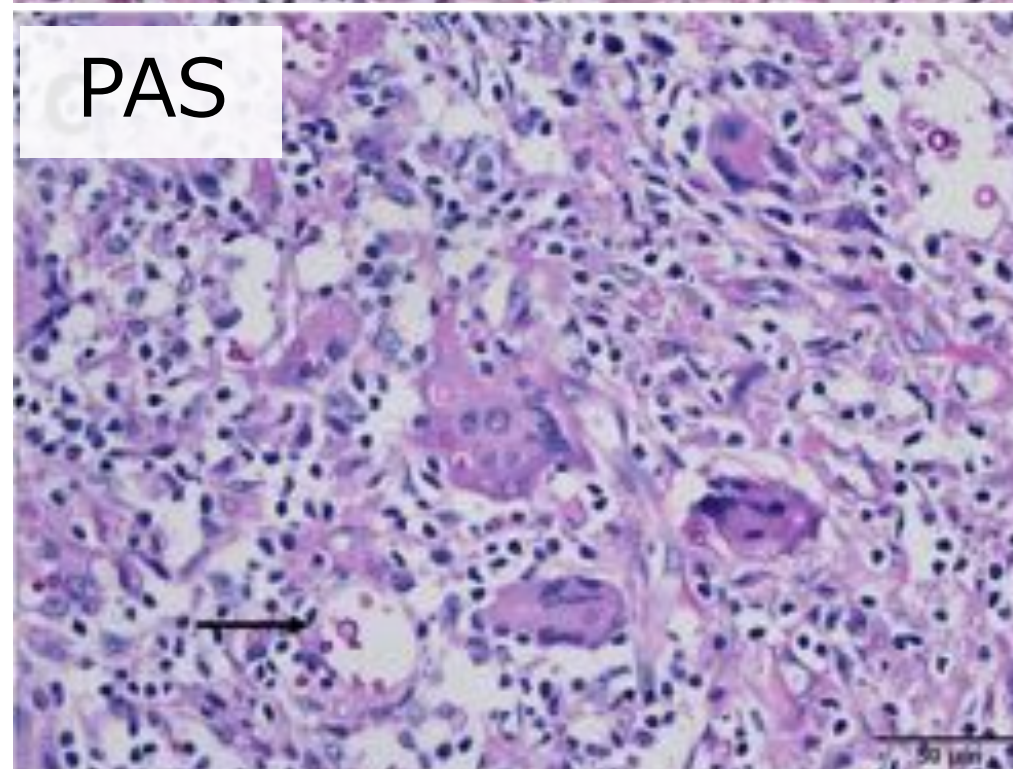
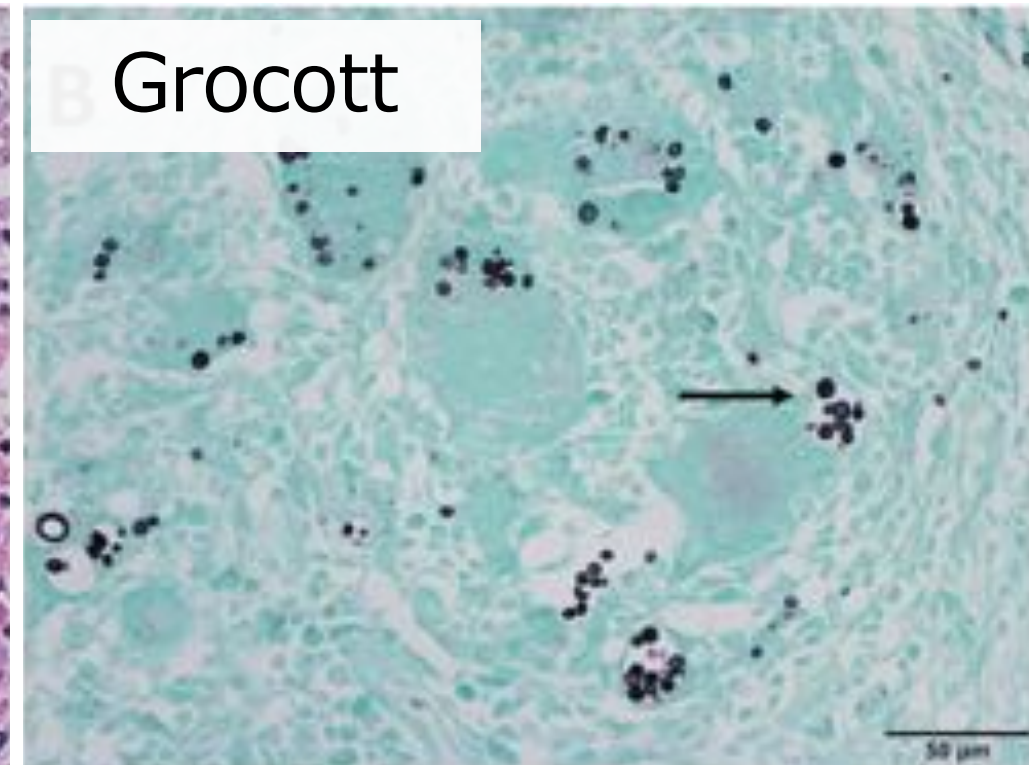
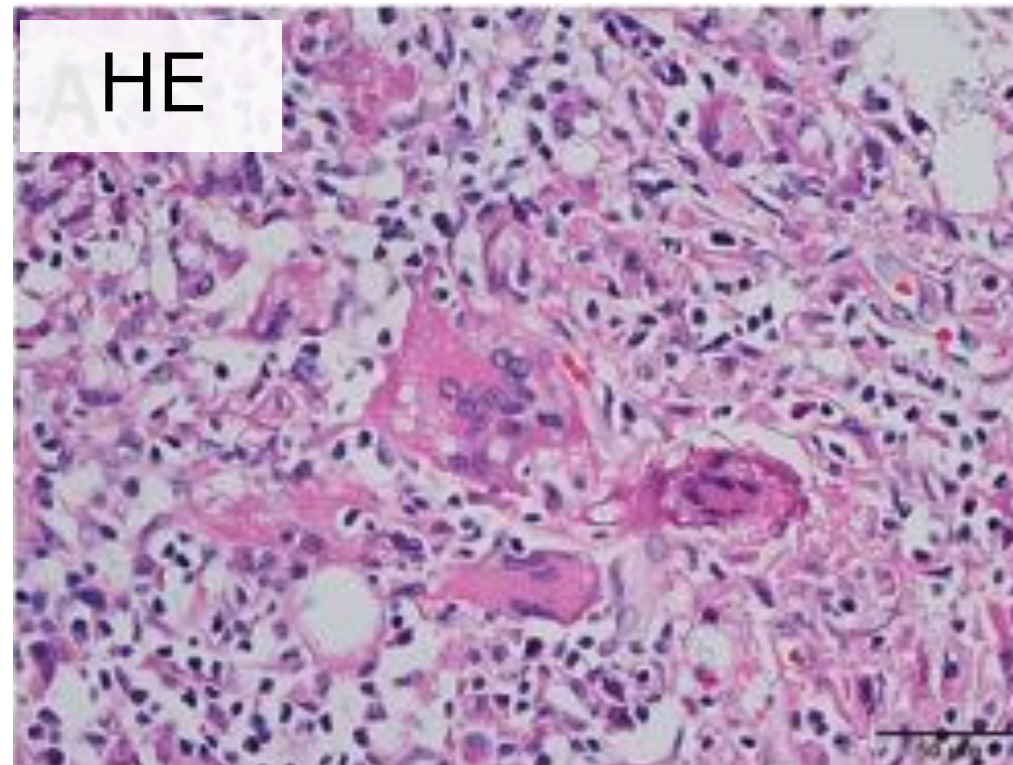
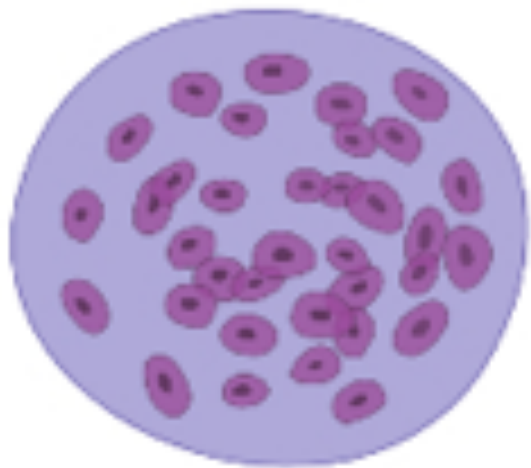
クリプトコックス症の診断に有効な4つの検査: 培養検査, **病理検査**, 莢膜抗原検査, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

Lung

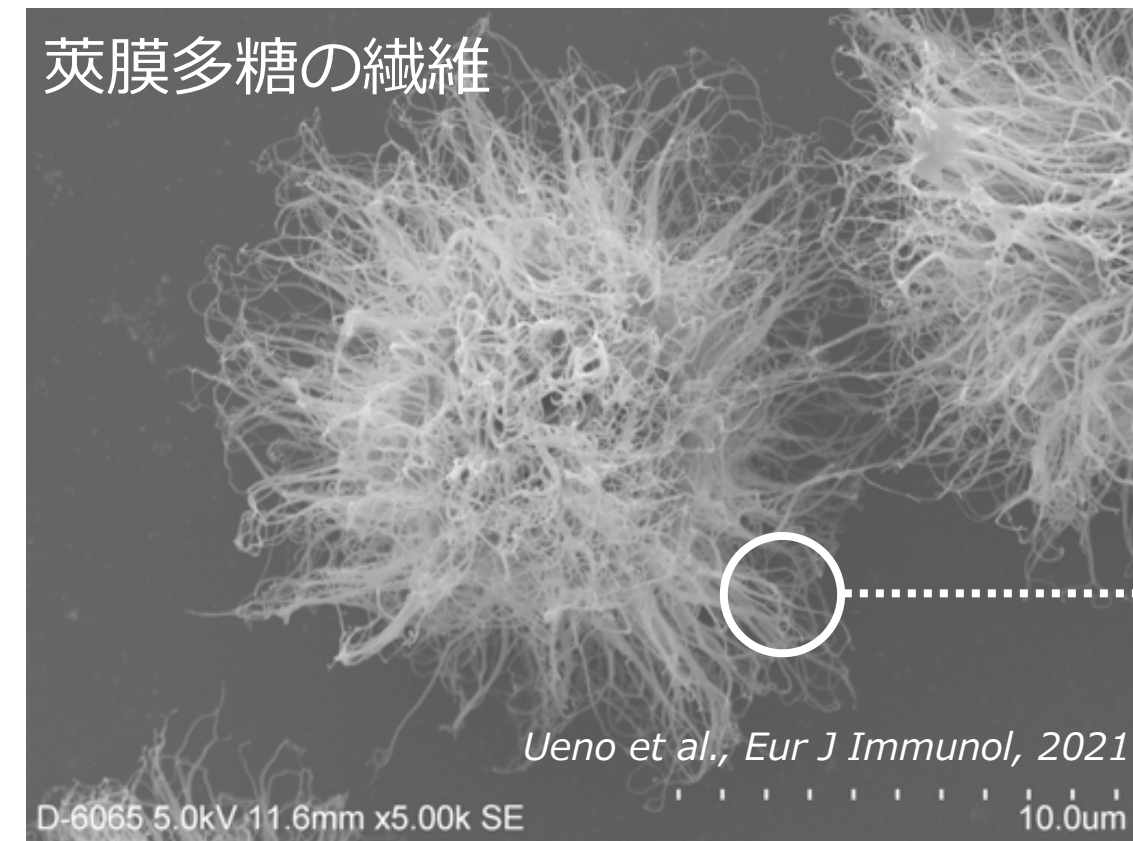


Giant cells

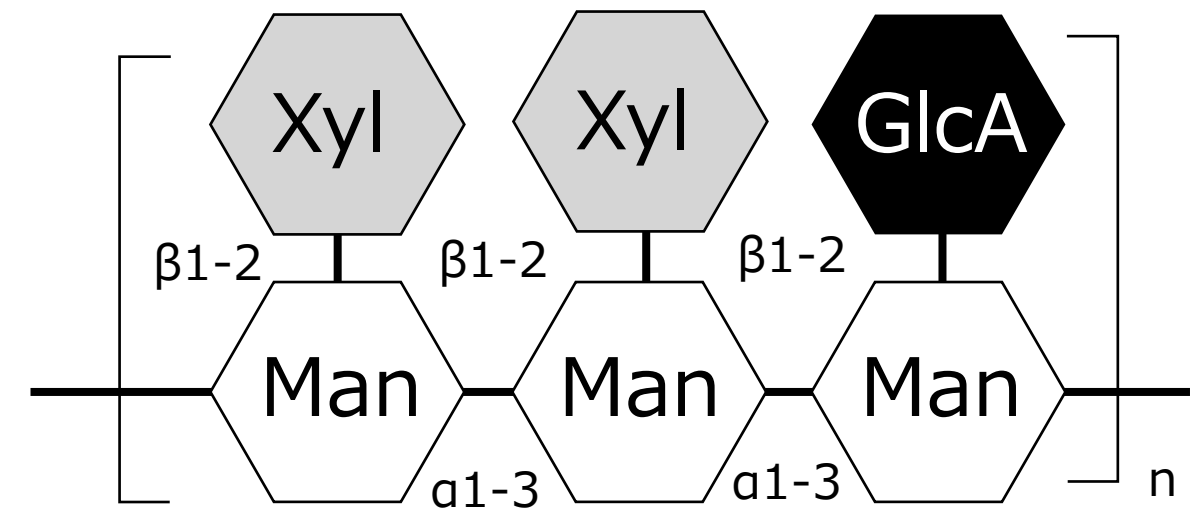


クリプトコックス症の診断に有効な4つの検査: 培養検査, 病理検査, 莢膜抗原検査, 遺伝子検査

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>



グルクロノキシロマンナン (GXM)



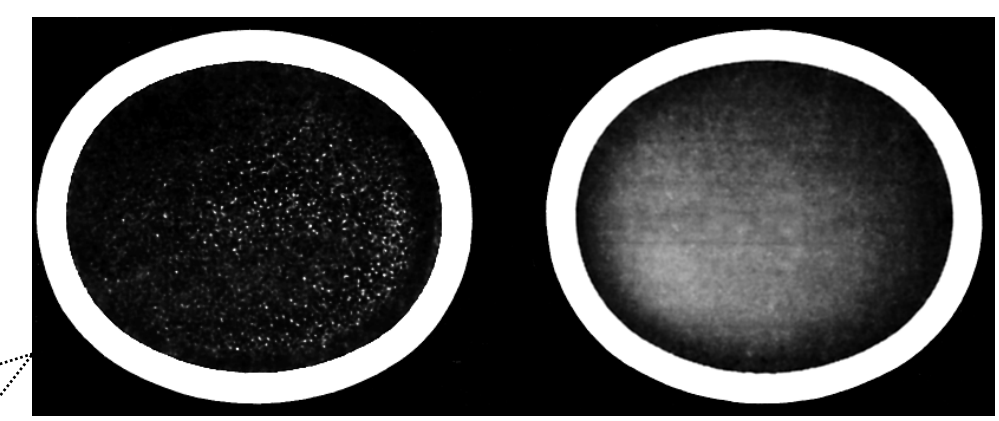
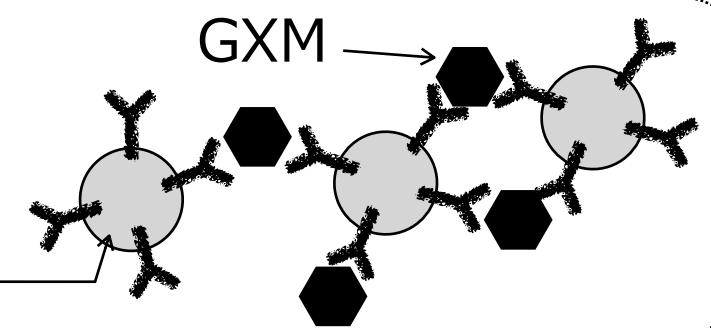
* *Trichosporon* spp. もGXM様糖鎖を持つ

ラテックス凝集法による血清・脳脊髄液の検査

- セロダイレクト® 栄研クリプトコックス
- パストレックス® クリプトプラス

抗GXM抗体結合型ラテックスが
GXMを介して凝集する。

抗体結合型ラテックス



ビーズ凝集
陽性

ビーズ分散
陰性

クリプトコックス症の診断に有効な4つの検査: 培養検査, 病理検査, 莢膜抗原検査, **遺伝子検査**

病原体検出マニュアル: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

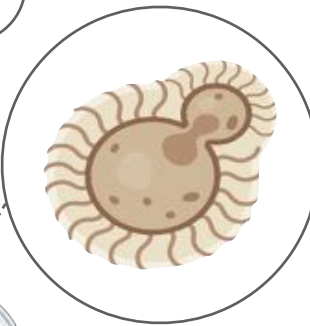
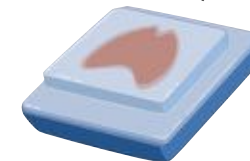
検体毎に工夫するDNA抽出法

1. Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Kit
2. Qiagen, QIAamp DNA FFPE Tissue kit
3. Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit

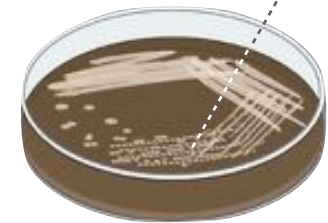
生検検体



組織ブロック



培養後の菌株



PCRによるDNAの増幅と塩基配列の解析

- 真菌特異的rRNA遺伝子; ITS-D1/D2領域, IGS領域

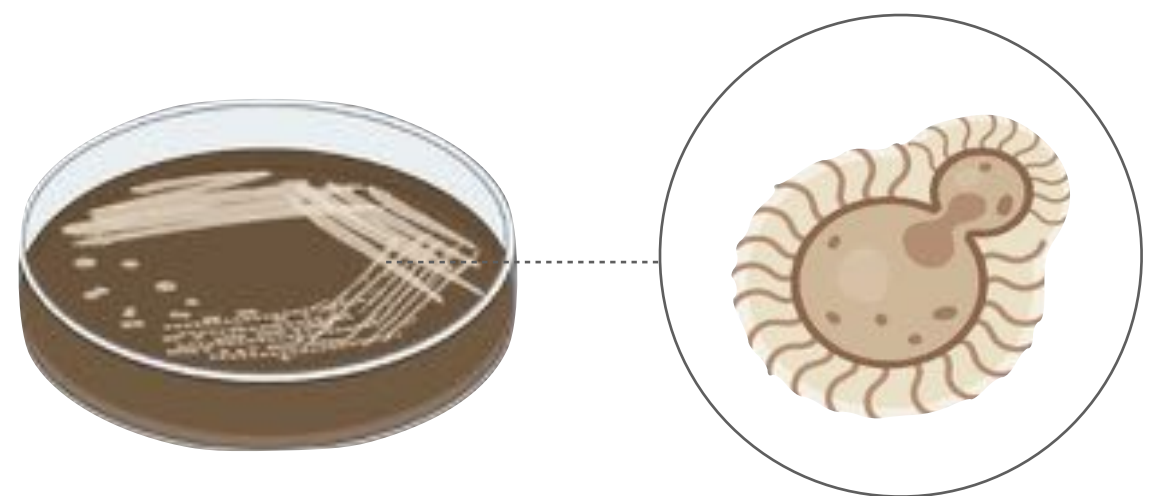


まとめ

- 感染症法上、届出が必要な真菌症は、**コクシジオイデス症**と**播種性クリプトコックス症**である。
- コクシジオイデス症の培養検査はBSL3で実施する。その他の検査はBSL2で実施可能である。渡航歴の聴取も重要である。
- クリプトコックス症の検査は、BSL2で実施可能である。無菌的臨床検体（血液や脳脊髄液など）から抗原や菌体が検出された場合に、播種性クリプトコックス症の基準を満たす。渡航歴や鳥類等接触歴の聴取も重要である。



Coccidioides spp.



Cryptococcus spp.