

病原体検出マニュアル

コクシジオイデス症  
(Coccidioidomycosis)

2023 年 1 月  
version 3

## 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) 病理組織学的検査
    - イ) 抗原検出法
    - ウ) 抗体検出法
    - エ) 遺伝子検査
4. 感染症法における届出基準
5. 参考文献・情報
6. 執筆者
7. 連絡先

## 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真菌による感染症であり、原因真菌として *Coccidioides immitis*、*Coccidioides posadasii* の2つの菌種が知られている<sup>1)</sup>。 *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名が付与された<sup>2)</sup>。この両者は遺伝学的に若干異なる菌種であることが確認されているが、ヒトに対する病原性に大きな差はなく、これらコクシジオイデス属菌は地球上でもっとも病原性の強い真菌と考えられている。このため、コクシジオイデス属菌の不用意な培養は、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<sup>3)</sup>、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<sup>1)</sup>。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、コクシジオイデス症の発生は上記の地域にほぼ限定される<sup>4)</sup>。わが国では、1999年4月～2019年11月までに51例が報告されているが<sup>5)</sup>、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いる<sup>6)</sup>。コクシジオイデス属菌はわが国には生息せず、市井での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もっとも重要な情報となる。コクシジオイデス症は、感染症法四類感染症であり、*C. immitis* のみが三種病原体に指定されているが、バイオセーフティや危機管理の観点から *C. posadasii* も *C. immitis* 同様の扱いを行う。

コクシジオイデス属菌は二形性真菌であり、おもに上記流行地域の乾燥した土壌に生息する。土壌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<sup>1)</sup>。コクシジオイデス属菌のヒトへの感染は、土壌から空气中に舞い上げられた分生子 (孢子) を吸入することが契機となる<sup>1)</sup>。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<sup>1)</sup>、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<sup>3)</sup>、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、健常者に発病する市井感染症であるが、一般的な感染症と同様に免疫不全者では重篤化する。本症の危険因子として、AIDS、固形臓器移植、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<sup>1)</sup>、また人種間での差もあり、有色人種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、重症例ではリポソーマルアムホテリシン B (L-AMB) も使用される<sup>3, 4)</sup>。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が推奨されている。<sup>3, 4)</sup>

\*国内発生病例 (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、飛散した分生子を吸入することにより感染し発症に至るが、いずれも BSL3 に分類され、感染力がきわめて強くごく微量の分生子への曝露によって感染が成立することが示唆されている<sup>7)</sup>。また、検査に従事する臨床検査技師や研究者が作業中に感染する事故（実験室内感染）が起きており、死亡例も報告されている<sup>8)</sup>。このような実験室内感染の発生リスクは、コクシジオイデス症の発生が少ない地域（非流行国）で増大することが考えられ、我が国でもコクシジオイデス症を安全に検査できる機関は限られている。なお、コクシジオイデス症の可能性が疑われた場合は、下記の専門機関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のヒト-ヒト感染はなく、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ないと考えてよく、国内での感染機会は検査室等に限定される。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

千葉市中央区亥鼻 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菌は、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、本菌の取り扱い経験がない臨床検査室での培養検査は慎重な検討を推奨する。また、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菌の分離培養の可能性がある場合には、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培養後の対応などについて相談することを推奨する。

コクシジオイデス属菌は、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の取り扱いが可能である。しかし、一旦、培地上で発育したコクシジオイデス属菌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菌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、かきとり標本を製作する（図 2）。以上の操作は、BSL3 実験室安全キャビネット内に設置したパスボックス付グローブボックス（図 3）内にて行う。
- 遺伝子抽出 顕微鏡観察と同様の手順で、PBS（0.01% Tween80 含）をゆっくりと注入し、懸濁後に煮沸処理する（詳細は下記遺伝子検査の項参照）。

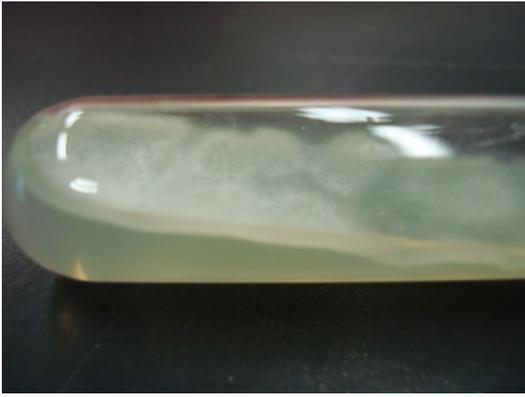


図1 寒天培地上 (potato dextrose agar) に発育したコクシジオイデス属菌

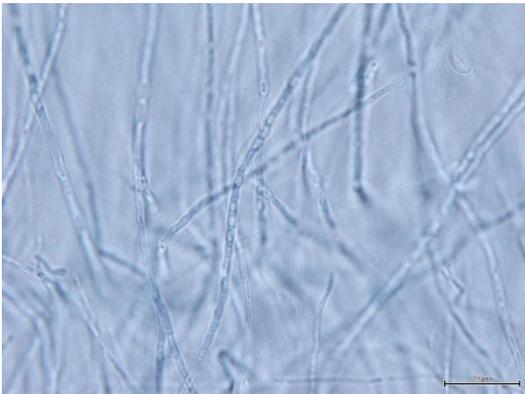


図2 菌糸と分節型分生子 (×1,000)



パスボックス

図3 パスボックス付グローブボックス

上記の検査手順は、検査従事者が菌に曝露される危険性が高いため、現実的には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し行政検査となる。

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属菌の可能性のある真菌が発育した場合は、衝撃で分生子を飛散させないようにシャーレ蓋側面に伸縮性のある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（参考：感染性物質の輸送規制に関するガイダンス 2013-2014（WHO）国立感染症研究所日本語訳 [https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/who/WHOguidance\\_transport13-14.pdf](https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/who/WHOguidance_transport13-14.pdf)）。なお、臨床検体の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* も同様に扱う) 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

[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/kekaku-kansenshou17/03.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/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 (BALF)、肺生検標本、経皮的肺穿刺、皮膚病変などの検体をポテトデキストロース寒天培地に塗布し、25°Cで培養する。寒天培地は通常のシャーレでは無く、フィルターキャップ付きの斜面培地 (図4) もしくはフラスコ容器 (図5) に作製する。なお、細菌の生育を抑制するクロラムフェニコールを 100 µg/ml の濃度で添加してもよい。

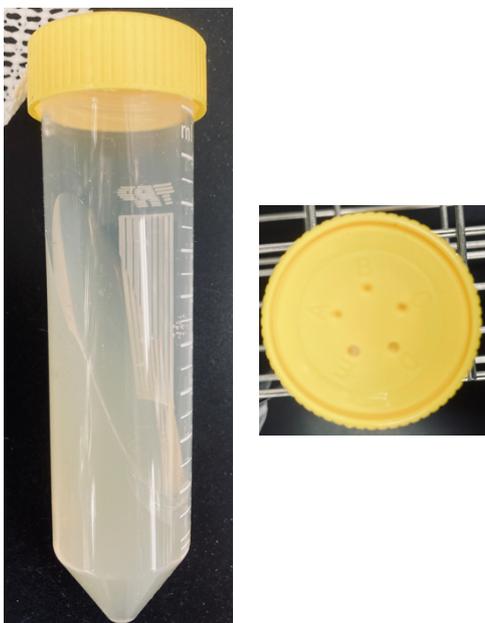


図4 フィルターキャップ (右) 付き  
50 mL チューブに作製した斜面培地



図5 フラスコ容器に作製した寒天培地

#### 2) 同定法

##### ア 病理組織学的検査

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 (Papanicolaou 染色、PAS 染色、Grocott 染色など)。

組織内でコクシジオイデス属菌は、内生胞子を内蔵した球状体、および球状体から放出された内生胞子、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 Grocott 染色を推奨する。

##### イ 抗原検出法

2002 年 12 月現在、抗原検出キットは市販されていない。

##### ウ 抗体検出法

米国 IMMY 社などから Enzyme Immuno Assay や Lateral Flow Assay による抗体検出キットが市販されている。

##### エ 遺伝子検査

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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。

#### 【実際の手順】

■核酸抽出：培養菌の場合、BSL3 実験室のグローブボックス内で、菌が生育した斜面培地に PBS (0.01% Tween80 含) をシリンジで注入・懸濁後、菌懸濁液を 2mL スクリューキャップ付チューブに分注する。チューブ外面およびグローブボックス内を次亜塩素酸および 70%エタノールにより消毒後、パスボックスを経由してチューブを取り出し、100°C、5 分間処理により DNA を抽出する。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。

■PCR: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、rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit) を増幅するプライマー (図 6・表 1) およびコクシジオイデス特異的プライマー (表 1) にて PCR を行う。

#### <PCR 反応手順>

- ・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。

#### <PCR 産物の確認・コンタミネーションの予防>

- ・1.5% agarose gel で泳動し、増幅産物の有無、大きさを確認する。
- ・キャリア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。
- ・試薬調製、検体処理、泳動などは物理的に隔絶された場所で実施する。
- ・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。専用のマイクロピペット・チューブラックを用いる。
- ・陽性対照で増幅が確認され、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。

■塩基配列解析：PCR で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である GenBank

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および MycoBank (<https://www.mycobank.org>) の配列データを利用し、99%以上の塩基一致率を基準として、菌種を同定する。なお、比較配列データ（参照配列）は CBS、もしくは ATCC の基準株とする。99%以上の一致率が得られない場合、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。

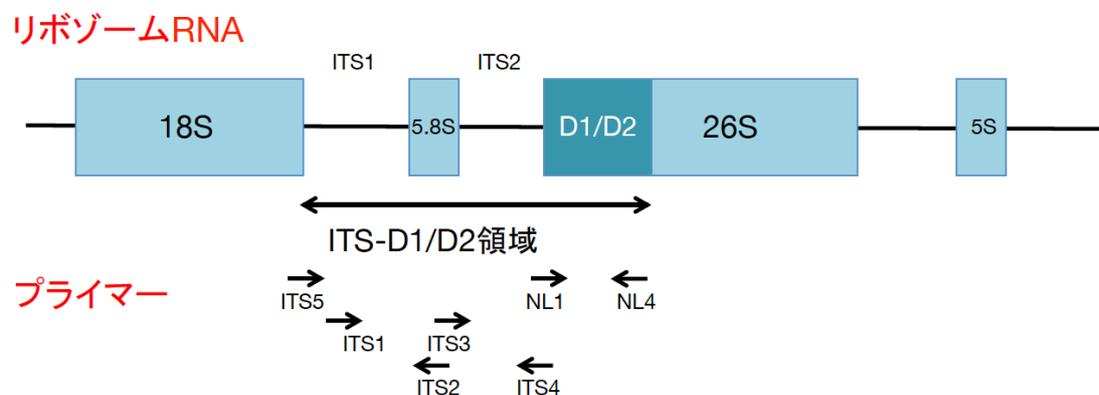


図6 同定に用いる rRNA 領域

表1 同定に用いるプライマー配列

ITS-D1/D2 領域を増幅するプライマー

ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG

ITS-D1/D2 領域の塩基配列解析用プライマー（上記以外）

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC

ITS3: GCATCGATGAAGAACGCAGC

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA

コキシジオイデス特異的プライマー

Coi9-1F : TACGGTGTAATCCCGATACA

Coi9-1R : GGTCTGAATGATCTGACGCA

#### 4. 感染症法における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こり、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・情報

- 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) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2014. p224-226. 協和企画（東京）、2014
- 5) 厚生労働省 感染症発生動向調査.
- 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

Version 3 (2023年)

国立感染症研究所 真菌部

梅山 隆、上野圭吾、名木 稔、星野泰隆、篠原孝幸、阿部雅広、宮崎義継

東京都健康安全研究センター

千葉隆司、上原さとみ

Version 2 (2020年)

国立感染症研究所 真菌部

梅山 隆、名木 稔、星野泰隆、阿部雅広、宮崎義継

埼玉医科大学総合医療センター感染症科・感染制御科

大野秀明

Version 1 (2013年)

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

電子メール: [shinkin-kensa@nih.go.jp](mailto:shinkin-kensa@nih.go.jp)