

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究
分担研究報告書

バイオテロの可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部
研究協力者 田辺公一、梅山 隆 国立感染症研究所 真菌部第一室

研究要旨：バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養をしない検査技術が必要とされる。本研究では、喀痰などの臨床検体からヒストプラズマなどの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を開発し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とした。本研究では、BSL 真菌の安全な取扱法について検討した。また、コクシジオイデスゲノム DNA・ヒストプラズマゲノム DNA の検出のための様々な増幅法を検討・開発した。

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植、抗癌剤治療などの免疫不全患者のみでみられる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症などは健常者に起こることが知られており、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が増してきた。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス (*Coccidioides immitis*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma capsulatum*)、BSL2 に分

類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 等が想定される。いずれの真菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染まで進行すると致死率は極めて高くなるが、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海外の流行地への渡航歴のないヒストプラズマ、クリプトコックス・ガッティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。また、コクシジオイデス属、ヒストプラズマ属については、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養は飛散孢子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全かつ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立つことを目的とする。

B. 研究方法

平板培地で培養されたヒストプラズマ属およびコクシジオイデス属は大量の分生子（胞子を）産生し、わずかな振動や気流によって胞子を飛散させる。したがって気流が発生している安全キャビネット内で実験操作は多大な危険を伴う。そこで、安全キャビネット内に小型のグローブボックスを操作し平板培地で発育した菌を取り扱った。菌の不活化は 100%エタノールを用い、グローブボックスはホルマリン燻蒸によって消毒を行った。

検出法の検討に用いたコクシジオイデスゲノム DNA は、千葉大学真菌医学研究センターから分与された菌株から抽出した DNA を用いた。ヒストプラズマゲノム DNA は感染研 BSL3 施設で過去に臨床検体から分離した *Histoplasma capsulatum* より抽出した DNA サンプルを用いた。

Realtime PCR の標的は、ヒストプラズマ DNA については、M 抗原遺伝子および、100kDa タンパク質遺伝子の内部に Taqman probe を設計し、コクシジオイデス DNA については、Coi9-1 領域に LUX プライマーを設計し、それぞれ検出を試みた。Realtime PCR については SYBERgreen を用いたインターカレーター法と Taqman probe 法の双方を検討した。Realtime PCR は 2step (95 5 秒、60 30 秒) を 40 サイクル行った。PCR 反応の特異性については形態の類似する複数の菌種の DNA を用いて検証を行った。

コクシジオイデス検出のための LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の標的配列として、以前開発したコクシジ

オイデス特異的 PCR の標的である Coi9-1 領域を用いた。ヒストプラズマの標的配列として、M 抗原遺伝子を用いた。4 種類の LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) を利用して数組設計した。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キットおよび検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200 μ l PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63 で反応を行った。検討に用いた *C. immitis*、*Coccidioides posadasii* および *H. capsulatum* の DNA は臨床分離株から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 のゲノム DNA を用いた。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

C. 研究結果

1) 平板培地で培養された BSL3 の不活化と DNA 抽出方法

小型のグローブボックスを安全キャビネット内に設置し、その中で実験操作を行った。プラスチックの使い捨て白金耳の先端を PBS(0.01% Tween 80)に浸し、寒天培地上で発育したコロニーから最小限の実験操作で胞子を釣菌し、斜面培地に接種し、30 での分離培養を行った。

6-7 日後、斜面培地で発育した菌の不活化を行った。シリコン栓より注射針を用いて 70%エタノールを栓付近まで注入し、2 日間室温で放置した。その後、安全キャビネット内で斜面培地より菌体を剃刀で切除し DNA 抽

出に供した。いずれの操作手順においてもグローブボックス内にはある程度孢子が飛散することが予想されたため、ボックス内でホルマリンの入った容器を開放し、燻蒸によって消毒を行った。

以上の実験手法は何度かシミュレート操作を行い検討を重ねたうえで現時点での最善の実験手法であると判断した。

2) nested PCR による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出感度の検討

10ng から順次希釈した *H. capsulatum* DNA を鋳型とし、M 抗原遺伝子を標的とした nested PCR を行った。目的領域の増幅はアガロースゲル電気泳動にて確認し、増幅断片の塩基配列を決定し、非特異的増幅ではないことを確認した。

アガロースゲル電気泳動において、1fg まで遺伝子の増幅を確認できた。また、陰性コントロールとして、*Aspergillus*、*Candida*、*Cryptococcus*、*Trichosporon*、*Penicillium* などの真菌から調製したゲノム DNA を用いて第一段階 PCR を行ったが、増幅は認められなかった。

3) インターカレーター法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子について nested PCR で感度・特異性ともに良好な成績の認められた領域と、ソフトウェア (PrimerExpress) が選抜した領域についてプライマーをデザインした。リアルタイム PCR については、SYBR Premix Extaq (TAKARA) を用い、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子および 100kDa タンパク質 遺伝子について、いずれも 10 pg のゲノム DNA を検出することができた。

4) Taqman probe 法による *Histoplasma capsulatum* genome DNA 検出

インターカレーター法で標的とした増幅領域の中央付近に Taqman probe を設定し、TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) を用いて実験を行った。Taqman probe を用いることで感度の向上が期待されたが、予想とは反対に、M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子ともに 1 ng のゲノム DNA が検出限界であった。

5) Taqman probe および LUX プライマーによるヒストプラズマおよびコクシジオイデス DNA の検出

ヒストプラズマ属について M 抗原遺伝子および 100 kDa タンパク質遺伝子の適切な領域に Taqman probe (VIC-TAMRA) を設計し、Mx3000P QPCR System (Agilent technologies) を用いて蛍光定量を行った。その結果、M 抗原遺伝子に関してはこの実験系は機能しなかったが、100kDa タンパク質遺伝子については、1 ng のゲノム DNA を検出することができた。

LUX プライマーによる realtime PCR も上記と同様の実験系で蛍光定量 (蛍光色素 : FAM) を行った。こちらの PCR についてはコクシジオイデスゲノム DNA の調製が完了しなかったため、当部で保存してあった濃度不明のコクシジオイデス DNA を用いて検証を行ったが、過去の報告通り LUX プライマーによる DNA の検出が可能であった。

上記、2 種類の realtime PCR は蛍光色素の検出波長が異なるために、混合して使用することが理論上可能である。二種類のプローブを混合して PCR を行ったが、双方の蛍光検出結果に互いに全く影響がないことを確認できた。また、白色の糸状菌であり、形態的にコクシジオイデス属やヒストプラズマ属と判別

が困難である、*Pseudallescheria boydii*、*Schizophyllum commune*、*Penicillium griseofulvum* のゲノム DNA を用いて実験を行い、目的の菌以外のゲノム DNA では蛍光が検出されないことを確認することができた。

6) コクシジオイデス LAMP 法の開発

まず、3 組の LAMP プライマーセット A, B, C を設計し、10 ng の *C. immitis* および *C. posadasii* のゲノム DNA に対して LAMP 反応を行った (図 1)。

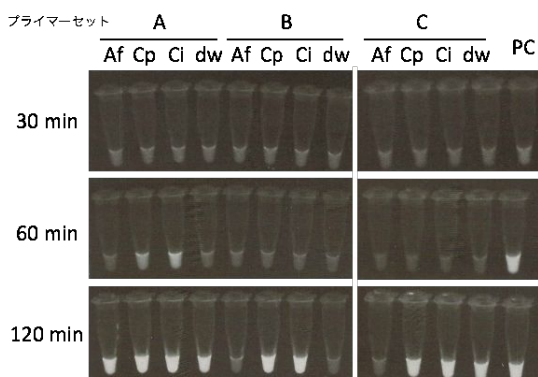


図 1. コクシジオイデス属 LAMP プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

プライマーセット A では、1 時間で検出できたが、2 時間では陰性コントロールでも偽陽性として検出された。プライマーセット B では 1 時間では検出できなかったが、2 時間後に陽性サンプルのみ検出できた。プライマーセット C では、1 時間では検出できず、2 時間後に検出された。水のみ陰性コントロールにおいて検出されているが、アスペルギルス DNA の陰性コントロールでは検出されていないことから、注意して操作したにもかかわらず、微量の DNA のコンタミが原因と考えられる。

次に、プライマーセット B および C について検出感度を上げるために、loop プライマー

の検討を行った。それぞれのプライマーセットについて 2 組ずつ loop プライマーを設計し (B-L1, B-L2, C-L1, C-L2) LAMP 反応を行った (図 2)。

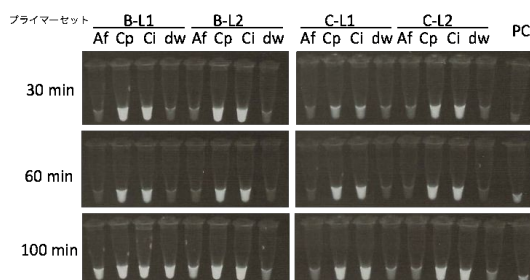


図 2. コクシジオイデス属 loop プライマーの検討 Af: *Aspergillus fumigatus*, Cp: *Coccidioides posadasii*, Ci: *Coccidioides immitis*, dw: distilled water, PC: キット添付の陽性コントロール

全ての LAMP-loop プライマーの組み合わせについて 30 分で検出可能であった。B-L1 および B-L2 では 100 分後に陰性コントロールでも検出されてしまったことから、C-L1 および C-L2 プライマーセットが今回検討した中で最適なものであるとして、今後の検討に用いることにした。

次に、検出限界の検討を行った。C. posadasii のゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、C-L1 および C-L2 プライマーセットを用いて LAMP 反応を行った。ゲノムサイズを 30 Mb で換算すると、どちらのプライマーセットでも 100 fg、30 コピーまで検出が可能であった。

7) ヒストプラスマ属 LAMP 法の開発

上記の戦略に従って、M 抗原遺伝子を標的としたヒストプラスマ DNA に対する LAMP 法の開発を行った。4 組の LAMP-loop プライマーセットを設計し、そのうち 1 組だけが、5 種類の臨床分離 *H. capsulatum* DNA を検出する

ことが出来た (図 3)

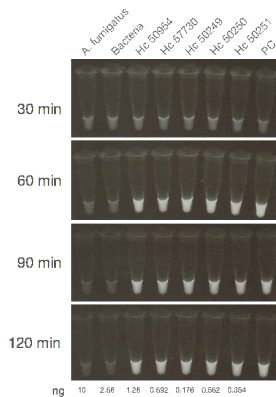


図 3 ヒストプラスマ属 LAMP 法の検討

PC: キット添付の陽性コントロール

D. 考察

ヒストプラスマ属やコクシジオイデス属がテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうか予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

今回検討した培養された菌の取り扱い方法によって、いずれの検査施設でも安全に菌を分離培養することが可能となり、仮に感染者が増加した場合、各検査施設においても菌の取り扱い・同定が可能になるものと期待される。

Nested PCR による *Histoplasma* DNA の検出感度は非常に高く、計算上 1fg のゲノム DNA が含まれるサンプルにおいてもバンドが観察された。しかしながら、ゲノムサイズから換算すると 1 細胞に含まれるゲノム DNA は約 40 fg であり、M 抗原遺伝子は遺伝子上に 1 コピーしかない。したがって、今回の検討での検出感度の算出は正確ではなく、ストック DNA の濃度の測定が正確でないかあるいは希釈系列の作製が正確にできていなかった可能性が考えられる。いずれにせよ、nested PCR の感度は非常に高く、現時点では環境サンプルな

どのごく微量の *Histoplasma* 属真菌が含まれるサンプルにおける最も有力な遺伝子検出法であると考えられた。

Nested PCR は感度が高い一方で、操作が煩雑であり、第一段階 PCR 産物のコンタミによる擬陽性の問題点がある。この問題点を克服するために、二種類のリアルタイム PCR 実験系の構築を試みた。

インターカレーター法では 10ng の *Histoplasma* DNA まで検出することができたが、nested PCR と比較すると感度において劣っていた。Taqman probe を用いたリアルタイム PCR においては特異性が上昇することから、非特異的な反応が抑制されることで若干の感度の向上が期待されたが、むしろインターカレーター法よりも感度が低いという結果になった。いずれのリアルタイム PCR 法においても PCR のサイクルは 40 サイクルのみであり、80 サイクル反応を行う nested PCR に匹敵する感度を実現することは困難なのかもしれない。

ただし、近年の遺伝子解析手法の進歩は著しく、PCR に関しては好感度の DNA ポリメラーゼやキットが次々と開発されている。最新の遺伝子解析技術情報を参考にしながら、実験系の改良を続けていけば、高い感度と特異性をもち、なおかつ粗精製サンプルからでも遺伝子の検出が可能な実験系の構築が可能になると期待される。

本研究で確立した realtime PCR 実験系ではヒストプラスマかコクシジオイデスカを特異的かつ迅速簡便に同定することが可能である。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、臨床検体をもちいてこの realtime PCR が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後実験系の改良を進めていきたい。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が強く、検査実施機関によって結果が異なることも多い。LAMP 法は反応系は非常に簡素で、反応温度が定温であるため、サーマルサイクラーの性能に依存しないという利点がある。しかも、1 時間で微量 DNA を検出することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればコクシジオイデスおよびヒストプラスマを迅速簡便に検出できる。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後実験系の改良を進めていきたい。

E. 結論

胞子を飛散させやすい BSL3 真菌の取り扱い方法の検討を行った。

マルチプレックス Realtime PCR によるヒストプラスマ属とコクシジオイデス属の迅速診断系を確立した。

LAMP 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラスマ属の迅速診断系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol.* 50:412-416, 2012.

2. Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* , 2012.
3. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol.* 50:631-636, 2012.
4. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis.* 2013, 66(1):51-5.
5. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol.* 51:252-260, 2013.
6. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto

Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis. 66:216-221, 2013.

7. Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. Mediators Inflamm. 2013:465319, 2013.
8. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother. 19:999-1003, 2013.

和文論文

1. 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. 感染症. 42:172-175, 2012.
2. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例. 日本呼吸器学会雑誌. 2:274-278, 2013.
3. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.
4. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断. 臨床神経学.

53:1191-1193, 2013.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
4. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.

国内学会

1. 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された

- Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)
2. 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011 (10 月)
 3. 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 標準化 MLST 解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 4. 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 5. 田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011 (10 月)
 6. 大野秀明、田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第 32 回研究会、東京、2011 (6 月)
 7. 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011 (6 月)
 8. 徳山承明、眞木二葉、竹村 弘、高木妙子、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、亀井克彦、長谷川泰弘. 日本人 AIDS 患者に発症したマルネツフェイ型ペニシリウム症の一例. 第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)
 9. 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第 32 回関東医真菌懇話会、東京、2011 (5 月)
 10. 梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、渡邊 浩、宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例からの分離株の MLST 法による疫学的検討. 第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)
 11. 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011 (4 月)
 12. 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、大久保陽一郎、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、渋谷和俊、亀井克彦、宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日、2012 年、長崎.
 13. 渋谷和俊、大久保陽一郎、大野秀明、宮崎義継、田辺公一、金子幸弘、山越 智、梅山 隆、安藤常浩、若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病

- 理組織学的解析. 第86回日本感染症学会
総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012
年, 長崎.
14. 泉川公一, 三原 智, 森永芳智, 中村茂
樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋 弘, 山
本善裕, 柳原克紀, 梅山 隆, 大野秀明,
宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. 長崎大
学病院における *Cryptococcus* の
Multilocus Sequence Typing を用いた分
子疫学調査. 第52回日本呼吸器学会学術
講演会. 4月20-22日, 2012年, 神戸.
15. 宮崎義継. 気管支鏡検査 (TBLB および
BAL) にて診断された肺コクシジオイデス
症の一例. 第61回日本感染症学会東日本
地方回学術集会/第58回日本化学療法学
会東日本支部総会/第95回日本細菌学会
関東支部総会. 10月10-12日, 2012年,
東京.
16. 木村雅友, 大野秀明, 梅山 隆, 宮崎義
継. アスペルギルスとクリプトコックス
による肺混合感染の2手術例. 第56回日
本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11
日, 2012年, 東京.
17. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮
崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文,
笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳
代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆,
山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶
郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコッカ
ス症モデルを用いた感染防御ならびに構
築変換の解析. 第56回日本医真菌学会総
会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東
京.
18. 大野秀明, 宮崎義継. 中枢神経系感染
症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎
の遺伝子診断-(シンポジウム). 第54
回日本神経学会学術大会. 5月29-6月1
日, 2013年, 東京.
19. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘,
田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克
彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus
gattii* 感染症の病態解析(シンポジウム
4). 第57回日本医真菌学会総会・学術
集会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
特記事項なし
実用新案登録
特記事項なし
その他
特記事項なし