

Number	Fullname	Office	Address on Map
		ANIMAL HEALTH	

6. SPECIAL GUESTS: Experts come from NIID and JICA organization, Japan.

7. PROGRAM:

Time	Lectures/activities	Facilitator leader	Tutors
Day 1			
8h00 - 8h30	Registration	Organizer	
8h30 - 8h45	Presentation of representatives Opening ceremony	Organizer JICA representative Dr. Babatunde Olowokure – WHO representative	
8h45 – 9h30	Breakdown session/ training needs of the participants	Organizer	
9h30 – 9h45	Pre- test	Organizer	
9h45 – 10h00	<i>Pho to session and break</i>		
10h00 – 11h00	Rabies situation in the world and in Vietnam	Assoc. Prof., PhD. Hoang Van Tan NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong
11h00 – 11h45	<ul style="list-style-type: none"> – Program for rabies control and prevention – experiences and challenges – Strategies of rabies control and prevention in current situation 	Assoc. Prof., PhD. HoangVan Tan NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong
11h45 – 13h30	<i>Lunch</i>		
13h30 – 15h00	<ul style="list-style-type: none"> – Program for rabies control and prevention – experiences and challenges. – Strategies of rabies control and prevention in current situation (CONTINUE) 	Assoc. Prof., PhD. HoangVan Tan NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong

Time	Lectures/activities	Facilitator leader	Tutors
15h00 – 15h15	<i>break</i>		
15h15 – 17h00	rabies virus, taxonomy of <i>lyssaviruses</i> , reservoir and routes of transmission.	MD. PhD. Nguyen Thi Kieu Anh -NIHE	Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
Day 2			
8h30 – 10h30	Immune response Mechanism of Immune response to rabies virus	MD. PhD. Nguyen Thi Kieu Anh -NIHE	Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
10h30 – 10h45	<i>Break</i>		
10h45 – 12h00	Clinical signs and symptoms of rabies in animals. Theory and video on dog rabies, the notes of clinical diagnosis.	PhD. Satoshi Inoue, NIID Translator – Dr. Kieu Anh	Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
12h00 – 13h30	<i>Lunch</i>		
13h30 – 14h30	Surveillance and management of dog rabies – Decree 05/CP on rabies control and prevention.	PhD. Van Dang Ky Department of Veterinary, Ministry of Agriculture and rural development	Dr. Satoshi Inoue Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
14h30 – 15h00	Generation of rabies vaccines and immunoglobulines	Dr. Nguyen Thi Hong Hanh, Dr. Kieu Anh - NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong; Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
15h00 – 15h15	<i>Break</i>		
15h15 – 17h30	The use of vaccine and immunoglobuline Pre – exposure and post exposure prophylaxis	Assoc. Prof., PhD. Dr. Nguyen Thi Hong Hanh, Dr. Hoang Van Tan and Dr. Nguyen Thi Kieu Anh -NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong; Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong
Day 3			
8h30 – 9h30	The use of vaccine and immunoglobuline Pre – exposure and post exposure – prophylaxis CONTINUED	Assoc. Prof., PhD. Dr. Nguyen Thi Hong Hanh, Dr. Hoang Van Tan and Dr. Nguyen Thi Kieu Anh -NIHE	Msc. Nguyen Thanh Huong; Msc. Tuyen Thu, Chau Giang and BA. Dong

Time	Lectures/activities	Facilitator leader	Tutors
9h30 – 10h30	Panel Discussion , Q & A session	Assoc. Prof., PhD. Nguyen Thi Hong Hanh, Dr. Hoang Van Tan and Dr. Nguyen Thi Kieu Anh -NIHE Dr. Satoshi Inoue – NIID Dr. Babatunde Olowokure – WHO Translator: Dr. Kieu Anh	Msc. Nguyen Thanh Huong; Msc. Tuyet Thu, Chau Giang and BA. Dong
<i>10h30 – 10h45</i>	<i>break</i>		
10h45 – 11h15	Post – test	Organizer	
11h15 – 12h00	Certificate offer and closing ceremony	NIHE, JICA, WHO	
<i>11h30 – 13h00</i>	<i>Lunch break</i>		
13h00 - 17h30	Field visit	Vaccination post of district PMC, Thai Nguyen	Organizer

資料3. ハノイで行われた研修の概要

Training course in Ha Noi

1. TITLE: “Enhancement of rabies laboratory diagnosis capacity for some hospitals, provincial health centers and national center for animal health diagnosis.”
2. DATE: September 26 – 30, 2011.
3. PLACE: National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Ha Noi - Vietnam
4. TRAINERS: The rabies experts from National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Hanoi, Vietnam; National Institute for Infectious Diseases, Japan; National Institute for Tropical and Infectious diseases, Vietnam.
5. PARTICIPANTS: Most of participants are practitioners, epidemiology staffs, and laboratory staffs in Provincial Preventive Medicine Centre, and veterinarian staffs in Sub-Department of Animal Health.

Number	Fullname	Office	Address on Map
1	Đặng Thị Thu Hường	Ho Chi Minh City SUB-DEPARTMENT OF ANIMAL HEALTH	Belong to Ho Chi Minh City, North - Highland province in Vietnam
2	Mã Thu Hà	Lai Châu SUB-DEPARTMENT OF ANIMAL HEALTH	Belong to Lai Châu Province, North - Highland province in Vietnam
3	Trần Lê Sơn	Điện Biên SUB-DEPARTMENT OF ANIMAL HEALTH	Belong to Điện Biên Province, North - Highland province in Vietnam
4	Đào Minh Huệ	Lào Cai SUB-DEPARTMENT OF ANIMAL HEALTH	Belong to Lào Cai Province, North - Highland province in Vietnam
5	Đoàn Duy Huyền	Bình Thuận General Hospital	Belong to Bình Thuận Province, Southern province in VietNam
6	Đoàn Văn Bình	Bình Thuận General Hospital	Belong to Bình Thuận Province, Southern province in VietNam
7	Hồ Bang	Gia Lai Provincial Preventive Medicine Centre	South - Highland province in Vietnam
8	Nguyễn Thị Mai Hoa	Tuyên Quang Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam

Number	Fullname	Office	Address on Map
9	Nguyễn Văn Thanh	Tuyên Quang Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
10	Đương thị Hiền	Bắc Giang Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
11	Trần Văn Hải	Bắc Giang Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
12	Đoàn Thị Hồng Hạnh	Yên Bái Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
13	Lò Thị Mai	Yên Bái Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
14	Đường thị Xuyên	Lạng Sơn Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
15	Nguyễn Hoài Nam	Lạng Sơn Provincial Preventive Medicine Centre	North - Highland province in Vietnam
16	Lê Viết Thụ	Phú Thọ Provincial Preventive Medicine Centre	North province in Vietnam
17	Phùng Văn Thức	Phú Thọ Provincial Preventive Medicine Centre	North province in Vietnam
18	Đỗ Thị Huyền Trang	Hòa Bình Provincial Preventive Medicine Centre	North province in Vietnam
19	TRẦN Thị Kim loan	Hòa Bình Provincial Preventive Medicine Centre	North province in Vietnam
20	Tống thị Hà	National Institute of Hygiene and Epidemiology	Ha Noi
21	Lê Văn Duyệt	National Hospital of Tropical Diseases	Ha Noi
22	Nguyễn thị Hằng	National Hospital of Tropical Diseases	Ha Noi

6. PROGRAM:

Date/time	Activities/lectures	Lecturers/responsible people	Place
Day 1			
8h00 – 8h30	Registration	MSc. Nguyen Tuyet Thu, Mrs Ha and MSc Thao	Classroom, ESRM, NIHE

8h30 – 8h40	Opening speech	Assoc. Prof. PhD. Nguyen Tran Hien, Director of NIHE Representative of WHO	Classroom, ESRM, NIHE
8h40 – 9h40	Epidemiology of rabies in the world and in Vietnam, National program for rabies control and prevention, challenges and lessons learned.	Assoc. Prof. PhD. Nguyen Tran Hien, Director of NIHE.	Classroom, ESRM, NIHE
<i>9h40 – 10h40</i>	<i>Photo session and coffee break</i>		
10h40 – 11h45	<i>Lyssaviruses</i> , rabies virus, reservoirs, transmission route, immunology, epidemiology, control and prevention	Assoc. Prof., PhD, MD. Nguyen Thi Hong Hanh/ PhD. Nguyen Thi Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
11h45 – 12h00	Questions and Answers	All trainees and teachers Translator: Dr. Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
<i>12h – 13h30</i>	<i>Break and Lunch at NIHE canteen, the second floor</i>		
13h30 – 14h45	<ul style="list-style-type: none"> - Principle of biosafety and Safety precaution in handling with rabies virus; - Setting up a laboratory for rabies diagnosis; 	Dr. Nguyen Tuyet Thu/Dr. Nguyen Thanh Thuy Dr. Ngo Chau Giang/Dr. Kieu Anh/Dr. Satoshi Inoue	Classroom, ESRM, NIHE
14h45 – 15h00	Coffee break		
15h00 – 17h00	<ul style="list-style-type: none"> - Demonstration of methods for sampling, preservation and transportation of rabies samples; - Overview methods for rabies laboratory diagnosis. 	by watching the video which was established by NIID Dr. Nguyen Vinh Dong/Satoshi Inoue Dr. Nguyen Thi Kieu Anh/Dr. Inoue.	Classroom, ESRM, NIHE
17h00 – 17h30	Questions and Answers	All trainees and teachers Translator: Dr. Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
Day 2 Break into two groups(10 each)			
8h30 – 10h30	<ul style="list-style-type: none"> - Demonstration of rabies virus isolation in cell culture and mouse inoculation (Using the laboratory strains) 	Group 1: Dr Kieu Anh, Dr Giang Group 2: Dr. Inoue and Dr. Dong. Dr Thu will be responsible for group 2	Rabies Lab., NIHE

		translation	
10h30 – 10h40	Coffee break		
10h40 – 12h00	- FAT (brain sample, preparation of slides)	Group 1: Dr Kieu Anh, Dr Giang Group 2: Dr. Inoue and Dr. Dong. Dr Thu will be responsible for group 2 translation	Rabies Lab., NIHE
12h00 – 13h30	<i>Lunch at NIHE coffeeteria, the second floor</i>		
13h30 – 14h30	- FAT (brain sample, immun straining) Continue	Group 1: Dr Kieu Anh, Dr Giang Group 2: Dr. Inoue and Dr. Dong. Dr Thu will be responsible for group 2 translation	Rabies Lab., NIHE
14h30h – 15h15	FAT techniques, the effectiveness and key method for rabies diagnosis and key attention in performing technique	Dr. Ngo Chau Giang/ Dr. Nguyen Thi Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
<i>15h150- 15h30</i>	<i>Coffee Break</i>		
15h30- 17h00	FAT Continue (Observation under Fluorescence microscopy)	Group 1: Dr Kieu Anh, Dr Giang Group 2: Dr. Inoue and Dr. Dong. Dr Thu will be responsible for group 2 translation	Enterobacteria lab, NIHE for group 1 JE lab , NIHE for group 2
Day 3	<i>Break into two groups</i>		
8h30 – 10h00	Viral RNA extraction	Group 1: Dr. Inoue with the assistance of Dr. Ngo Chau Giang, Dr. Dong Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan Translaters: Dr. Thu	Classroom, ESRM, NIHE
10h – 10h15	Tea break		
10h15 – 11h15	Practise on RT – PCR, and RT – LAMP.	Group 1: Dr. Inoue with the assistance of Dr. Ngo Chau Giang, Dr. Dong Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan - Translaters: Dr. Thu Clearing up queries by Dr. Inoue and Dr Kieu Anh	Rabies Lab., NIHE
11h15 – 12h00	Check inoculated mouse and	Group 1: Dr. Inoue, Dr Dong with the	

	infected cells	assistance of Dr. Ngo Chau Giang Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan Translators: Dr. Thu	
12h00 – 13h30	<i>Lunch at NIHE canteen, the second floor</i>		
13h30 – 14h00	Human Rabies clinical signs/ diagnosis	Dr. Nguyen Trung Cap, National Institute for Tropical and Infectious Diseases	Classroom, ESRM, NIHE
14h00 – 15h15	Animal rabies clinical signs/ diagnosis	– Presenting by Dr. Inoue / Nguyen Tuyet Thu – Translating by Dr. Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
15h15 – 15h30	<i>Coffee break</i>		
15h30 – 17h30	<ul style="list-style-type: none"> - Break into two groups - Gel Electrophoresis and interpret the results of RT – PCR and RT – LAMP. - Question and answers 	<p>Group 1: Dr. Inoue with the assistance of Dr. Ngo Chau Giang, Dr. Dong</p> <p>Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan</p> <ul style="list-style-type: none"> - Translating by Dr Thu - Clearing up queries by Dr. Inoue and Dr Kieu Anh. 	Rabies Lab., NIHE
Day 4			
8h00 – 10h00	<ul style="list-style-type: none"> - Break into two groups - Check the inoculated mice and infected cells. - Virus identification by FAT and RT - PCR tests. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dr. Inoue, Dr Dong and Dr. Kieu Anh - Dr. Thu is translators. - Technique assistance of Dr. Giang and Dr. Loan 	Rabies Lab., NIHE
10h- 10h15	<i>Coffee break</i>		
10h15 – 11h15	Rabies virus immune response	Dr. Ato/Dr Tuyet Thu Translating by Dr Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE
11h15 – 12h00	Break into two groups FA and RT – PCR (continue)	<p>Group 1: Dr. Inoue with the assistance of Dr. Ngo Chau Giang, Dr. Dong</p> <p>Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan</p> <ul style="list-style-type: none"> - Translating by Dr Thu - Clearing up queries by Dr. Inoue and Dr. Kieu Anh 	Rabies Lab., NIHE
12h00 – 13h30	<i>Lunch break at the second floor of NIHE frater</i>		
13h30 – 14h30	Rabies pathology, Human rabies cases diagnosis experiences and lesson learnt	Dr. Tobiume/Dr. Inoue/ Dr. Long Translating by Dr. Kieu Anh	Classroom, ESRM, NIHE

14h30 – 15h30	<ul style="list-style-type: none"> - Rabies vaccine and immunoglobuline. - Pre and post exposure by vaccine and immunoglobuline. 	<p>Assoc. Prof. Nguyen Thi Hong Hanh</p> <p>Dr. Hoang Minh Hien.</p>	Classroom, ESRM, NIHE
15h30 – 15h45	<i>Coffee break</i>		
15h45 – 17h30	<ul style="list-style-type: none"> - Interpreter the RT – PCR - Question and answers 	<p>Group 1: Dr. Inoue with the assistance of Dr. Ngo Chau Giang, Dr. Dong</p> <p>Group 2; Dr. Kieu Anh with the assistance of Dr. Do Phuong Loan</p> <ul style="list-style-type: none"> - Translating by Dr. Thu - Clearing up queries by Dr. Inoue and Dr. Kieu Anh. 	Rabies Lab., NIHE
Day 5			
8h00- 8h30	Move to National center for veterinary diagnosis	Picking up at NIHE at 8 am	Dr. Thu and Thao are responsible for logistic.
8h30 – 12h00	<p><i>Break into two group</i></p> <p>Dog brains operation to take samples, packaging and transporting to the lab.</p> <p>Necropsy of dogs</p>	<p>Dr. Inoue and Dr Tho are responsible for group1, Dr Thu is translator</p> <p>Drs. Kieu Anh and Dong are responsible for group 2</p> <p>Dr. Giang assists for practices</p>	National center for veterinary diagnosis
12h00 – 14h00	<i>Comeback NIHE and lunch break at the same place.</i>		
14h00 – 15h00	Results of histologic diagnosis of human rabies in Japan, lesson learned.	<p>Dr. Tobiume/ Dr Long</p> <p>Translator: Dr Kieu Anh</p>	Classroom, ESRM, NIHE
15h00- 16h00	Evaluation and questionnaire	Drs. Thu, Giang, Dong	Classroom, ESRM, NIHE
16h00 – 17h00	<ul style="list-style-type: none"> - Closing ceremony. - Trainee representative statement. 	<p>Assoc. Prof. Nguyen Thi Hong Hanh</p> <p>Representative of WHO</p> <p>Dr. Kieu Anh is translator.</p>	Classroom, ESRM, NIHE

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）

分担者研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワーク
の促進と共同研究体制の強化に関する研究（H23－新興－指定－020）

ベトナムにおけるヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究

研究分担者 大野秀明

国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究協力者 田辺公一、梅山 隆、山越 智、宮崎義継（国立感染症研究所生物活性物質部）、

Thi Thu Ha Hoang（National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam）

Nguyen Van Tien（Bach Mai Hospital, Vietnam）

研究要旨:ベトナムとの真菌症に関する共同研究の一つとしてベトナムにおけるヒストプラズマ症の疫学研究、ヒストプラズマ属の環境中生息状況調査を行った。ハノイ市における医療機関で呼吸器感染症が疑われた症例を対象にしたヒストプラズマ症の疫学調査では、ヒストプラズマ症の確定診断が得られた症例は現時点まで確認できなかったが、抗ヒストプラズマ抗体の陽性率は約 28%であった。また環境検体については約 120 検体を採取しヒストプラズマ属検出の検討に供した。今回の我々の結果から、ベトナムにおいてもヒストプラズマ属感染は稀な事象ではないことが推定され、ベトナムにおける本症に関する初めての疫学的情報と考えられた。

A. 研究目的

ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともいわれ、高病原性真菌（BSL3）であるヒストプラズマ属（*Histoplasma capsulatum*）を原因真菌とし、HIV 感染者など免疫不全者に加え、健康人にも発病が認められる真菌感染症である。ヒストプラズマ属は通常土壌中に生息し、コウモリや鳥類の糞中で盛んに増殖する真菌で、世界的に広く生息が確認されているが、なかでも米国ミシシッピー川流域や中南米、

西アジア、東南アジア、オーストラリアが大きな侵淫地域であり、本感染症は地域流行型真菌症の性格をもつ。日本人のヒストプラズマ症患者は年々増加傾向を示し、その多くは北中米と東南アジアでの感染であることが考えられているが、東南アジア地域でのヒストプラズマ症の実態、流行状況、感染源、危険因子等については未解明な点が多く、日本人現地在住者、日本人旅行に対する適切な感染危険情報も少ない。このような状況を鑑み、

本研究では、東南アジア地域での本症の実態把握、流行状況調査、診断能力の向上ならびに分離されたヒストプラズマ属の各国での疫学的解析や基礎研究の推進・発展主要内容として、それぞれの国の感染症研究機関との共同研究ネットワークを構築し、日本ならびにアジア諸国の公衆衛生に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

本年度はベトナム社会主義共和国の国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE, Vietnam) の希少細菌研究室と、ハノイ市の Bach Mai Hospital との共同研究として検討を行った。検討内容としては、呼吸器感染症疑い患者での肺ヒストプラズマ症 (急性、慢性) の状況調査 (疫学調査)、診断支援、ヒストプラズマ属生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定を行った。

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

NIHE ならびにハノイ市 Bach Mai 病院、関連病院の感染症部門検査部が主体となり、これら医療機関を受診した (不明熱) 患者で、ヒストプラズマ症を含めた侵襲性真菌症が疑われる患者から診断目的で検査に提出された臨床検体を用いて培養検査、遺伝子検査、抗体検査を実施した。患者のエントリー基準として、1) 無症状だが胸部 X 線検査で肺野に陰影を認める、2) 急性呼吸器症状を呈する (発熱、胸痛、倦怠感、咳嗽など)、3) 結核様の慢性の呼吸器症状を呈し徐々に悪化する

症例 (結核は否定する)、4) 免疫不全、口腔内潰瘍、中枢神経症状を呈した症例を対象とした。対象検体は喀痰、気管支洗浄液、髄液、胸水、血液、生検組織などで、状況に応じ培養法、遺伝子診断法 (PCR 法)、血清診断法を行った。PCR 法については我々が行っているヒストプラズマ属検出用 PCR 法 (Ohno H, et al. J Infect Chemother. In press) を行い、また血清診断法についても我々が診断目的で使用しているキット (Histoplasma DxSelect, Focus Diagnostics, Cypress, CA) を用いて抗ヒストプラズマ抗体の有無を検出した。

2) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査

ハノイ市内ならびに近郊の公共エリア、住宅地、病院周辺、洞窟などでコウモリや家禽類の糞で汚染された土壌検体を対象としてサンプリングを行った。得られた土壌検体は冷蔵保存の上 NIHE へ運搬し、以後のヒストプラズマ属培養法、PCR 法へ供した。

(倫理面からの配慮について)

本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365) の承認を受けて実施した。

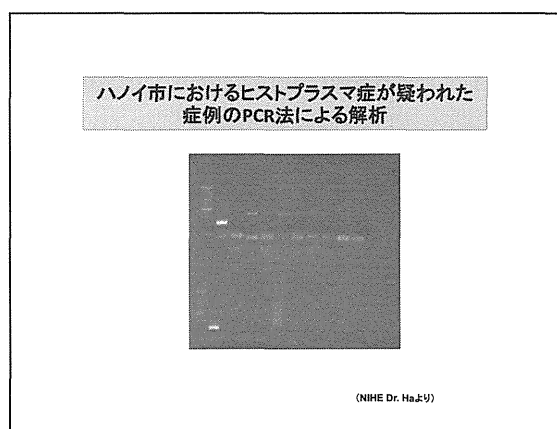
C. 研究結果

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

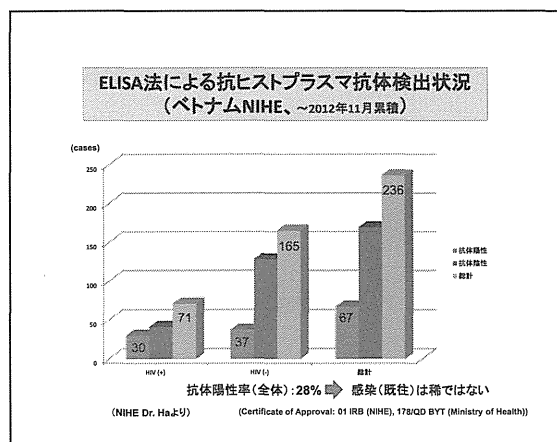
現在まで気管支肺胞洗浄液 (BALF) 12 検体、血清 236 検体が NIHE へ検査目的にて供された。BALF については培養法、PCR 法を行ったが、いずれとも陽性となった検体は確

認できなかった(図1)。一方、血清についてはすべて血清診断法に供され、67検体(28%)が抗ヒストプラズマ抗体陽性と判定された(図2)。基礎疾患としてHIV感染の有無別で抗体陽性率を検討したところ、HIV陽性検体71検体中30検体(42%)、HIV陰性検体165中37検体(22.4%)が抗体陽性であった(図2)。

(図1)



(図2)



2) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査

本年度は現在まで土壌検体計120検体が採取された。現在、培養法、遺伝子検出の検討を行っている。

D. 考察

ヒストプラズマ症は、わが国では海外で感染し国内で発病する、いわゆる輸入真菌症とされているが、東南アジア、とくにタイではHIV感染者を中心に比較的高い頻度で認められる真菌症である。本感染症は基本的にヒト-ヒト感染がないことや、診断が困難であることから、疫学情報の不足が認められる。

ベトナムにおける真菌症診療は、スタッフや診療体制面から十分な体制が整っているとは言い難い現状が認められ、ヒストプラズマ症に関しては診断自体が正確に行われていない面が見受けられる。論文検索上ベトナムでのヒストプラズマ症の症例報告は過去に1例認められるが、その診断に関しては病理組織像のみであった。このような背景から、ベトナムにおけるヒストプラズマ症の疫学的情報は不明で、実際にどれくらいの頻度で発生が認められるのかなどの報告は現在までなく、我々の検討が実質的に初めての疫学調査となる。

我々の現在までの検討はまだまだ初端に過ぎないが、呼吸器感染症が疑われる患者血清の血清診断法で28%が抗ヒストプラズマ抗体陽性であったことは、ヒストプラズマ属がベトナムでも広く侵淫していることが伺われた。但し、この数字には偽陽性例も含まれると考えるべきであるが、それを勘案してもヒストプラズマ属感染は稀ではないことが推測された。またHIV陰性者より陽性者で抗体陽性頻度が高いことは、ベトナムにおけるHIV感染者でもヒストプラズマ症が重要な合併感染症となりうることが示されている。今回の検討

では確定診断例、すなわち培養法、PCR 法において陽性となった例は認められなかったが、血清診断法で高い値を示した症例は数例確認されていることから、今後それら症例の経過を追う必要がある。一方、ヒストプラスマ属の環境中生息状況については現時点で生息を証明する結果は得られていないものの、今後更なる調査を継続していく予定である。

本研究は日本とベトナムとの真菌症に関する共同研究の先駆けであり、今後継続的な研究体制を維持しながら発展させていくことが重要と考えられる。

E. 結論

ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて抗ヒストプラスマ抗体保有状況の検討から、この地域におけるヒストプラスマ属感染は決して少なくはないものと推定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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) Gytoku 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.

3) Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M.

Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol*, 2012. (DOI: 10.2340/00015555-1385)

4) 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* : 1-9. Posted online on 17 Aug 2012. (doi:10.3109/13693786.2012.708883)

5) Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. A first report of *Rothia aeria* endocarditis complicated by cerebral hemorrhage. *Internal Medicine* 51: 3295-3299, 2012 .

6) Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1, 2-linked

oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. Med Mycol. Posted online on October 29, 2012. (doi:10.3109/13693786.2012.733892)

7) Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. J Infect Chemother. In press.

8) 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. In press.

9) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother. In press.

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. Berlin, 2012.

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.

国内学会

1) 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、4 月 25, 26 日、長崎、2012.

2) 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、4 月 25, 26 日、長崎、2012.

3) 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御. 第 60 回日本化学療法学会総会、4 月 26、27 日、長崎、2012.

4) 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回日本医真菌学会学術集会、11月10, 11日、東京、2012.

5) 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回日本医真菌学会学術集会、11月10, 11日、東京、2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

***Clostridium difficile* 感染症の信頼性の高い細菌学的検査システムの確立と
アジアにおける *C. difficile* 感染実態調査**
Establishment of a reliable system for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection and molecular
epidemiology of *C. difficile* infection in Asia

研究分担者 加藤はる (国立感染症研究所 細菌第二部)
Haru Kato (Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases)

【研究要旨】ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)において *Clostridium difficile* 分離培養を開始し、現在までまったく情報のなかったベトナムの医療機関における *C. difficile* 感染症についての検討が開始された。ハノイ市内の4医療機関とNIHEが協力し、ネットワーク構築を行っているが、臨床現場の実態の把握がさらに必要であることが明らかとなった。また、現在使用されている *C. difficile* 検査法よりも臨床病態を反映できる新しい細菌学的検査法として、RT-PCR法を用いた *C. difficile* 毒素遺伝子検出法の開発を行った。

【Summary】 Laboratory techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection including *C. difficile* culture were introduced to National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Viet Nam, where there has been no data about *C. difficile* infection available. A network of NIHE and 4 healthcare facilities in Hanoi has been constructed. More discussion and communication with clinical side should be required to know current status of healthcare-associated infection in Hanoi. As a more reliable laboratory test, a novel method detecting vegetative cells of *C. difficile* from fecal specimens by amplifying the repeating sequences of toxin A gene by reverse transcription PCR (RT-PCR) was established.

研究協力者
妹尾充敏 国立感染症研究所
Mitsutoshi Senoh 細菌第二部, Department of
柴山恵吾 Bacteriology II, National
Keigo Shibayama Institute of Infectious
Diseases
Vu Thi Thu Huong Department of Bacteriology
Tăng Thị Nga National Institute of Hygiene
Lê Thị Trang and Epidemiology
Tham Chi Dung (NIHE), Hanoi, VietNam

における疫学情報は乏しい。本研究は、ベトナム、ハノイ市の協力医療機関入院症例から分離された *C. difficile* 菌株の解析に加え、ハノイ市の協力医療機関における臨床背景も含めて調査し、感染実態を調査する足がかりとする。

さらに、*C. difficile* は、無症候キャリアが多く、診断が難しい場合は少なくない。本研究では、遺伝子学的手法を用いた、より臨床病態を反映できる、新しい細菌学的検査法を開発評価することを目的のひとつとする。

A. 研究目的

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。ベトナムでは、医師処方箋なしで抗菌薬の購入が可能であり、抗菌薬の使用の乱用が懸念されるにもかかわらず、*C. difficile* 感染症(CDI)の臨床検査はまったく行われていないため、CDIの実態についてはまったく情報がない。本研究の第一の目的は、ベトナムNIHEにおいて、CDIの細菌学的検査システムを確立することである。

C. difficile 感染症は、欧米では1980年代より医療関連感染として問題となっているが、特に2000年になってからの症例数の急激な増加に伴い、現在、いっそう注目されている。世界各地で高病原性株 BI/NAP1/027 の分布や伝播を含めて、疫学的検討が進んでいるが、ベトナムをはじめアジアに

B. 研究方法

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築
 - (a) 2012年7月29日から8月5日まで、国立感染症研究所で、NIHEのVu Thi Thu HuongにCDIの細菌学的検査の技術講習を行った。
 - (b) ハノイ市の4病院、National Hospital of Infectious Diseases、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、およびBac Mai Hospitalからの糞便検体収集と *C. difficile* 分離培養がNIHEで開始された。
 - (c) 2013年1月16日から1月21日まで、研究分担者がNIHEを訪問し、臨床検体の収集や分離培養に関して現場で打ち合わせを行った。
 - (d) 1月17日に、ハノイ市内の協力医療機関の

うち、National Hospital of Infectious Diseases および Dong Da Hospital を訪問した。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

- (a) RT-PCR の条件検討を行うため、純培養した *C. difficile* から RNA を抽出した後、DNase 処理したものを Template RNA として用いた。PCR 条件は、95°C 20 秒、55°C 2 分を 35 サイクル繰り返した。PCR primer は J Clin Micro, 1991, 29, 33-7 の NK3, NK2 を使用した。
- (b) 便検体中の *C. difficile* 毒素遺伝子を検出できるか否か検討するため、純培養した *C. difficile* を *C. difficile* 陰性便検体に接種し、栄養型 *C. difficile* を含む便検体を調製した。さらに、純培養した *C. difficile* をアルコール処理、またはオートクレーブ処理し、芽胞状態の *C. difficile*、または死菌の *C. difficile* を調製した後、それぞれ *C. difficile* 陰性便検体に接種し、芽胞 *C. difficile* を含む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体を調製した。便検体からの RNA 抽出の条件検討を行った後、各便検体から RNA を抽出し、(a) で得られた結果を元に RT-PCR を行った。
- (c) 臨床便検体についても本検査法が有用か否か検討するため、臨床便検体から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。便検体からの RNA 抽出は (b) で得られた結果を元に、RT-PCR の条件は (a) で得られた結果を元に行った。また、従来の検査法である培養法、酵素免疫測定法、PCR 法の結果と比較した。

倫理面への配慮

「*Clostridium difficile* 医療関連感染に関する研究」は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された (受付 114)。

C. 結果

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築

- (a) Vu Thi Thu Huong が、嫌気培養法の基本的手技、糞便検体からの *C. difficile* の分離培養、同定、菌株保存、さらに、PCR による毒素遺伝子検出などの基本的技術を習得した。
- (b) ハノイ市内の医療機関入院症例から採取した糞便検体から、*C. difficile* の分離がなされ、最初の 2 例は症例報告がなされた。
- (c) NIHE 研究室での分離培養ステップを確認した。グラム染色のステップや *C. difficile* の同定方法を見直すことを指摘した。実験の前後に手指衛生を行ってはいしたが、流水による手洗い後に、少なくとも数日間洗濯されていないタオルを複数実験室使用者で共有していたので、注意を促した。また、

検体採取に使用している輸送容器が小さく検体を入れにくいものである点、協力研究者 (医師) に記入してもらった質問様式が多項目にわたり複雑であるにもかかわらず、重要な質問項目が抜けている点、CDI 症例の詳細な臨床情報を得るために、カルテをそのままコピーし個人情報の管理に注意していない点などを指摘した。

- (d) National Hospital of Infectious Diseases および Dong Da Hospital で、CDI について一般的な事項および日本の現状について説明を行った。National Hospital of Infectious Diseases では、臨床検査室および ICU を見学した。臨床検査室では、嫌気チャンバーがあったが、まったく使用されていなかった。ICU の廊下はガラスなしの窓でそのまま外に連絡しており、汚物処理室自体が存在しなかった。使用後の医療機器は ICU 病室のなかのシンクで洗浄していた。手指衛生用のシンクはみあたらなかったため、医療スタッフはほとんど手洗いをしていないと推察された。Dong Da Hospital では、CDI について質問が多く出て、関心の高さが感じられた。一方、医療機関での話し合いではまったく話題に出なかったが、ハノイ市内の医療機関では、ICU 以外では「1 ベッドを数名 (夏季は 4-5 名) の患者が同時に使用することが一般的である」ということが、NIHE 関係者と討議を重ねる上でわかってきた。

2. 遺伝子学的検査法の開発

- (a) *C. difficile* 毒素遺伝子検出のための RT-PCR の条件検討を行ったところ、逆転写反応は 30°C で 10 分間反応させた後、42°C で 20 分間反応させることにより、良好な結果が得られることが分かった。また、一反応系に必要な RNA 量は > 200 fg であった (Fig. 1)。

(b)

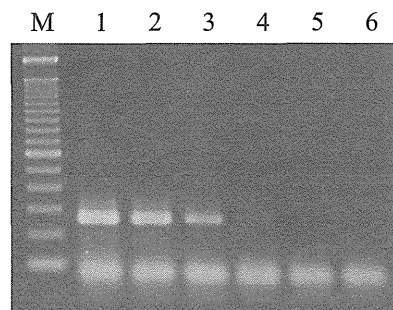


Fig. 1. 異なる量の RNA を添加して行った RT-PCR. M: 100 bp DNA marker; 1: 200 pg; 2: 20 pg; 3: 2 pg; 4: 200 fg; 5: 20 fg; 6: 2 fg

- (c) 便検体から直接 RNA を抽出し、RT-PCR が行えるか否か検討するため、カラム式

の RNA 抽出法とフェノール・クロロホルムによる RNA 抽出法を行い、RNA の純度や収量を比較した。その結果、フェノール・クロロホルムによる抽出法の方が高純度で収量も多かった。栄養型 *C. difficile* を含む便検体、芽胞 *C. difficile* を含む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体からそれぞれ RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、本法では栄養型 *C. difficile* を含む便検体のみ陽性の結果が得られた (Fig. 2)。

- (d) 臨床便検体 5 検体を用いて RT-PCR を行い、従来の検査法である培養法、酵素免疫測定法、PCR 法の結果と比較した。その結果、5 検体ともすべての検査法で陽性となった。

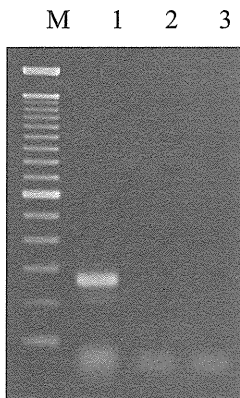


Fig. 2. 異なる状態の *C. difficile* を含む便検体から抽出した RNA を用いて行った RT-PCR. M: 100 bp DNA marker; 1: 栄養型 *C. difficile* を含む便検体; 2: 芽胞 *C. difficile* を含む便検体; 3: 死菌 *C. difficile* を含む便検体

D. 考察

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築

ベトナムで今までまったく行われていなかった、嫌気培養および *C. difficile* 培養検査が、NIHE で開始されたことは大きな進展である。特に、ハノイ市内の医療機関とネットワークを組み、協力しながらシステム構築を進めていることが、評価できる。しかしながら、病原体を扱っているにもかかわらず、手指衛生に無頓着である等、新しい技術の導入には意欲的であっても、非常に基本的な衛生概念が抜け落ちているというアンバランスが感じられた。

訪問した医療機関のうち、Dong Da Hospital では医師の CDI への関心が高く、今後の協力関係に期待できると考えられた。よりいっそうのコミュニケーションが必要と思われた。

「ハノイ市内の病院では、1 ベッドを複数の患者が共有し、満足に臥位にさえなれないこともある状況が一般的」である事実は、分担研究者がベトナムを訪問し、会話を続けた上で引き

出した情報であった。このことから、日本および欧米の医療機関での CDI の感染管理の考え方をそのままベトナム、少なくともハノイ市の医療機関に導入することは非常に困難であると考えられた。本研究で、分離培養された *C. difficile* 菌株について解析する場合も、他国の医療状況と異なることを念頭に入れて比較解析をしなければならないことを示している。

2. 遺伝子学的検査法の開発

現在用いられている検査法には、それぞれ欠点がある。培養法は時間がかかる上、毒素産生性 *C. difficile* と毒素非産生性 *C. difficile* の区別ができない。酵素免疫測定法は感度が悪い。PCR 法は生菌と死菌の区別ができない。しかし、今回開発した RT-PCR 法を用いた検査法は、それらの欠点を克服しているため、今後の *C. difficile* の細菌学的検査法として有用であると考えられる。純培養菌による実験と添加実験において、良好な結果が得られたが、臨床便検体については 5 検体の結果しか得られていないため、今後は検体数を増やし、本法の信頼性を高める必要がある。

E. 結論

ベトナムで、*C. difficile* 分離培養を開始した。研究室で、病原体の解析を行うこと、新しい技術を導入していくことが重要であることはもちろんであるが、臨床現場の実態の把握も、必須であると考えられた。

今回開発した新規細菌学的検査法は栄養型 *C. difficile* を特異的に検出することが可能であることが明らかになった。これは *C. difficile* 感染症診断に有益であると考えられる。

F. 健康危機情報

CDI を含めた医療関連感染として重要な感染症における検討は、分離された病原体における解析だけでなく、医療現場との情報共有が重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hie. Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of *Clostridium difficile* A-B+ and *Clostridium difficile* A+ B+ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012. Journal of Preventive Medicine 22 (5), p. 81-90 (in Vietnamese).

2. 学会発表

- Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Keigo Shibayama. Rapid detection method of live *Clostridium difficile*. 4th International *Clostridium difficile* Symposium. Slovenia, 2012 Sept.
- 妹尾充敏、加藤はる 栄養型毒素産生性

Clostridium difficile の新規検査法の開発 第 28 回 H. 知的財産権の出願・登録状況
日本環境感染学会総会 横浜 2013 年 3 月 なし

MINISTRY OF HEALTH
NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE AND EPIDEMIOLOGY

THE SECOND PHASE REPORT IN 2012

STRENGTHENING THE RESEARCH CAPACITIES
OF THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE AND
EPIDEMIOLOGY ON SOME NEGLECTED
INFECTIOUS DISEASES IN VIETNAM

*(Sponsored by
the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan)*

Hanoi, March 2013