

真菌とし、HIV 感染者など免疫不全者に加え、健常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・発展主な内容として、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

ネットワーク構築対象のアジアの感染症研究機関として、タイ王国の国立衛生研究所 (The National Institute of Health : NIH, Thailand)、チェンマイ大学 (医学部微生物学講座) ならびに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) とし、ヒストプラズマ症に関する共同研究やラボラトリーネットワークについて検討を行った。

1) タイにおけるヒストプラズマ症の実態調査、生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定

生息調査に関しては、タイ NIH のスタッフと共同で、タイ・バンコク周辺の環境検体 (土壌) を対象として、培養法、遺伝子検出法を用いて検討を行った。

i) 培養法

ヒストプラズマ属が存在すると考えられるコウモリや鳥類の糞で汚染された土壌を採取し、クロラムフェニコール含有 PBS に懸濁した後振盪攪拌し、1-3 時間静置した上清を一部採取し brain heart infusion 培地へ塗布し、30°C で 8 週間培養した。

ii) 遺伝子検出法

対象検体は培養法に供した検体とし、PBS に懸濁した上清を proteinase K 処理、 β -グルカナーゼ処理し、フェノール・クロロフォルム法で DNA 抽出した。遺伝子検出には我々が用いているヒストプラズマ属の M antigen を標的とする nested PCR 法を適用し、プライマーはすでに報告した (Ohno H, et al. J Infect Chemother, 2013) Msp1F、Msp2R を first PCR で、Msp2F、Msp3R を second PCR で用い、反応条件も同様に準じた。

2) 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

平成 24 年度から 25 年度にかけ、ベトナム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、103 Hospital、National Lung 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。

i) 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 Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital 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, 2013) 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。

ii) 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)

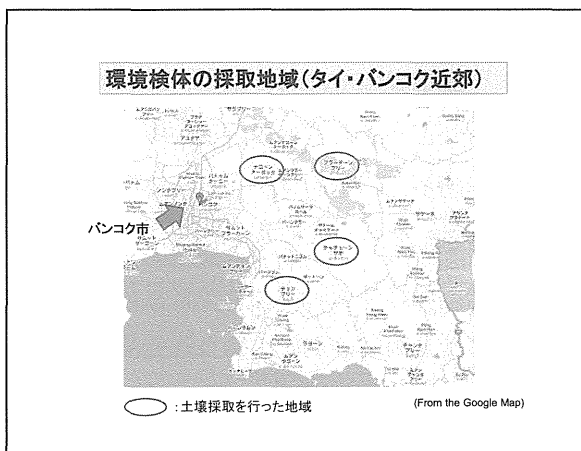
環境検体採取に関しては、研究目的、内容を土地所有者等に説明し許可を得て採取した。本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365, No.460) の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

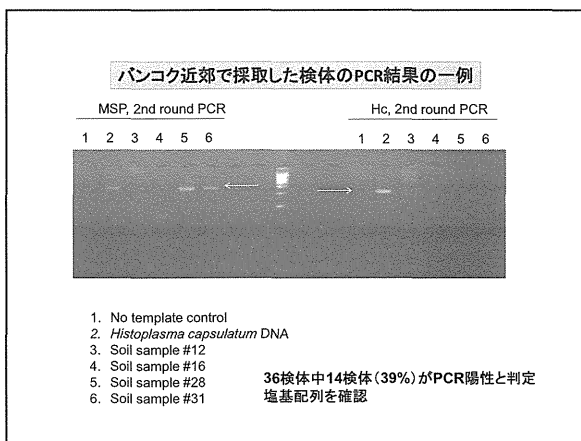
1) タイにおけるヒストプラズマ症の実態調査、生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定

タイ NIH の真菌研究室のスタッフとともに、タイ・バンコク近郊の 4 地域を対象に (図 1)、おもに公共の場所 (寺院境内など) を中心にコウモリの糞で汚染された土壌を採取し、ヒストプラズマ属の培養、遺伝子検出を行った。土壌検体は計 36 検体採取し、培養結果はいずれも陰性であったが、14 検体 (39%) でヒストプラズマ検出用 PCR が陽性であった (図 2)。陽性検体については塩基配列の確認を行ったところ、*Ajellomyces capsulatus* と 97-99%の相同性が確認された。

(図 1)



(図 2)



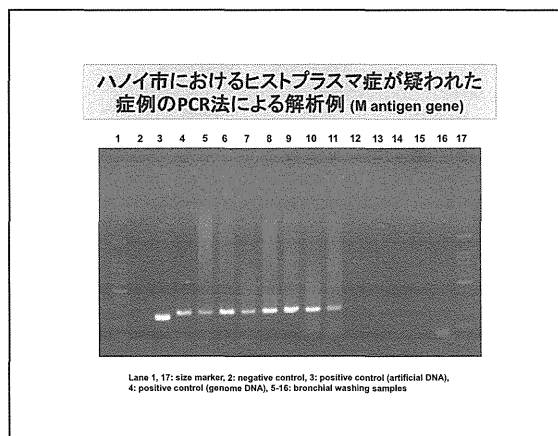
2) ベトナムにおけるヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究

i) 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

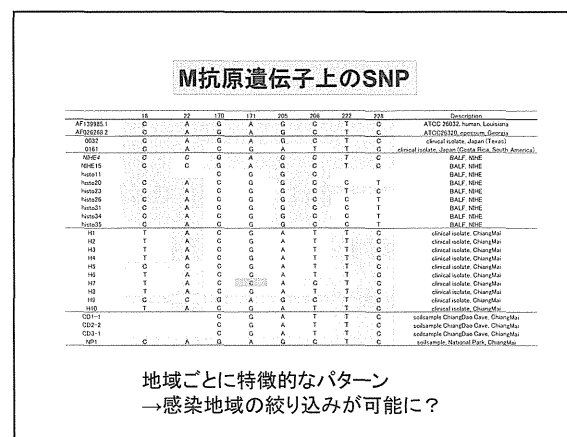
現在まで喀痰、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 258 検体、生検組織 1 検体、血清 144 検体が NIHE へ検査目的にて供された。BALF については培養法、PCR 法を行い、培養法陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性は計 9 例 (3.5%) で認めた (図 3)。また、PCR 法で陽性となった検体について、その増幅産物の塩基配列を確認したところ、*Ajellomyces capsulatus* と 97-99% の相同性が確認された。

さらに、増幅産物の塩基配列の一塩基多型について検討した結果、米国株やタイ株とは違った塩基配列パターンが認められた (図 4)。この塩基配列をもとに、系統樹を作成すると、ベトナムでの検体に含まれていたヒストプラズマ属由来と考えられる DNA は、タイの分離株とは明らかに違うクレードで、むしろ米国株に近いクレードを形成することが伺われた (図 5)。一方、血清についてはすべて血清診断法に供され、26 検体 (18%) が抗ヒストプラズマ抗体陽性と判定された (図 6)。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 15 検体中 3 検体 (20%)、HIV 陰性検体 129 中 23 検体 (18%) が抗体陽性であった (図 6)。

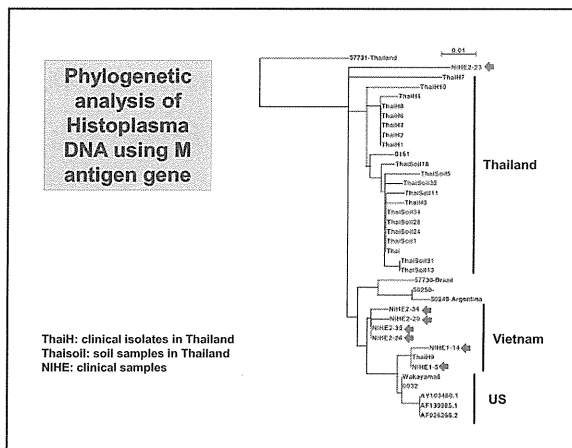
(図 3)



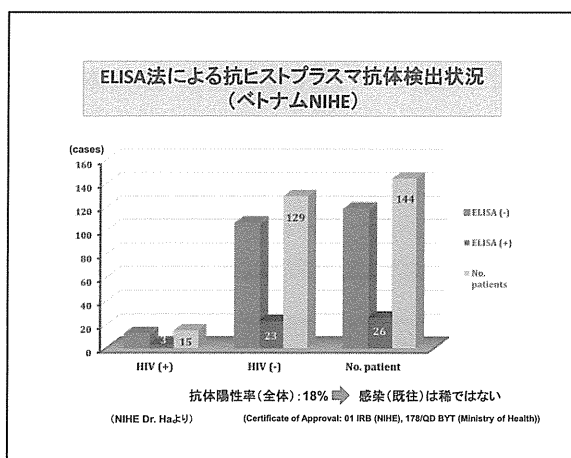
(図 4)



(図 5)



(図 6)



ii) 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、コウモリ糞や家禽類の糞汚染土壌検体計 152 検体が採取された。これらを対象に検討した結果、培養法で陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性が 3 例で確認された。

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。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ーヒ

ト感染がないことや、培養陽性率が極めて低いことから診断が困難である。日本人ヒストプラズマ症患者の中には、東南アジアでの感染であることが考えられている症例もあるが、感染危険因子、ハイリスクな自然環境などの情報は不足していると言っても良い。

今回われわれは上記のような背景から、タイ、ベトナム両国の感染症担当研究機関と接触を行い、ヒストプラズマ症に対する総合的な対策の一環として、基礎的、臨床的共同研究の提案を行い、合意を得ることに至った。両国とも感染源、リザーバーの同定はほとんど検討されておらず、今回タイ国での公共利用の土地の土壌検体を中心にヒストプラズマ属の存在を検証した。その結果、生菌は証明できなかったものの、多くの検体で菌遺伝子の存在が認められた。この結果は、バンコク近郊においてヒストプラズマ属は特殊な環境ではなく、日常的に人間が生活する空間に生息していることが推測され、感染源、感染経路解明、感染対策の一助となる可能性がある。

一方、ベトナムにおいては本症の疫学情報の不足が認められる。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実態や感染源と考えられる環境の検討を行った。

本検討では、気管支肺胞洗浄液検体から初めて PCR 法でヒストプラズマ属 DNA 陽性となった検体が認められた。これら陽性例はすべて培養法陰性であったが、臨床所見や PCR 産物の解析からヒストプラズマ症と診断できると考えられる。すなわちベトナム北部における、微生物学的検査成績をともなった初のヒストプラズマ症例となる。この事実は、ベ

トナムにおいても呼吸器感染症としてのヒストプラズマ症は決して稀ではない深在性真菌症であることが伺われ、今回同時に検討した抗体検出率の値もこの点を支持しているものとする。また、M抗原遺伝子の一塩基多型解析では、タイ型とは離れ、むしろ米国型に近いクレードを形成することが認められることから、東南アジアにおけるヒストプラズマ属の遺伝的多型性を示唆する結果が認められたことは興味深いと考えられた。今後、更なる症例の蓄積が求められる。

さらに本研究では、ヒストプラズマ属の感染源となりうる環境の検討も行ったが、3検体のみでPCR法が陽性であった。これについて一定の見解はまだ付与できないと考えるが、我々のタイでの検討の結果を考慮すると、ベトナムにおいても家禽類の糞汚染土壌が感染源である可能性は高い。

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もあり、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

タイ・バンコク近郊において複数の公共地点の土壌からヒストプラズマ属の遺伝子と考えられる遺伝子が検出され、感染源となりうる可能性が考えられた。また、ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて、急性呼吸器感染症が疑われる症例から得られた臨床検体中に、ヒストプラズマ属の遺伝子が検出された症例を経験した。また、抗ヒストプラズマ抗体保有状況の検討から、この地域における

ヒストプラズマ症は決してまれな真菌症ではないことが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Takeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucomycosis. Clin Exp Dermatol 36: 312-314, 2011.
- 2) Kobayashi T, Takeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. Jpn J Infect Dis 64: 292-296, 2011.
- 3) 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.
- 4) Gytoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Takeya 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.
- 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) 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.
- 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* 19: 138-143, 2013.
- 8) Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol* 93: 187-188, 2013.
- 9) 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* 66: 51-55, 2013.
- 10) Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol* 88 (2): 371-381, 2013.
- 11) 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* 51: 385-395, 2013.
- 12) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother* 19 (5): 999-1003, 2013.
- 13) Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2226-2230, 2013.

- 14) 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.
- 15) Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. J Infect Chemother 19 (6): 1141-1145, 2013.
- 16) 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 and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against Cryptococci. Mediators of Inflammation, volume 2013, article ID 465319, 2013.
- 17) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. Mycopathologia 176 (5): 395-402, 2013.
- 18) 大野秀明. 中枢神経系真菌感染症における最近の動向. 最新医学 66: 997-1004, 2011.
- 19) 大野秀明. 髄膜炎、脳炎. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて (Medical Practice 臨時増刊号). 文光堂、352-358、東京、2011.
- 20) 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.
- 21) 大野秀明. 結核感染症の病態-結核発症の危険因子とは?-. 治療 95 (6): 1159-1163, 2013.
- 22) 大野秀明、荒岡秀樹、梅山 隆、金子幸弘、宮崎義継. 接合菌症. 臨床検査 58 (1): 97-103, 2014.
- 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.

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, Yokohama, 2013.

5) Sriburee P, Puengchan T, Ohno H, Tanabe K, Siriaunkul S, Lamaroon A, Chanwong S, Khamwan C, Khantawa B, Miyazaki Y. Early diagnosis of histoplasmosis by nested PCR. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013.

6) Tanabe K, Ohno H, Hoang Thi Thu Ha, Nguyen Thuy Tram, Miyazaki Y. Histoplasmosis. NIID-NIHE review meeting on collaborative research program, Hanoi, 2013.

国内学会

1) 大野秀明. 高病原性クリプトコックス症の現状とその病態. ワークショップ3、深在性真菌症の新たな展開—重症例、難治症例の病態と治療—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.

2) 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.

3) 大野秀明、宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第128回ICD講習会、東京、2011.

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.

5) 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) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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 日-6 月 1 日、東京、2013.

12) 秋根 大、加藤幹朗、辻 浩史、榎村浩一、大野秀明、小林裕幸. 2 cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected healthy patients. 第 87 回日本感染症学会、第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、6 月 5 日-6 日、横浜、2013.

13) 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、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、安藝恭子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に

関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27-28 日、東京、2013.

14) 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山隆、山越 智、名木 稔、知花博治、亀井克彦、宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27-28 日、東京、2013.

15) 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* 感染書の病態解析 (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、東京、2013.

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)がハノイ市内の4医療機関と *Clostridium difficile* 感染症(CDI)の研究をするためにネットワーク構築を行い、NIHEにおいて *C. difficile* 分離培養が開始された。ハノイの医療機関は、抗菌薬適正使用が行われていない、病棟で複数患者が1ベッドを共有するなど過密な状況で感染管理が難しい等により、*C. difficile* 高病原性株の発生源・温床となりやすいと考えられた。ベトナムにおける CDI の感染実態調査および疫学調査は急務であると考えられた。

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・評価を行った。検討検体数を増やす必要があるが、本法は、臨床検査として使用でき、さらに *C. difficile* による感染と無症候キャリアを区別できうる画期的検査法と考えられた。

【Summary】 A network of National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) and 4 healthcare facilities in Hanoi has been successfully constructed to investigate epidemiology of *Clostridium difficile* infection (CDI) in Hanoi and *C. difficile* culture was started in NIHE. Healthcare facilities in Hanoi, where antimicrobial stewardship program and infection control are not adequately performed, has a high potential to be a new source and hotbed of hypervirulent strains, such as BI/NAP1/027. Further study is urgent to investigate current status and epidemiology of CDI in Viet Nam.

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 and evaluated. The method could be used for clinical examination and has potential to distinguish between *C. difficile* infection and asymptomatic colonization with *C. difficile*.

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
福田靖	Bacteriology II, National
Tadashi Fukuda	Institute of Infectious
柴山恵吾	Diseases
Keigo Shibayama	
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

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、抗菌薬使用ガイドラインもないため、抗菌薬の使用の乱用・多用が懸念され、従って *C. difficile* 感染症(CDI)症例数が多いと推測される。しかし、CDIの臨床検査はまったく行われていないため、その感染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。

一方、欧米では特に 2000 年以降の症例数の急激な増加に伴い、CDI は、いっそう注目されている。世界各地で米国をその発生源と報告される高病原性株 BI/NAP1/027 の分布や伝播を含めて、疫学的検討が進んでいるところであるが、ベトナムを含め、アジアにおける CDI の疫学については非常に情報に乏しい。本研究では、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、その臨床背景も含めて検討し、感染実態を調査する足がかりとする。

C. difficile は、重症感染症を引き起こすことがある反面、無症候キャリアも多く、診断が難しい場合が少なくない。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。

B. 研究方法

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査シ

システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学

- (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、Tropical Infectious Hospital、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、およびBac Mai Hospitalとのネットワーク構築を行い、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、および、2013年10月27日から11月1日まで、研究分担者がベトナムへ出張しNIHEを訪問した。研究分担者が実験室現場で、実際の実験内容について確認作業を行い、さらに、今後の研究計画について話し合った。また、協力医療機関のうち、National Hospital of Geriatrics、Dong Da Hospital、およびBac Mai Hospitalを訪問し、医師との意見交換および病棟内の見学をした。
 - (d) NIHEにおいて分離した*C. difficile* 17菌株からのDNA抽出サンプルが、国立感染症研究所へ送付され、国立感染症研究所において、PCRによる毒素遺伝子検出、PCR ribotypingを行った。
 - (e) NIHEにおいて分離された*C. difficile* 36菌株がNIIDに送付され、同定確認と毒素遺伝子検出を行った。
2. 新しい細菌学的検査法の開発
- (a) RT-PCRによって栄養型の毒素産生性*C. difficile*だけを選択的に検出する方法の開発を行った。まず、毒素遺伝子検出のRT-PCR条件検討を行った。PCR primerはtoxin A遺伝子配列から選んだプライマー、NK3-NK2 (J Clin Microbiol, 1991, 29, 33-7)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、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*を含む便検体を調製して実験を行った。各検体からRNAを抽出し、(a)で得られた結果を元にRT-PCRを行った。
 - (c) 44臨床検体からRNAを抽出し、RT-PCRを行った。従来の検査法である毒素産生性*C. difficile*分離培養法、酵素抗体法によるグルタメートデヒドロゲナーゼ(GDH)検出、酵素抗体法による糞便中毒素(toxin A/toxin B)検出および、PCR法による毒素遺伝子検出の4法による結果と比較した。

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とハノイにおけるCDI分子疫学
 - (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4医療機関入院症例から採取した糞便検体の収集と、NIHE研究室において*C. difficile*の分離培養が開始された。最初の2例は症例報告がなされた。
 - (c) NIHE研究室では、NIHEにおける実験結果と国立感染症研究所における実験結果の乖離を中心に、基本的技術ステップを見直し、一部実験プロトコルを改訂した。医療機関では、ひとつのベッドが複数の患者により共用され、標準予防策が十分に行われることができない状況であった。
 - (d) NIHEより送付されたDNA抽出物17サンプルにおいて、5サンプルがtoxin A陽性toxin B陽性、5サンプルがtoxin A陰性toxin B陽性、6サンプルがtoxin A陰性toxin B陰性であり、残りの1サンプルはPCRによって同定できなかった。Binary toxin遺伝子が検出されたサンプルはなかった。toxin A陽性toxin B陽性と同定された5サンプルのうち、3サンプルで同一バンドパターンを認めたが、日本で頻繁に分離されるタイプではなかった。この3サンプル(3株)は異なる3医療機関由来であった。toxin A陰性toxin B陽性と同定された5サンプルのうち4サンプルで、PCR ribotype 017と同一パターンであった。
 - (e) NIHEにおいて分離された*C. difficile* 36菌株においてPCRによる毒素遺伝子検出を行ったところ、binary toxin遺伝子陽性株は認められなかった。Toxin A陽性toxin B陽性が13株、toxin A陰性toxin B陽性株が10株、toxin A陰性toxin B陰性株が13株であった。医療機関別では、Tropical Infectious Hospitalではtoxin A陰性toxin B陽性株が多く、Bac Mai Hospitalではtoxin A陽性toxin B陽性株が多かった(表1)。
2. 新しい細菌学的検査法の開発
 - (a) *C. difficile*毒素遺伝子検出の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(図1)。
 - (b) 便検体から直接RNAを抽出する方法として、フェノール・クロロホルムによる抽出法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(図 2)。

- (c) 検討した 44 検体中、12 検体で 5 検査法すべてにおいて陽性、22 検体で 5 検査法すべてにおいて陰性であり、計 34 検体で結果が一致した(表 2)。3 検体では酵素抗体法による結果のみが陰性であった。4 検体において、PCR 陽性、毒素産生性 *C. difficile* 分離培養陽性、酵素抗体法による GDH 検出陽性であったが、酵素抗体法による毒素陰性であり、RT-PCR による毒素遺伝子検出も陰性であった。残る 3 検体では GDH のみ検出され、毒素陰性 *C. difficile* が分離された。

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とハノイにおける CDI 分子疫学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った。特に、NIHE が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たことは非常に評価できる。一方、基本的な細菌学的実験技術は、継続して見直していく必要があると考えられた。

欧米では、2000 年以降の高病原性株 BI/NAP1/027 による大流行が注目されている。BI/NAP1/027 株は、フルオロキノロン耐性獲得を含む遺伝子変異が認められた菌株が、米国をその発生源として世界中に伝播していき、疫学的に大きな影響を及ぼしたとされている。ハノイ市内の 4 医療機関分離株では現在のところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められておらず、binary toxin 陽性の BI/NAP1/027 株が流行している可能性は低いように考えられる。しかし、検討菌株数が少なく限られたデータであるが、検討された toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 5 菌株中 3 株が同一タイプで、現在まで欧米や日本で流行株として報告されたタイプではなかったこと、さらに、本 3 株は異なる 3 医療機関由来であったことが注目された。抗菌薬適正使用がなされておらず、病棟病床が過密で有効な感染対策が困難なハノイの医療機関が、CDI の温床になっていることは想像に難くない。新しい高病原性株の発生源・温床となりうるハノイ市内の医療機関における調査は、アジア、世界にとっても重要であると考えられた。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

CDI であるのか、他の原因で下痢・腸炎で同時に *C. difficile* を消化管保有しているだけであるのかを細菌学的検査によって区別できれば、治療を考える上で有用である。近年、real-time PCR などにより糞便中毒素遺伝子を検出するキットが利用されはじめているが、無症候キャリアにおいても陽性結果が出るため過剰診断ではないかという報告が認められる。検討症例数を増やし、臨床病態との関連を調べる必要があるが、本研究で開発した RT-PCR により糞便中の毒素 RNA を検出する方法は、CDI と無症候キャリアを区別しうる画期的な検査法と考えられた。

E. 結論

NIHE とハノイ市内の 4 医療機関がネットワークを構築し、今まで情報のなかったベトナムにおける CDI の感染実態および分子疫学についての調査検討が開始された。

RT-PCR によって栄養型の毒素産生性 *C. difficile* だけを選択的に検出する方法の開発を行った。本法は、*C. difficile* による感染症と無症候キャリアを区別しうる画期的な新規検査法と考えられた。

F. 健康危機情報

C. difficile は米国 CDC から“urgent threat”として警告されている。CDI アウトブレイク発生の条件がそろっているベトナムにおいて、CDI 感染実態を調べることは urgent であると考えられた。

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

1. Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Keigo Shibayama. Rapid detection method of live *Clostridium difficile*. 4th International *Clostridium difficile* Symposium. Slovenia, 2012 Sept.
2. 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 回日本環境感染学会総会 横浜 2013 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. ハノイ市内 4 医療機関で分離された 36 菌株の毒素産生性検討結果

Hospital	Toxin production of isolates			Total
	A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺	A ⁻ B ⁻	
National Geriatric Hospital	2*	1	3	6
Tropical Infectious Hospital	1	5	5	11
Đống Đa Hospital	1	1	1	3
Bạch Mai Hospital	9	3	4	16
Total	13	10	13	36

A⁺B⁺, toxin A-positive, toxin B-positive; A⁻B⁺, toxin A-negative, toxin B-positive; A⁻B⁻, toxin A-negative, toxin B-negative; *number of isolates recovered.

図 1. 異なる量の RNA を添加して行った RT-PCR の結果

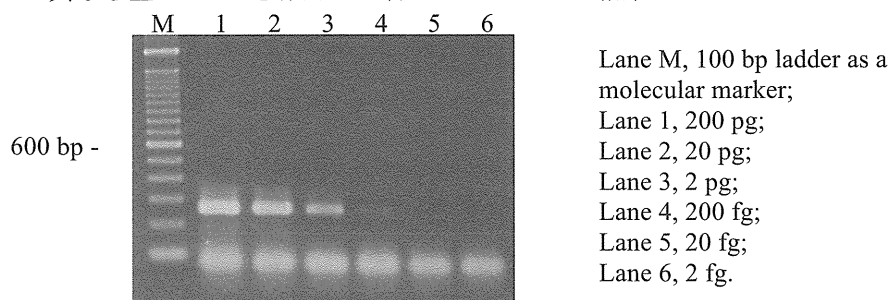


図 2. 栄養型、芽胞、死菌の *C. difficile* を含む糞便検体から抽出した RNA における RT-PCR の結果

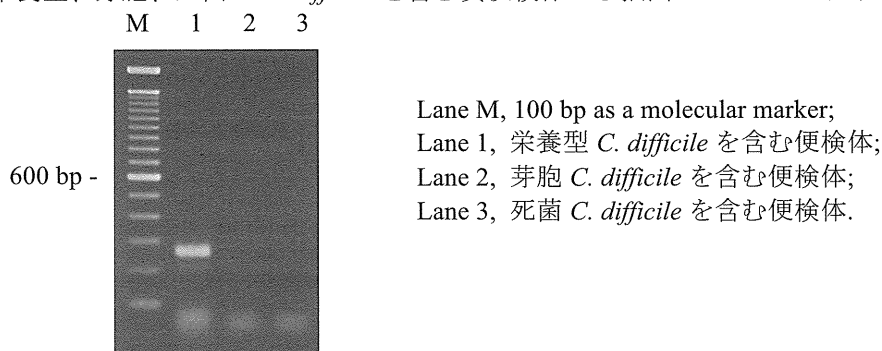


表 2. 44 臨床検体における RT-PCR および PCR による *tcdA* 検出、毒素産生性 *C. difficile* 培養、酵素抗体法による GDH および毒素(toxins A & B)検出結果の比較

Number of stool specimens	RT-PCR	PCR	Toxigenic culture	EIA for	
				GDH	Toxins A/B
12	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
1	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-
3	-	-	-	+	-
22	-	-	-	-	-

GDH, glutamate dehydrogenase; * non-toxigenic *C. difficile* was isolated from 3 specimens.

平成23～25年度業績

* 研究成果の刊行に関する一覧表

* 学会発表一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成25年度)

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行 年
Wachino J, Matsui M, Hoang TH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K.	Evaluation of a Double-Disk Synergy test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii	Jpn J Infect Dis		in press	2014
Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyoizumi-Ajisaka H, Kamachi K.	Bronchitis caused by <i>Bordetella holmesii</i> in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection.	J Infect Chemter,	19	534-7	2013
Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K.	Simple and specific detection of <i>Bordetella holmesii</i> by using a loop-mediated isothermal amplification assay.	Microbiol Immunol	56	486-9	2012
麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優 二, 手塚貴文, 塚田弘樹	血液培養から分離された <i>Brucella melitensis</i> の一症例	医学検査	61(5)	902-907	2012
Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H.	Cutting Edge: <i>Brucella abortus</i> exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor.	J. Immunol.	189	1540-1544	2012
今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉	台湾におけるブルセラ症-33 年ぶりの患者報告と届出疾患 へー	病原微生物検 出情報	33(7)	193-194	2012
今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋	ブルセラ症-ブルセラ症検査マ ニュアル-2012	病原体検査マ ニュアル			2012
今岡浩一	ブルセラ症の現状	化学療法の領 域	28(12)	138-148	2012
水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳 子, 松村藍, 山本智美, 木村昌	東京都における犬の抗 <i>Brucella canis</i> 抗体保有状況	日本獣医師会 雑誌	67(3)	(in Press)	2014

伸, 今岡浩一					
Morita M., Yamamoto S., Hiyoshi H., Kodama T., Okura M., Arakawa E., Alam M., Ohnishi M., Izumiya H., Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiology and Immunology	57(5)	334-339	2013
Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, Toru Shigeoka, Takayuki Tominaga, Toshiaki Kamei, Masahiro Honda, Daisuke Ninomiya, Takenori Sakai, Noriyo Nagata, Harutaka Katano, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo.	The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan.	Journal of Infectious Diseases,		in press	2014
Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T.	A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit.	Jpn J Infect Dis.	66(6)	564-6	2013
Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S.	A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with Fab from neutralizing antibody.	J Virol.	87(21)	11363-70	2013
Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H.	Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction.	PLoS Pathog.	9(7)	e1003511	2013
Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T	Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan.	Jpn J Infect Dis.	66(3)	260-1	2013
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K,	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by	J Virol	87	701-705	2012

Koyanagi Y	experimental-mathematical investigation.				
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011.	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T.	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T	Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996–2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells.	Jpn J Infect Dis	64	167-168	2011
Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H	Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1.	J Gen Virol	92	287-291	2011
Shimizu H et al. (分担執筆)	A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)	WHO report			2011
Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S.	Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an	Antiviral Res.	91	64-71	2011

	intrabody against the viral phosphoprotein.				
Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G, Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., Dinh, K.X., Nguyen van D., Phan X.T., Pham Q.B., Nguyen H.T. and Nguyen T.H.H.	Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009)	Jpn.J.Infect.Dis	64	391-396	2011
Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A.	Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice.	Jpn.J.Infect.Dis	64	463-472	2011
Yamada K., Park C.-H., Noguchi K., Kojima D., Kubo T., Komiya N., Matsumoto T., Mitsui M.T., Ahmed K., Morimoto K., Inoue S., Nishizono A.	Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus.	Virus Res.	165	34-45	2012
M. Kai, N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda and M. Makino.	Characteristic mutations found in the ML0411 gene of <i>Mycobacterium leprae</i> isolated in Northeast Asian countries.	Infection, Genetics and Evolution	Vol. 19	200-204	2013
Nakata N., Kai M., Makino M.	Mutation Analysis of Mycobacterial <i>rpoB</i> Genes and Rifampin Resistance Using Recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Antimicrobial Agent Chemother.	Vol.56	2008-2013	2012
Maeda Y., Tamura T., Fukutomi Y., Mukai T., Kai M., and Makino M.	A lipopeptide facilitate induction of <i>Mycobacterium leprae</i> killing in host cells	PLoS Neglected Tropical Diseases	5	e1401	2011
Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T.	FTA Card Utility for PCR Detection of <i>Mycobacterium leprae</i> .	Jpn J Infect Dis	Vol. 64	246-248	2011
Kai M., Ngvyen Phvc N. H.,	Analysis of drug-resistant strains	Clin Infect Dis	52	e127-e132	2011

Ngvyen H. A., Pham T. H., Ngvyen K. H., Miyamoto Y., Maeda Y., Fukutomi Y., Nakata N., Matsuoka M., Makino M., and Ngvyen T. T.	of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.				
Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V.	Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of <i>Mycobacterium leprae</i> drug resistance mutations and strain types.	J Clin Microbiol	Vol.50	742-753	2011
Kai M. Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K.	Leprosy chapter 9 Serology.	Tokai University Press		108-115	2011
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K,, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M.	The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.	J Virol.	87	3583-6	2013
Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M.	Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells.	J Virol.	87	4683-93	2013
Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK , Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	Oct 31		2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3)	268-70	2012
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4)	705-10	2012
Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M.	The SI Strain of Measles Virus Derived From an SSPE Patient Possesses Typical Genome Alterations and Unique Amino Acid Changes that Modulate	J Virol.	Sep 14		2011

	Receptor Specificity and Reduce Membrane Fusion Activity.				
Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP.	A simple approach to obtain comparable <i>Shigella sonnei</i> MLVA results across laboratories.	Int J Med Microbiol.	303(8)	678-84	2013
Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.	Genomic analysis of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg Infect Dis.	19(5)	823-5	2013
Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiol Immunol.	57(5)	334-9	2013
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT.	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	J Clin Microbiol.	51(1)	373-4.	2013
Chowdhury G, Pazhani GP, Dutta D, Guin S, Dutta S, Ghosh S, Izumiya H, Asakura M, Yamasaki S, Takeda Y, Arakawa E, Watanabe H, Mukhopadhyay AK, Bhattacharya MK, Rajendran K, Nair GB, Ramamurthy T.	<i>Vibrio fluvialis</i> in patients with diarrhea, Kolkata, India.	Emerg Infect Dis.	18(11)	1868-71	2012
Sithivong N, Morita-Ishihara T, Vongdouangchanh A, Phouthavane T, Chomlasak K, Sisavath L, Khamphaphongphane B, Sengkeoprasedth B, Vongprachanh P, Keosavanh O, Southalack K, Jiyong L, Tsuyuoka R, Ohnishi M, Izumiya H.	Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010.	Emerg Infect Dis.	17(11)	2060-2	2011
Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamamoto S, Arakawa E, Ohnishi M.	Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic <i>Vibrio</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , and <i>Vibrio</i>	MolCell Probes.	25(4)	174-6	2011