

Rhodococcus equi の増殖過程における形態観察と PBPs との関連性

分担研究者 西野 武志 京都薬科大学教授

研究要旨

R. equi の増殖時における形態変化、またこれらの形態変化と細胞の成長・分裂・形態変化に関与するペニシリン結合蛋白質（PBPs）との関連性について検討した。まず、*R. equi* の増殖時の形態変化を観察したところ、観察開始時は球状であった *R. equi* は 5 時間目付近までに伸長化、その後 24 時間目まで分裂、そして 24 時間目以降は再び球状になるという形態変化が観察された。次いで、透過型電子顕微鏡を用いて増殖時の形態変化の様子を観察したところ、本菌の隔壁形成が終了し分裂する際、菌体内でまず **splitting system** が作用した後 **cutting system** が作用していると思われる像が観察された。また、増殖時の形態に特徴をもつ時点の *R. equi* PBPs プロフィールを検討したところ、どの時点の PBPs も大差は見られなかった。

A. 研究目的

Rhodococcus equi は仔馬の化膿性肺炎や腸炎の原因菌とされる通性細胞内寄生性のグラム陽性菌である。本来ヒトには感染しないとされていたが、近年 AIDS 患者に結核と酷似した新たな日和見感染症をもたらす原因菌として注目されており、AIDS 患者の多い国では社会的にも関心が持たれつつある。今回私どもは *R. equi* の増殖時における形態変化、またこれらの形態変化と細胞の成長・分裂・形態変化に関与する **penicillin binding protein**（PBPs）との関連性について検討した。

B. 研究方法

2 菌株として *R. equi* の標準株 4 株及び臨床分離株 2 株を用い、β-ラクタム薬の感受性測定、増殖曲線、微分干渉顕微鏡および透過型電子顕微鏡による形態観察そしてペニシリン結合蛋白質（PBPs）に対する親和性について検討を行った。（倫理面に関しては、大学の倫理規定を遵守し行った）

C. 研究結果および考察

R. equi ATCC6939 の増殖時の形態変化を、微分干渉顕微鏡を用いて観察した。その結果、観察開始時は球状であった *R. equi* は 5 時間目付近までに伸長化（誘導期）、その後 24 時間目まで分裂（対数増殖期）、そして 24 時間目以降は再び球状（定常期）になるという形態変化が観察された。また菌体の伸長開始時点の形態には主に桿状及び紡錘状の 2 種類が存在し、分裂は常に伸長化した菌体の 1 カ所で行われるとは限らず、伸長化した菌体の中央以外にも分裂部位の存在が観察された。次いで、透過型電子顕微鏡を用いて増殖時の形態変化の様子を観察した。誘導期前半において **stripping system**（剥離系）が作動し、そこから菌体が伸長化していた。誘導期から対数増殖期に移行する時点の菌体には隔壁の形成が見られ、この隔壁形成の位置は微分干渉顕微鏡の結果と同様に伸長化した菌体の様々な位置に形成されており、また完全な隔壁が菌体内に複数存在しているものも観察できた。対数増殖期の菌体からは、本菌の隔壁形成が終了し分裂する際、菌体内でまず **splitting system**（分離系）が作用した

後 cutting system (切断系) が作用していると思われる像が観察され、また 2 つの菌体は cutting system が作用した部分から徐々に菌体が丸みを帯び球状面を形成しながら分裂していく様子が確認された。次に、*R. equi* の標準株 4 株及び臨床分離株 2 株に対する β - lactam 系抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定及び β - lactamase 検出試験を行ったところ、標準株を含まない菌も β - lactamase 非産生にも関わらず carbapenem 系抗菌薬以外には低い感受性を示した。また、増殖時の形態に特徴をもつ時点の *R. equi* ATCC6939 の PBP_s プロフィールを検討したところ、どの時点の PBP_s も大差は見られなかった。また MIC 測定において 6 株のうち ATCC6939 より全般的に低い感受性を示した ATCC33702 と臨床分離株 SP187 の PBP_s プロフィールを検出したところ、ATCC33702 における PBP 4 より高分子側に位置する PBP 様バンドが他の菌株とは異なっており、この PBP 様のバンドの変化が ATCC33702 株の β - lactam 系抗菌薬に対するさらなる低感受性をもたらす可能性が示唆された。

E. 結語

以上の結果より *R. equi* は常にあらゆる PBP_s を発現することにより独特な形態変化を伴った分裂をもたらす、そしてこのことが *R. equi* の全般的な β - lactam 系抗菌薬に対する低感受性をもたらす要因ではないかと推測された。

F 健康危険情報

特になし

G. 論文発表

特になし

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
（分担）研究報告書

インフルエンザ関連脳症における前駆症状の特徴と全国調査から判明した治療法

分担研究者： 横田俊平 横浜市立大学大学院医学研究科

研究要旨

本研究は、インフルエンザ関連脳症の特徴である2点、第1点は特異な前駆症状、第2点には局所的（脳内）および全身性の cytokine storm について考察し、小児科医の常駐する全国約3,500施設の患者調査を踏まえての治療法確立を目指した。インフルエンザ脳症は、インフルエンザ流行期に乳幼児を中心に発生し、全身系のサイトカイン・ストームに移行することにより致死的状态に至ることが明らかになった。治療方法として頻用されている大量 γ -グロブリン療法とステロイド・パルス療法について統計的解析を行い、発症早期にステロイド・パルス療法を適用することが予後の改善に効果的であることが明らかになった。

A. 研究目的

インフルエンザの流行期に、急性脳炎・脳症が多発することに注目され始めたのは1990年代中ごろのことである。やがてインフルエンザ・ウイルスの感染そのものと密接な関連のあることが証明され、1998年から「インフルエンザ関連脳症」として1つの疾患単位として認識されるようになった。以後、毎年の調査により年間100~200例の病児が集計されてきた。

インフルエンザ脳症の発症は0~5歳児が全体の約85%を占め、死亡例は約30%、介助を必要とする重度後遺症は約10%、軽度後遺症約15%と、予後が著しく不良であることから、診断、治療とも緊急の課題としての取り組みがすすめられた。2000年には、それまでに効果的であると報告された治療方法を記載した「インフルエンザ脳炎・脳症の特殊治療法」を全国の病院に配付した。その後、社会的認識の深まりとともに最近の死亡例は約15%に減少したが、依然として重度後遺症例は多く、今後の積極的な対策を必要としている。

疾患の発症病理の解明もわずかずつではあるが進歩を遂げており、とくに髄液中に過剰な炎症性サイトカインが産出され、死亡例の多くは全身

的な高サイトカイン血症を呈していることも明らかにされた。しかし、依然解決すべき問題も多い。この新しい疾患はなぜ日本人に多く発症するのか、発症者がなぜ5歳以下の乳幼児に集中しているのか、インフルエンザの発症から中枢神経系症状の発現までなぜ短時間で進行するのか、さらに本質的には、本症の発症機転はなにか、中枢神経系の障害を回復させるにはどのような特殊治療法が効果的なのか、またその方法はなぜ効果を発揮できるのか、などの疑問が呈されている。

本研究は、本症の特徴である2点、第1点は特異な前駆症状、第2点には局所的（脳内）および全身性の cytokine storm について考察し、全国調査の結果を踏まえて治療法の確立を行うことを目的とした。

B. 研究方法

小児科医の常駐する全国約3,500施設に患者調査票を配布し、発生した症例の記載を依頼した。対象は、1)迅速診断法または培養法によりインフルエンザ・ウイルスの感染が証明され、2)けいれん、意識障害などの神経症状を呈した小児である。患児の年齢分布、発生時期などについてはすでに

報告しており、今回はとくに経過にしたがって選択された治療法を経時的に記載した結果を検討した。患児がどのような臨床経過をとり、どのような治療法が選択され、どのような効果を挙げたかを多変量解析を用いて検討した。

前駆症状の存在はこれらの調査からは判らず、本症で子どもを亡くした家族の会（“ちいさないのち”）の会員へのアンケートから判明したので、その調査を基礎に神経学的解析を加えた。

C. 研究結果および考察

1. 臨床経過

臨床症状の経過は本症に特徴的であり、かつ比較的多くの症例が同一の経過をとっていた。すなわち、高熱に始まり、前駆症状を呈し、その数時間後にはけいれん、意識障害に至り、受診時（多くは救急搬送）の血液検査値は、神経症状の発現から検査までの経過時間によりさまざまであったが、受診時には比較的軽度な異常値であったものが、数時間後には著しい異常値へと変化しており、病的変化が短時間のうちに進行している実態が明らかになった（Fig. 1）。

検査異常値は、血小板数の低下、AST、LDHの上昇に表現され、やがて凝固障害が進行し、意識障害は持続したまま播種性血管内凝固症候群に至り、さらに多臓器不全に移行し、死に至るか、重度後遺症を残す経過をとっていた。アンモニアの上昇、低血糖所見はなくライ症候群と考えられる例は含まれてはいなかった。

画像検査では頭部CTスキャンが用いられ、多くの例では重篤な脳浮腫所見を呈し、一部は急性壊死性脳症、乳児出血性脳症の所見を呈していた。

髄液検査では細胞増多、低糖、高蛋白はなく、脳炎ではなく、脳症であることが確認された。また髄液中のIL-6、IL-1 β 、TNF α などの炎症性サイトカインは、検査が行われた例ではいずれも著増していた。

剖検所見には特異的な所見はなく、髄液、脳組織にはインフルエンザ・ウイルスは検出されないことが一般的であった。

2. 前駆症状

本症ではけいれん、意識障害が生じる前に、特異な前駆症状の存在することが判明した（Table 1）。これらの症状はいずれも大脳辺縁系の異常な活性化を示唆するものであり、インフルエンザ・ウイルスの感染初期の辺縁系活性化の機序の解明が、インフルエンザ脳症の病態理解に重要であることを示唆している。

3. 治療効果の経時的解析

今回の調査の目的のひとつは、2001年に全国小児医療機関に配布した「インフルエンザ脳炎・脳症の特殊治療」により方法論的には治療法の統一化が促された状況から、治療法の効果について検討することであった。それぞれの治療方式については、方法本来の効果について検討を加え、選択が行われた（Table 2）。

2003/04シーズンおよび2004/05シーズンにおいて、多くの小児医療機関で用いられた治療法は(1)大量 γ -グロブリン療法、(2)ステロイド・パルス療法の2方法であった。特殊治療法に盛られた他の方法、脳低体温療法、血漿交換療法、大量AT-III療法などは、特殊な技術を要し、また保険医療上の問題などから採用した施設はごく限られたものであった。

そこで大量 γ -グロブリン療法およびステロイド・パルス療法の効果について解析を行った（Table 3）。全146例について入院第1病日、2病日、3病日およびそれ以降に適用された場合の改善率をみると、大量 γ -グロブリン療法では、第1病日に適用された例では13例中12例が改善を認め、1例が重度後遺症・死亡に至った。第2病日に適用された例では19例中11例が改善、8例が重度後遺症・死亡に至った。第3病日またはそれ以降に適用された例では12例中8例が改善、4例が重度後遺症・死亡に至った。大量 γ -グロブリン療法は早期投与により改善を認める統計学的な有意差は認められなかった。一方、ステロイド・パルス療法では、第1病日には9例

中9例とも改善し、第2病日には11例中6例が改善、第3病日またはそれ以降には9例中2例が改善した。統計学的にはp値0.003の有意差をもってステロイド・パルス療法の効果が明らかになった。

E. 結語

インフルエンザ脳症は、インフルエンザ流行期に乳幼児を中心に発生する疾患である。この病態生理的解析から脳内のサイトカイン・ストームが生じ、やがて脳血管門の破綻を来して全身系のサイトカイン・ストームに移行することにより致死的状态に至ることが明らかになった。

したがって治療方法もこの病態移行に対して実施すべきであることは明らかである。私たちの提案した特殊治療の普及に伴い致死率の半減を認めたが、今回さらに、頻用されている大量 γ -グロブリン療法とステロイド・パルス療法について統計的解析を加えたところ、発症早期にステロイド・パルス療法を適用することが予後の改善に効果的であることが明らかになった。

ステロイドは血管から脳血管門を透過することが明らかにされており、このため脳内サイトカイン・ストームの抑制に関わることが推察され、本法の著しい効果を生じているものと考えられる。他方、ヒト γ -グロブリンは分子量約16万 dalton であり、一般的には脳血管門を透過できないため、一定の有意な効果を得られなかったものと思われる。

今後は、大脳辺縁系の異常活性化と考えられる「異常言動」につき病態との関連を追及し、さらに積極的な治療方法の開発につなげていくことを考えている。

F 健康危険情報

特になし

G. 論文発表

学会発表

1. Shunpei Yokota. Premonitory symptoms and

disease course of influenza encephalopathy. Acute Respiratory Panel, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. January 24-25, 2006. Galveston, USA.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Fig.1: Disease Course of Influenza Encephalopathy

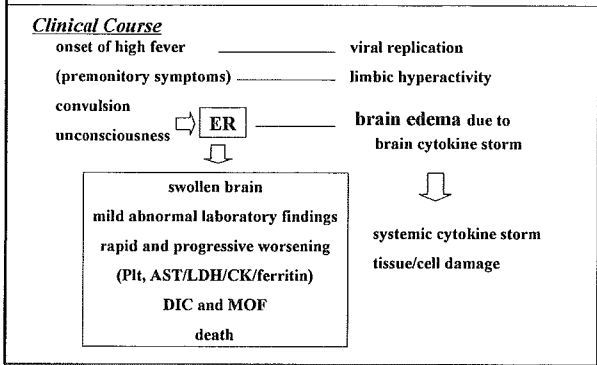


Table 1: Premonitory Symptoms

- ① biting his/her own finger and saying that it was a ham,
- ② looking at a TV screen, which was not on and saying, "there is a cat coming", with shivering,
- ③ frightened and shivering on the corner of the bed when a nurse came in the room as if they were seeing something scary,
- ④ shouting and crying out unrecognizable words,
- ⑤ suddenly talking like a baby and saying something nobody understood,

by Chiisana Inochi (Save the Littlechildren's Life)

→ Hyperactivation of Limbic System

Table 2: Therapy Strategy of Influenza Encephalopathy

<i>methods</i>	<i>possible mechanism</i>
① Intravenous γ -globulin	block cytokine storm
② Steroid-pulse Therapy	inhibit activated Mp/brain edema
③ Brain Hypothermia	treat brain edema/cytokine storm
④ Plasma Exchange	eliminate plasma cytokine
⑤ High-dose ATIII	inhibit DIC
⑥ Cyclosporine	inhibit MPT
⑦ Anti-viral agents	inhibit viral replication

Table 3: Intravenous Gamma-globulin and Steroid-Pulse Therapy

		prognosis				p value		
		recovered (No/%)		handicapped/death				
IVGG	Day 1	12	92.3%	1	7.7%	13	100%	0.105
	Day 2	11	57.9%	8	42.1%	19	100%	
	> Day 3	8	66.7%	4	33.3%	12	100%	
	total	31	70.5%	13	29.5%	44	100%	
Steroid-Pulse	Day 1	9	100.0%	0	0%	9	100%	0.003
	Day 2	6	54.5%	5	45.5%	11	100%	
	> Day 3	2	22.2%	7	77.8%	9	100%	
	total	17	58.6%	12	41.4%	29	100%	

Total: 146 patients

The earlier the pulses are initiated, the better the outcome is.

急増する呼吸器感染原因菌の薬剤耐性
－β-ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性(BLNAR)インフルエンザ菌－

分担研究者：千葉市立海浜病院診療局長 黒崎知道
（研究協力者：千葉大学大学院医学研究院小児病態学助手 石和田稔彦）

研究要旨

2001/02～200 呼吸器病原菌として重要なインフルエンザ菌の BLNAR の急増が明らかになった。しかし、臨床効果の検討ではペニシリン系薬剤での対応で大過なく、全身感染症治療の第一選択薬は局所感染症としての気管支肺感染症では保持すべきと考える。

A. 研究目的

呼吸器病原菌として重要なインフルエンザ菌の薬剤耐性の急増が言われている。耐性の実態と治療効果について検討し、適切な抗菌薬療法を模索する。

B. 研究方法

千葉市立海浜病院小児科で 2000 年から 2004 年に分離されたインフルエンザ菌 2008 株を対象として、抗菌薬、とくにアンピシリン(ABPC)耐性を検討した。

洗浄喀痰培養にてインフルエンザ菌が培地上 50%以上分離され、かつ塗抹標本で肺胞食細胞に接して存在する、もしくは好中球に貪食されている症例を対象に抗菌薬療法の効果判定をおこなった。臨床効果判定は、日本化学療法学会小児科領域抗菌薬感受性臨床試験における判定基準に従った。

C. 研究結果

β-ラクタマーゼ陰性で、かつ微量液体希釈法にて ABPC-MIC(最小発育阻止濃度)が 1 μg/ml 以下は感性(BLNAS)、2 μg/ml

は中間(BLNAI)、4 μg/ml 以上は耐性(BLNAR)とし、β-ラクタマーゼ陽性の耐性菌を BLPAR とすると、BLNAR の割合は、2000 年 2.2%、2001 年 11.5%、2002 年 19.3%、2003 年 23.0%、2004 年 30.3%と急増していた。しかし、BLPAR は 2000 年 10.9%から 2004 年 12.4%とほぼ横ばいであった。BLNAR はセフェム薬にも感受性が低下し多剤耐性をしめした。抗菌薬療法の検討では、入院時に原因菌が判明する前に ABPCiv を行った症例で BLNAR によるもの 42 例中 37 例 (88.1%) は ABPCiv 期間中に軽快傾向(有効以上)にあり、初期治療薬として ABPC は臨床的に大過がなかった。スイッチ療法としてピペラシリン(PIPC)、タゾバクタム・ピペラシリン(TAZ/PIPC)の臨床効果を検討したところ、PIPC では著効 5 例、有効 2 例、TAZ/PIPC で著効 9 例、有効 3 例、やや有効 1 例(RSV 感染合併例)であり、PIPC, TAZ/PIPC いずれも良好な治療効果を示した。しかし、治療終了直後に再燃し、洗浄喀痰培養でインフルエンザ菌が純培養された例があった。

インフルエンザ菌の細胞内寄生が言われている。単球細胞培養液にインフルエンザ菌を接種培養後、抗菌薬(PIPC、PIPC+マクロライド系薬)を投与し細胞内の菌数を計測したところ、後者の殺菌効果が高かった。今後さらに検討する予定である。

小児の洗浄喀痰培養にて分離された *Haemophilus influenzae* の各種抗菌薬感受性の年次推移。第54回日本感染症学会東日本地方総会 / 第52回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (2005.10.27-10.28)

D. 考察

臨床細菌学的に多剤耐性である BLNAR の増加は顕著であった。しかし、臨床効果の検討では、初期治療としての ABPCiv、スイッチ療法としての PIPC を含むペニシリン系薬剤を中心にした抗菌薬療法で大過はなかった。再燃の問題である細胞内寄生に関しては今後更なる検討をおこなう必要がある。

E. 結論

新規抗菌薬参入の期待できない今日、中枢神経感染症を中心とする全身感染症の第一選択薬になるセフトリアキソン(CTRX)、セフォタキシム(CTX)、メロペネム(MEMP)は気管支肺感染症では出来るだけ保持し、全身感染症に限定して大切に使用すべきである。

F. 健康危険情報 (略)

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

須藤扶佐代、石和田稔彦、星野 直ほか：
小児 *Haemophilus influenzae* 気管支肺感染症に対する piperacillin, tazobactam/piperacillin の臨床効果に関する検討。感染症学会雑誌 79: 637-643、2005。

2. 学会発表

牧野 巧、藤崎和仁、黒崎知道：

A 型・B 型インフルエンザに対するオセルタミビル投与時の臨床経過

分担研究者： 齋藤 玲子 新潟大学教育研究院医歯学系助手

研究要旨 2001/02～2004/5 年の 4 冬季インフルエンザ・シーズンに新潟市内 1 小児科を受診した小児にオセルタミビル（タミフル）を 3-5 日間投与し、A 型 B 型インフルエンザにおける解熱を投与群・非投与群間で比較した。4 シーズンを通じ、A 型インフルエンザ投与群は 301 名、B 型インフルエンザ投与群は 209 名、非投与 A 型群 30 名、非投与 B 型群は 66 名であった。単変量解析、多変量解析とも A 型、B 型治療群ではそれぞれの型の非治療群に比して有意な解熱効果をもとめ、平均病日（37.2℃以上の期間）の短縮がみられた。しかし、B 型投与群では A 型投与群に比して経過が遷延していた。有熱期間に影響する因子を線形分析で解析したところ、A 型感染、オセルタミビル治療、年齢が高いことは有意に病期を短縮させ、一方 1 病日の熱が高いことは病期を延長させた。性、ワクチン歴、シーズン、受診までの日数は有意差を持った影響はなかった。これらの結果より、オセルタミビルは A 型、B 型治療ともに有効であり、解熱期間を短縮させる効果があった。

A. 研究目的

インフルエンザの予防・治療に、M2 阻害剤と、ノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) が有効である。NAI はシアル酸同族体でインフルエンザウイルスの感染細胞からの遊離を阻害する。A 型・B 型インフルエンザに有効である。本邦では、オセルタミビル（タミフル®）とザナミビル（リレンザ®）が 2001 年より保険認可された。以来オセルタミビルは毎冬数百万人以上に処方され、世界に類をみない使用量である。それに比し、欧米では抗インフルエンザ剤の処方が少ないため、薬剤認可前後の研究を除けば、それ以降の薬剤臨床効果に関する報告は少なく、特に B 型インフルエンザに対する臨床報告はほとんどない。本邦では 2004-5 年シーズンに B 型インフルエンザが流行の主流となり、オセルタミビルが大量に使用された。そこで、本研究では A 型、B 型インフルエンザにオセルタミビルを投与し、治療群と非治療群に分け、特にこれまで報告の少なかった B 型イン

フルエンザに焦点をあて臨床効果を検討した。

B. 研究方法

2001/02～2004/5 年の 4 冬季インフルエンザ・シーズンに新潟市内 1 小児科を受診した小児に対してインフルエンザ迅速診断キットでスクリーニングを行い、A 型・B 型インフルエンザ陽性児に対して本人又は家族承諾後オセルタミビル（タミフル）を本邦の所要量（体重 32.5kg 以上 150mg/日、体重 32.5kg 未満 2 mg/kg/日）にて 3-5 日間投与した（投与群）。患者または保護者に依頼し、1 日 3 回（AM 9 時、AM 12 時、PM 8 時）の体温測定と頭痛、咳、咽頭痛、痰などの症状を 1 日 1 回、受診 5 日後まで記録した。投与を希望しなかった患者に対しても臨床経過記録を依頼した（非投与群）。なお、本調査は盲験試験ではない。

患者の咽頭・鼻腔ぬぐい液を採取し、当教室にてウイルス培養又は RT-PCR にてインフルエ

ンザ感染有無を確認した。この実験室的診断より、患者をA型投与群（以下OA）、A型非投与群（以下NA）、B型投与群（以下OB）、B型非投与群（以下NB）の4群にわけ、一日の平均体温について、シーズン、年齢、受診までの時間、ワクチン歴などの因子について単変量、多変量解析で比較し、タミフルの治療効果を評価した。

C. 研究結果および考察

4シーズンを通じ、OA群は301名、OB群は209名、NA群30名、NB群は66名であった。単変量解析では、熱の上がりは、OA、OB、NA、NB群の順で早く、それぞれの群で第2-4病日の平均体温に統計的有意差を認めた。平均病日（37.2℃以上の期間）はOA群3.2日、OB群3.8日、NB群4.3日で、統計的有意差を認めた。OB群はOA群に比して経過が遅延するものの、NBに比して解熱が早いことが示された。特にB型インフルエンザでの治療群の効果を確かめるため、37.2℃以上の病日を結果因子として、OA、OB、NB群の3群間で、性、年齢、来院までの日数、1病日の体温、シーズン、ワクチン歴を補正し、多変量解析を行った。1-5病日はOA群ではOB群に比し平均0.5℃熱が低く（ $p<0.01$ ）、0.88日有熱期間が短かった（ $p<0.01$ ）。それに比し、NB群ではOB群に比し、2-3病日は0.5℃熱が高く（ $p<0.01$ ）、0.61日有熱期間が長かった（ $p<0.01$ ）。このため、これらの因子を補正してもB型インフルエンザではタミフルにて有意に早く解熱することが示された。有熱期間に影響する因子を線形回帰で解析したところ、A型感染（0.65日、 $p<0.01$ ）、オセルタミビル治療（0.63日、 $p<0.01$ ）、年齢が高いことは有意に病期を短縮させ（1才年齢上昇につき0.04日、 $p<0.01$ ）、一方1病日の熱が高いことは病期を延長させた（1℃上昇につき0.43日、 $p<0.01$ ）。性、ワクチン歴、シーズン、受診までの日数は有意差を持った影響はなかった。これらの結果より、タミフルはA型、B型治療ともに有効であり、解熱期間を短縮させる効果があった。年齢や病初期の熱が経

過に影響することが示された。

E. 結語

NAI（特にタミフル）は、次のインフルエンザ世界大流行の際に重要な戦略の一つである。世界大流行を起こすのはA型インフルエンザであると言われているが、通常流行型のB型への臨床効果に関する検討は知見が少なく、重要である。本研究により、オセルタミビル投与の際、B型ではA型より経過が遅延し重症感を与えることが判明した。しかし、非投与群に比して、統計的に有意な熱の短縮が見られたことから、オセルタミビルはB型治療に有効であるといえる。その他、年齢や病初期の熱も経過に影響を与えていた。今回は熱型のみ解析であったが、今後患者の症状解析を詳細に行う予定である。

本口演に加え、2005年秋に長崎県で認められた特異的なインフルエンザ小流行について発表を行った。その際採取されたインフルエンザはA型香港型（H3N2）で、しかもすべてアマンタジン耐性であった。この長崎株はベトナムで同年に採取されたアマンタジン耐性インフルエンザウイルスとHA遺伝子特性がほぼ同一であり、アジアを中心にアマンタジン耐性インフルエンザウイルスが広がっていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 論文発表

1. 齋藤玲子, 鈴木宏. ヒトの鳥型インフルエンザの治療. *インフルエンザ*. 6:139-145. 2005
2. 齋藤玲子, 鈴木宏. 特集1 抗インフルエンザウイルス薬の効果と問題点. *抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの疫学. 化学療法の領域*. 21:1729-1734. 2005
3. 長谷川剛, 内藤眞, 江部祐輔, ヤデナー・キャウ, 齋藤玲子, 鈴木宏. ヤンゴン（ミャンマー）

3. その他 なし

におけるインフルエンザの発生状況
(2003.9-2004.10) . 新潟医学会雑誌.
119:257-262.2005

4. 鈴木宏, 坂井貴胤, 齋藤玲子, 菖蒲川由郷, 齋藤君枝.特集インフルエンザ.4. インフルエンザ伝播の特性～GISを用いた空間解析～. 医薬ジャーナル. 41:99-103.2005
5. 鈴木宏.インフルエンザと国際保健. インフルエンザ. 6:5-6.2005
6. Sato M, Saito R, Sakai T, et al.:Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. J Clin Microbiol. 43:36-40.2005
7. Sasaki A, Suzuki H, Saito R, et al.:Prevalence of Human Metapneumovirus and Influenza Virus Infections Among Japanese Children During Two Successive Winters. Pediatr Infect Dis J. 24:905-908.2005
8. Saito R, Paget J, Hitaka S, et al.:Geographic mapping method shows potential for mapping influenza activity in Europe. Eurosurveillance Weekly. 10:<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/051027.asp#051026>.2005

2. 学会発表

1. R.Saito, Danjuan Li, H.Suzuki, Chieko Shimomura, Hironori Masaki. Off-seasonal outbreak caused by amantadine resistant A/H3N2 in Japan. Acute Respiratory Panel, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. January 24-25, 2006. Galveston, USA.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sato M, Saito R, Saka i T, et al	Molecular epidemiology of r espiratory syncytial virus infections among children w ith acute respiratory sympt oms in a community over thr ee seasons.	J Clin Micr obiol	43	36-40	2005
Saito R, Paget J, Hit aka S, et al.	Geographic mapping method s hows potential for mapping influenza activity in Europ e.	Eurosurveil lance Weekl y.	10: http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/051027.asp#051026 .		2005
Sasaki A, Suzuki H, S aito R, et al.	Prevalence of Human Metapne umovirus and Influenza Viru s Infections Among Japanese Children During Two Succes sive Winters.	Pediatr Inf ect Dis J	24	905-908	2005
Hotomi M, Sakai KF, B illal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamanaka N.	Antimicrobial resistance in <i>Haemophilus influenzae</i> iso lated from the nasopharynx among Japanese children wit h acute otitis media.	Acta Otolar yngol	126(2)	130-137	2006
Sakai A, Hotomi M, Bi llal DS, Yamauchi K, Shimada J, Tamura S, Fujihara K, Yamanaka N.	Evaluation of mutations in penicillin binding protein- 3 gene of non-typeable <i>Haem ophilus influenzae</i> isolated from the nasopharynx of ch ildren with acute otitis me dia.	Acta Otolar yngol	125(2)	180-183	2005
Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujih ara K, Yamanaka N	Increase of macrolide-resis tant <i>Streptococcus pneumoni ae</i> -expressing <i>mefE</i> or <i>ermB</i> gene in the nasopharynx amo ng children with otitis med ia.	Laryngoscop e	115(2)	317-320	2005

Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T	Usefulness of the Japanese Respiratory Society guidelines for community pneumonia : a retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a general hospital.	Respirology	10	208-214	2005
Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLH, Anh NTH, Huong VI, Phuong HVM, Thi PT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K.	A comparative molecular analysis of <i>Haemophilus influenzae</i> among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam.	J Clin Microbiol	43	2474-2476	2005
Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Guio H, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Oishi K, and Nagatake T.	Molecular analysis of intra-familial transmission in <i>Moraxella catarrhalis</i> .	Int J Med Microbiol	295	187-191	2005
大石和徳	肺炎球菌ワクチン-5年後の再接種の是非-	呼吸器科	8(1)	68-72	2005
大石和徳	細菌性肺炎(肺炎球菌性肺炎を中心に)	日本内科学雑誌	94(11)	2256-2260	2005
大石和徳	肺炎球菌性肺炎とその対策	臨床と研究	82(12)	1983-1986	2005
Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H	Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks.	Arch Virol	150	1383-1392	2005
Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T	In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus.	J Gen Virol	86	1131-1139	2005
Takeda S, Sbagyo A, Sakoda Y, Ishii A, Sawamura M, Sueoka K, Kida H, Mukasa K, Matsu moto K	Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen-antibody interaction.	Biosensors and Bioelectronics	21	201-205	2005

Bai G, Sakoda Y, Mweene AS, Yamada T, Minakawa H, Kida H	Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza.	Microbiol Immunol	49	1063-1067	2005
Bai G, Sakoda Y., Mweene AS, Fujii N, Minakawa H and Kida H	Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either Influenza A or B Virus infections.	J Vet Med Sci	68	35-40	2006
Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park C-H, Sundén Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H	Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens	Microbiol Immunol	50	73-81	2006
Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H	Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals.	Arch Virol	(in press)		
Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T.	Rapid diagnostic methods for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification	J. Clin. Microbiol	43	1625-1631	2005
Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H	A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002.	J. Med. Virol	76	241-247	2005
Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, Nakayama T	A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP).	J. Med. Virol	76	406-413	2005
Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Teclé T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song J-W, Kang C, Rota PA, Xu W, Featherstone D.	Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. Arch	Virol	(in press)		

Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T	Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroup-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP).	J. Med. Virol	77	121-127	2005
Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H	The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype.	Vaccine	(in press)		
Uejima H, Nakayama T, Komase K	Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain.	Vaccine	(in press)		

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Infections among Children with Acute Respiratory Symptoms in a Community over Three Seasons

Mizuho Sato,¹ Reiko Saito,¹ Takatsugu Sakai,¹ Yasuko Sano,² Makoto Nishikawa,³ Asami Sasaki,¹ Yugo Shobugawa,¹ Fumitake Gejyo,⁴ and Hiroshi Suzuki^{1*}

Division of Public Health, Department of Infectious Control and International Medicine,¹ and Division of Clinical Nephrology, Rheumatology, Respiratory Medicine and Infection Control and Prevention,⁴ Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Sano Clinic,² and Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences,³ Niigata, Japan

Received 13 May 2004/Returned for modification 6 July 2004/Accepted 2 September 2004

To study the molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) in a community, children with acute respiratory symptoms at a pediatric outpatient clinic in Niigata, Japan, were analyzed over three seasons from November 2001 to July 2004. Of 499 nasopharyngeal aspirate specimens, 185 (37.1%) were RSV positive, and only 8 (4.5%) of 177 patients were shown by the reverse transcription (RT)-PCR method to be reinfected. RSV infection occurred beginning in the early winter, and the rates declined in the spring. The predominant subgroup changed from A to B and returned to A over the three seasons. Phylogenetic analysis also revealed that multiple genotypes cocirculated each year, with genotype GA5 of subgroup A predominating in the 2001-2002 and the 2003-2004 seasons. A new genotype of subgroup B (named BA, according to the nomenclature for viruses) with a 60-nucleotide insertion in the second variable region of the attachment glycoprotein was predominant as an emerging strain in the 2002-2003 season, but this was not associated with new epidemiological or clinical features, unlike the cases of disease caused by other genotypes in the other seasons. In conclusion, our molecular analysis of RSV confirms that multiple genotypes cocirculate each year and that the genotype predominating may shift with the season. Support for determination of the genotype by RT-PCR as an effective tool for characterization of RSV circulation patterns in the community is provided.

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of serious acute lower respiratory disease in infants and young children and is found mainly in the late fall, winter, and spring (2, 8, 13, 15). Bronchiolitis and pneumonia are observed most frequently during the first few months of life (2, 8, 17). Almost all children are infected with RSV by age 2 years, and half have experienced two infections (8, 11, 17).

RSV strains have been classified into antigenic groups A and B (RSV-A and RSV-B, respectively) on the basis of the reactivities of the viruses with monoclonal antibodies directed against the attachment glycoprotein (G protein) (1, 7, 12, 19) and also by genetic analyses (9, 25, 26). G protein is the most variable RSV protein (10, 14, 19), and its C-terminal region (the second hypervariable region) accounts for strain-specific epitopes (3, 4, 6, 9, 14, 22, 23). The molecular epidemiology and evolutionary patterns of G protein have provided important information about the clinical and epidemiological features of RSV: several different genotypes cocirculate, and the one that predominates in a community every year may change (5, 21, 22, 28). However, the importance of strain diversity to the clinical and epidemiological features of RSV has yet to be elucidated in detail.

Our objectives in the present study were to clarify the mo-

lecular epidemiology of RSV in a community over three seasons, determine the relationship between genotypes and circulation patterns, and assess clinical features and repeated infections.

MATERIALS AND METHODS

Study population and clinical samples. The study was conducted over three seasons from November 2001 to July 2004 at one pediatric outpatient clinic in Niigata City, Japan. Niigata City is the prefectural capital of Niigata Prefecture, and its total population is approximately 0.5 million. The clinic had an average of 2,300 patient visits per month during the study periods. Children with acute lower respiratory symptoms, such as wheezing, cough, rhinorrhea, and fever, were evaluated for RSV infections; and their clinical data were recorded at the clinic. Informed consent was obtained from all patients or their families. This study was approved by the medical faculty ethics committee of Niigata University.

Nasopharyngeal aspirates were obtained from the patients and were stored at 4°C in the clinic. The specimens were transported to the Department of Public Health, Niigata University School of Medical and Dental Sciences, within 5 days of sampling and were kept frozen at -80°C until further examination.

RT-PCR and nucleotide sequencing. Viral RNA was extracted from 100- μ l samples of the nasopharyngeal aspirates with 500 μ l of Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.) in 100 μ l of chloroform and centrifuged. RNA from the upper aqueous phase was precipitated with 100% isopropanol and purified with ethanol. Reverse transcription (RT) was then performed for cDNA synthesis by using 3 μ g of random primers (Invitrogen Corp.) and 200 U of Moloney murine leukemia virus (Invitrogen Corp.) by incubation at 37°C for 1 h.

First and heminested PCRs targeting the second hypervariable region of G protein were performed. The subgroup A-specific forward primer used for the first PCR was primer GPA (nucleotide positions 511 to 530), based on the primer described by Peret et al. (22), and that used for the heminested PCR was primer nRSAG (5'-TATGCAGCAACAATCCAACC-3'; nucleotide positions 539 to 558). Subgroup B-specific forward primer GPB was used for the first PCR (nucleotide positions 494 to 515) (22), and primer nRSBG (5'-GTGGCAACAATCAACTCTGC-3'; nucleotide positions 512 to 531) was used for the heminested PCR. The reverse primer specific for both subgroups A and B was primer

* Corresponding author. Mailing address: Division of Public Health, Department of Infectious Control and International Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757, Asahimachi-dori, Niigata City, Niigata Prefecture, 951-8510, Japan. Phone: 81 25 227 2129. Fax: 81 25 227 0765. E-mail: hsuzuki@med.niigata-u.ac.jp.

TABLE 1. Distribution of RSV subgroups and genotypes and demographic details for patients infected with RSV over three epidemic seasons from November 2001 to July 2004

Subgroup and genotype	2001-2002 season ^a		2002-2003 season ^b		2003-2004 season ^c	
	n ^d /total ^e (%)	Age (yr [mean ± SD])	n/total (%)	Age (yr [mean ± SD])	n/total (%)	Age (yr [mean ± SD])
A	30/74 (40.5)	0.8 ± 0.6	9/187 (4.8)	1.6 ± 1.2	83/238 (34.9)	1.2 ± 0.8
GA2	0/74 (0.0)		0/187 (0.0)		1/238 (0.4)	1.1 ± 0.0
GA5	29/74 (39.2)	0.8 ± 0.6	6/187 (3.2)	1.3 ± 1.1	82/238 (34.5)	1.2 ± 0.8
GA7	1/74 (1.4)	0.3 ± 0.0	3/187 (1.6)	1.9 ± 1.4	0/238 (0.0)	
B	2/74 (2.7)	0.7 ± 0.5	45/187 (24.1)	1.0 ± 0.7	16/238 (6.7)	1.0 ± 0.9
GB3	0/74 (0.0)		4/187 (2.1)	1.0 ± 0.9	0/238 (0.0)	
SAB3	2/74 (2.7)	0.7 ± 0.5	0/187 (0.0)		0/238 (0.0)	
BA virus ^f	0/74 (0.0)		41/187 (21.9)	1.0 ± 0.7	16/238 (6.7)	1.0 ± 0.9
Total	32/74 (43.2)	0.8 ± 0.6	54/187 (28.9)	1.1 ± 0.8	99/238 (41.6)	1.1 ± 0.8

^a The 2001-2002 season was from November 2001 to July 2002.

^b The 2002-2003 season was from August 2002 to July 2003.

^c The 2003-2004 season was from August 2003 to July 2004.

^d n, number of confirmed cases.

^e Total, number of suspected cases.

^f BA viruses are strains with a 60-nucleotide insertion in the second variable region of G protein.

F1 (nucleotide positions 3 to 22) (22). The nucleotide positions were based on the sequences of prototype strains A2 and 18537 of subgroups A and B, respectively (14). We modified the heminested forward primers reported by Peret et al. (22), since both RSV-A and -B became positive by the heminested primer for RSV-A and the same misannealing happened to RSV-B due to the similar nucleic acid alignment of our strains of RSV-A and -B. Similar sequences between subtypes in the region of G protein were not found in prototype RSV strains. cDNA (1 to 3 µl) was added to 20 µl of the reaction mixtures, which contained optimized buffers, each deoxynucleoside triphosphate at a final concentration of 200 µM, 3.0 mM MgCl₂, 0.5 µM forward and reverse primers, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, Wis.). Amplification was conducted for 2 min at 95°C, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final 7 min of extension at 72°C. Finally, the amplified product was analyzed by electrophoresis on a 3% agarose gel containing ethidium bromide, and the sizes of the amplicons were compared with those of standard molecular size markers. To validate the amplification process to exclude the presence of carryover contamination, positive and negative controls were run in each PCR.

Heminested PCR primers were used as the sequencing primers. Final PCR products were sequenced by using fluorescent dye-labeled terminators on an ABI 310 sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

We did not isolate RSV by tissue culture, so we confirmed the presence of infection by an additional PCR with the same samples but with different primers, which targeted the N and P proteins of RSV (24), and the results were matched with those of the G protein.

Phylogenetic analysis. The nucleotide sequences of a 270-nucleotide segment of the G-protein gene second hypervariable region were aligned by using Genetyx-WIN software (version 5.1.1; Genetyx Co. Ltd., Tokyo, Japan). Unique sequences for both subgroup A and B viruses were included in the phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were constructed by comparison of the sequences of strains from Niigata Rochester, N.Y.; Winnipeg, Manitoba, Canada; Houston, Tex.; St. Louis, Mo., with those in the GenBank database: Soweto, South Africa; Birmingham, Ala.; West Virginia; and Buenos Aires, Argentina.

Phylogenetic trees were computed and submitted to distance-based criterion analysis with ClustalW software (version 1.7; DDBJ). Trees were plotted with TreeView software (version 1.6.6). Bootstrap probabilities for 1,000 iterations were calculated to evaluate confidence estimates. Pairwise nucleotide distances within and between subgroups A and B were calculated as the numbers of pairwise nucleotide differences divided by the total number of nucleotides in the sequenced segment and were analyzed with ClustalW software (version 1.7; DDBJ).

Statistical analyses. Statistical analysis for comparison of mean values was performed by Scheffe's test. Comparison of the proportions was accomplished with 2-by-multiple tables. Statistical significance was concluded if the *P* value was <0.05.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers of the nucleotide sequences obtained in the present study are AB175814 to AB175823.

RESULTS

Nasopharyngeal aspirate samples were obtained from 74 children from November 2001 to July 2002 (2001-2002 season), 187 children from August 2002 to July 2003 (2002-2003 season), and 238 children from August 2003 to July 2004 (2003-2004 season). The average age of the children with RSV infection was 0.93 ± 0.84 years. Thirty (40.5%) of the 74 children, 9 (4.8%) of the 187 children, and 83 (34.9%) of the 238 children were identified as having had subgroup A infections in the 2001-2002, 2002-2003, and 2003-2004 seasons, respectively, while 2 (2.7%), 45 (24.1%), and 16 (6.7%) of the children identified were as having subgroup B infections in the three seasons, respectively (Table 1).

Phylogenetic analysis revealed that 122 subgroup A strains clustered as three genotypes (117 strains in genotype GA5, 4 strains in genotype GA7, and 1 strain in genotype GA2) during the 2001-2002 to 2003-2004 seasons; the bootstrap values were 70 to 100% (Table 1 and Fig. 1). GA5 was the predominant genotype among subgroup A isolates during the three seasons, and the genetic distances (*p* distances) among the genotype GA5 strains ranged from 0.004 to 0.059. The number of genotype GA5 strains decreased in the 2002-2003 season but increased again in the 2003-2004 season (Table 1; Fig. 2). The 117 genotype GA5 isolates that caused infections could be classified into 28 distinct strains (Fig. 1). In the 2001-2002 season, 15 strains were genotype GA5 strains identical to strain NG-001-02. The numbers of strains identical to strain NG-065-02 were 1, 3, and 63 in the 2001-2002, 2002-2003, and 2003-2004 seasons, respectively. Genotype GA7 strains comprised one, three, and none of the strains in the 2001-2002, 2002-2003, and 2003-2004 seasons, respectively; and only one genotype GA2 strain was detected, which was in the 2003-2004 season (Table 1; Fig. 1 and 2).

Phylogenetic analysis also revealed that 63 subtype B strains were clustered in three genotypes (4 strains in genotype GB3, 2 strains in genotype SAB3, and 57 strains in a new genotype with a 60-nucleotide insertion in the second variable region of G protein) during the three seasons, with bootstrap values of

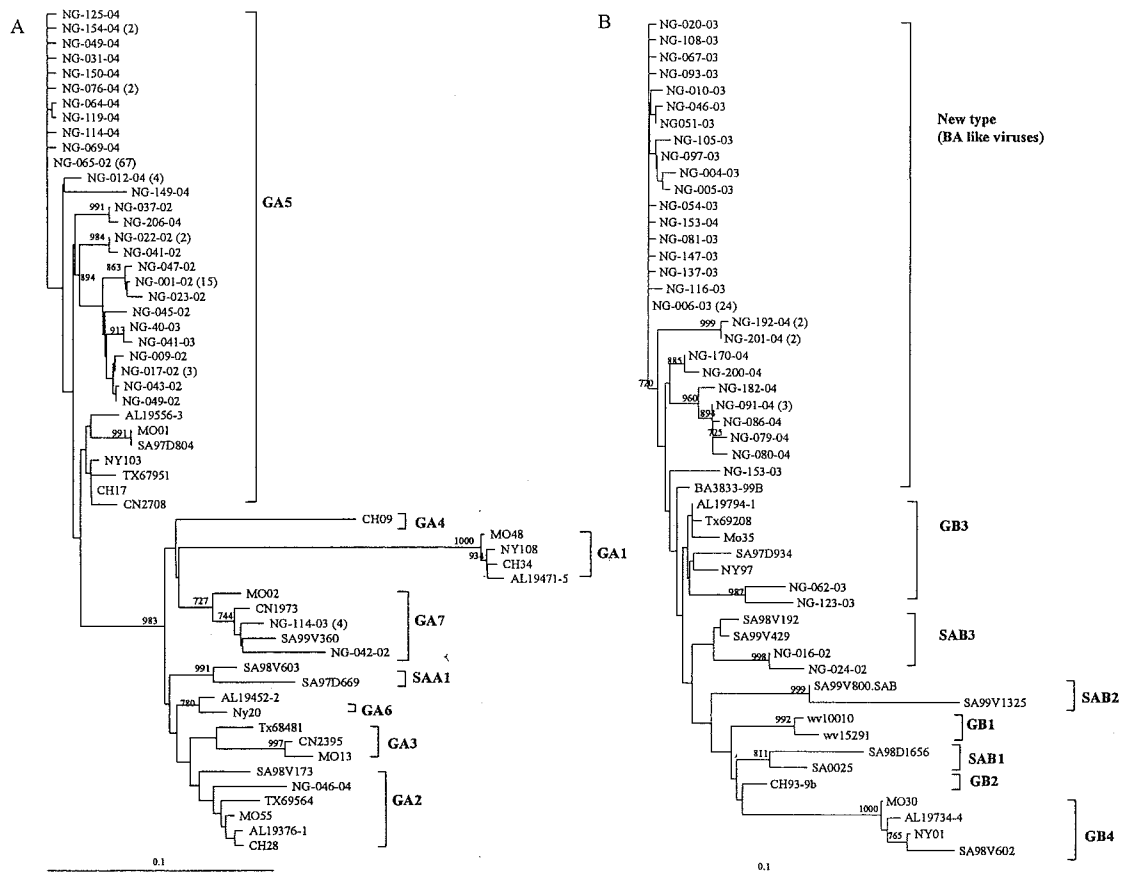


FIG. 1. Phylogenetic trees for RSV subgroup A (A) and subgroup B (B) nucleotide sequences based on the second variable region of G protein (270 bp). Genotypes were assigned by Peret et al. (21, 22) (genotypes GA1 to GA7 and GB1 to GB4) and Venter et al. (28) (genotypes SAA1 and SAB1 to SAB3). The new type, named BA virus, comprises strains with a 60-nucleotide insertion. The numbers of identical strains are indicated in parentheses. Reference GenBank sequences of strains from throughout the world were compared with strains in Niigata (NG); Rochester, N.Y. (CH) (22); Winnipeg, Manitoba, Canada (CN) (21); Houston, Tex. (TX) (21), Rochester, N.Y. (NY) (21); St. Louis, Mo. (MO) (21); Soweto, South Africa (SA) (28); Birmingham, Ala. (AL) (21); West Virginia (WV) (25); and Buenos Aires, Argentina (BA) (27). The scale bars show the proportions of nucleotide substitutions, and the numbers above the horizontal lines are bootstrap values determined for 1,000 iterations with the CLUSTALW program (DDBJ). Only bootstrap values greater than 700 are shown.

70 to 100% (Table 1; Fig. 1). Genotypes similar those of the strains of subgroup B of the new genotype with the 60-nucleotide insertion (named BA viruses) have been reported in Buenos Aires (Buenos Aires [BA] virus) in 1999 (27). All of our BA-like viruses demonstrated a Ser247Pro amino acid change compared with the sequence of BA virus in the region with the insert. Two genotype SAB3 strains of subgroup B were found only in the 2001-2002 season, 4 genotype GB3 strains were found only in the 2002-2003 season (Table 1, Fig. 1 and 2), 41 strains of the new genotype were found in the 2002-2003 season, and 16 strains of the new genotype were found in the 2003-2004 season. Genetic distances (p distances) among the strains of the new genotype ranged from 0.003 to 0.064, and 23 strains from the 2002-2003 season and 1 strain from the 2003-2004 season were identical to strain NG-006-03. Furthermore, strains in both subgroups A and B tended to cluster adjacently by year of collection by phylogenetic tree analysis.

RSV infections were detected from November 2001 to February 2002 and were detected again starting in September 2002 (Fig. 2A). The peak month for RSV infections was December in the 2001-2002 and 2002-2003 seasons and November in the

2003-2004 season. The predominant genotype shifted from genotype GA5 to BA viruses of subgroup B in the 2002-2003 season and returned to genotype GA5 in the 2003-2004 season (Table 1; Fig. 2B and C). The average age of the patients demonstrated no significant linkage with the subgroup or genotype infecting the patients in any of the 3 years (Table 1). The numbers of hospitalized patients infected with genotype GA5 were 3 (10.3%) of 29, 2 (20.0%) of 10, and 3 (3.7%) of 82 in the 2001-2002, 2002-2003, and 2003-2004 seasons, respectively. The values for BA viruses were 5 (12.5%) of 40 and 2 (12.5%) of 16 in the 2002-2003 and 2003-2004 seasons, respectively, and that for genotype GB3 was 1 (25.0%) of 4 in the 2002-2003 season.

Eight (4.3%) of 177 patients with RSV infections were reinfected over the study period. Two patients infected with genotype GA5 were reinfected with the same genotype over 2- to 24-month periods. One patient infected with genotype GA5 virus was reinfected with BA viruses after 1 year. Four patients infected with BA viruses in the 2002-2003 season were reinfected with genotype GA5 over 4- to 14-month periods.