

vated influenza virus via subarachnoidal or subcutaneous route. J Vet Med Sci 69, 1167-1169.

- (8) Soda, K., Sakoda, Y., Isoda, N., Kajihara, M., Haraguchi, Y., Shibuya, H., Yoshida, H., Sasaki, T., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., and Kida, H. (2008). Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. Jpn J Vet Res 55, 93-98
- (9) Takeda, S., Ozaki, H., Hattori, S., Ishii, A., Kida, H., and Mukasa, K. (2007). Detection of influenza virus hemagglutinin with randomly immobilized anti-hemagglutinin antibody on a carbon nanotube sensor. J Nanosci Nanotechnol 7, 752-756.
- (10) Tsuda, Y., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., and Kida, H. (2007). Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. Microbiol Immunol 51, 903-907.

## 2. 学会発表

- (1) Isoda N, Soda K, Sakabe S, Kishida N, Sakoda Y, Kida H: Effect of inactivated avian influenza vaccine prepared from an apathogenic H5N1 reassortant virus generated between H5N2 and H7N1 isolates from migratory ducks in Asia on protection of chickens against challenge with highly pathogenic avian influenza virus strains. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (2) Kida H, Sakoda Y, Isoda N, Soda K, Kishida N: Library of influenza virus strains and genes for vaccine and diagnostic use as the preparedness for pandemics and Highly pathogenic avian influenza. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (3) Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A: Genetically destined potentials for N-linked glycosylation associated with

antigenic changes of influenza virus hemagglutinin. Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.

- (4) Soda K, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, Minari K, Kida H: Does H9N2 avian influenza virus acquire high pathogenicity for chicken? Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
- (5) Sakoda Y, Isoda N, Soda K, Kishida N, Takada A, Sodnomdarjar R and Kida H: "Characterization of H5 avian influenza virus isolates in Asia", Toronto, Canada, Options for the control of influenza VI, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.

## H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

分担研究報告書 RSV, インフルエンザウイルス抗原を発現する

組換え麻疹ワクチンAIK-C株の樹立

分担研究者 中山哲夫  
北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I 教授

【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は世界的に安全で有効なワクチンとして知られておりAIK-Cの Reverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用する可能性を検討した。N/P, P/M junctionにAsc I 配列を導入し外来性ウイルスタンパク遺伝子を挿入した。現在ワクチンの開発されていないRespiratory syncytial virus (RSV) F, Gタンパク翻訳領域、インフルエンザウイルスHA, NAタンパク翻訳領域を挿入し感染性ウイルス粒子を回収し、これらのタンパクが発現されていることを確認した。更に、N/P junctionにinfluenza HA, P/M junctionにRSV G遺伝子を導入し多価ウイルス抗原を発現する組換え麻疹ウイルスを作製した。ワクチン化には超えなければならない障壁があるが、新規ワクチン開発の生ワクチンウイルスベクターとして有用と考えられる。

【研究目的】

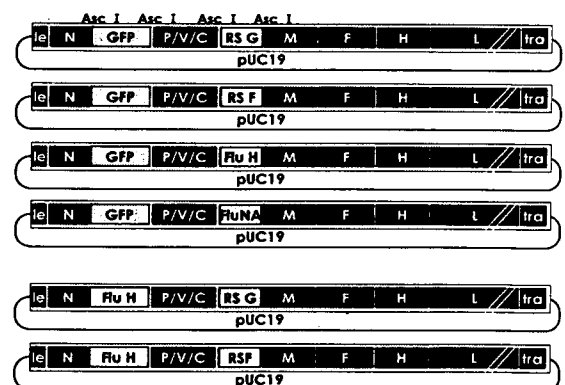
我々の研究室では麻疹ウイルスAIK-C株の感染性cDNAクローンを樹立し、弱毒のマーカーを検討してきた。弱毒のマーカーとしては39°Cの高温で増殖しない温度感受性(temperature sensitivity: ts)を特徴としておりPタンパクがtsの性状に関連していることを明らかとした。また、AIK-C株の全長の感染性cDNAを構築し感染性ウイルスを回収するreverse geneticsの技術を確立し、cDNAの中に外来遺伝子を導入して多価抗原遺伝子を挿入する弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用することを目的として研究してきた。今回Respiratory syncytial virus (RSV)とインフルエンザウイルスの感染防御抗原と考えられている外殻タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作製しその性状を解析した。

【研究方法】

- 1) RSV は臨床分離例の Subgroup A の Gタンパク、Fタンパクの翻訳領域全長を RT-PCR法で増幅した。インフルエンザワクチンの原液 New York 株の HA, NA タンパク翻訳領域全長を RT-PCR 法で増幅した。プライマー5'末端には Nco I, Not I の制限酵素配列を付加し塩基配列を確認後制限酵素で処理した。
- 2) 麻疹 AIK-C 株全長 cDNA クローンは Asc

I 制限酵素部位を N/P, P/M junction 部位に導入してあり、外来遺伝子は Nco I, Not I でクローニングしたのちに Asc I sites に導入する。P/M junction に RSV F, G, Influenza HA, NA タンパク遺伝子を導入したウイルス遺伝子を挿入した cDNA を構築した。N/P junction に Influenza HA, P/M junction には RSV G タンパク遺伝子を導入した多価ウイルス抗原を発現する組換え cDNA を模式的に図 1 に示した。

図1. 構築した組換え麻疹ウイルスの cDNA



- 3) 組換え cDNA から感染性キメラウイルスの回収は 293T 細胞に T7 RNA polymerase を発現する組換え Vaccinia virus を感染させ、麻疹ウイルスの転写・複製に必要な N, P, L 遺伝子発現プラスミドとともに組換え cDNA を

transfectionし2日後にB95a細胞と混合培養した。

4) B95a細胞に接種しvirus growth kineticsと異なる温度で培養することで温度感受性(ts)を検討した。

5) RSVウイルス抗原の発現、インフルエンザウイルス抗原の発現は各ウイルスに対するpolyclonal抗体を用い、麻疹ウイルスの発現はNタンパクに対するmonoclonal抗体を使用し、免疫蛍光染色をおこなった。

### 【結果】

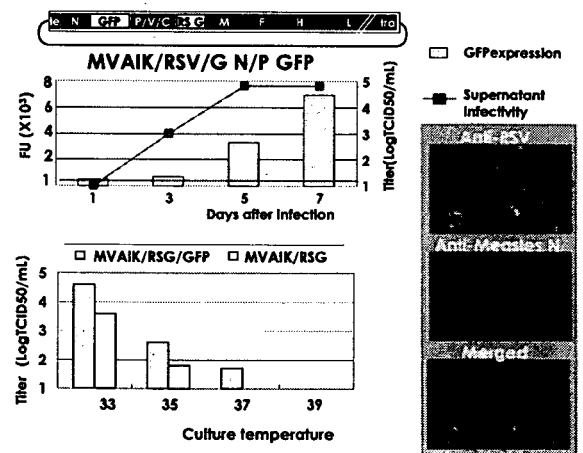
N/P junction, P/M junctionにRSV F/G, influenza HA/NA遺伝子を挿入したcDNAから感染性ウイルスを回収し、回収したウイルスにデザインした遺伝子挿入されているかどうかをRT-PCRで確認した。N/P, P/M junction近傍のプライマーを用いてPCR反応を行いN/P junctionに何も挿入されてなければ485bpのバンドが確認され、P/M junctionでは何も挿入されてなければ481bpのバンドが検出される。挿入されている遺伝子はGFP遺伝子で720bp、RSV/G 897bp、RSV/F 1725bp、Flu/HA 1710bp、Flu/NA 1410bpの塩基が付加されたPCR産物が確認されることになる。回収されたキメラウイルスのPCR産物を電気泳動したところデザインした挿入遺伝子のバンドを確認することができた。回収したウイルスの性状(増殖能、ts、挿入タンパク発現、安定性、粒子形成)について調べた。

#### 1) MVAIK/RSV/G MVAIK/RSV/G N/PGFP

RSV/G蛋白遺伝子を挿入したpMVAIK/RSV/Gから感染性ウイルスMVAIK/RSV/Gを回収できた。GFP蛋白遺伝子を同時に組み込んだpMVAIK/RSV/G N/P GFPからも感染性ウイルスMVAIK/RSV/G N/P GFPを回収できた。回収したウイルスをB95a細胞に接種し1,3,5,7日後の培養上清と細胞内感染性ウイルスを検討した。培養上清中の感染価は3,5日後にピークを迎え感染価は $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mlで細胞内には上清中のウイルスの約10倍のウイルス量が存在することが明らかとなった。ウイルスの増殖を数値化するためにGFP遺伝子を挿入したMVAIK/RSV/G/ N/PGFPの増殖能を検討し結果を図2に示した。B95a細胞に接種し同様に1,3,5,7日後のウイルス感染価を測定すると接種5日後の感染価は $10^5$

TCID<sub>50</sub>/mlとなった。GFPの発現はBaselineが500-700の蛍光強度を示しウイルスの増殖に伴い細胞内で発現され7日までに増加し約7000FUを示しウイルスも33°Cで培養した場合が最も増殖し、39°Cでは感染性ウイルスは検出されなかった。またウイルスの増殖に伴いGFP蛋白の発現も増加していた。以上の結果からRSV/G遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスは39°Cで増殖しないtsの性状を保持していることが明らかとなった。次に感染細胞におけるRSV/G蛋白の発現を確認した。まず、MVAIK/RSV/G N/P GFPを感染させたB95a細胞のGFP蛋白発現を確認しその後MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/G N/P GFPを感染させたB95a細胞をエタノールで固定し、抗RSV-polyclonal抗体、抗MV-N-monoclonal抗体を反応後、FITC, Rhodamineでラベルした抗免疫グロブリン抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。麻疹NタンパクはRhodamineで細胞融合した細胞質全体が染色され、同じ細胞にSV/G蛋白を発現していることが明らかとなった。

図2. RSV Gタンパクを組み込んだキメラウイルスの性状



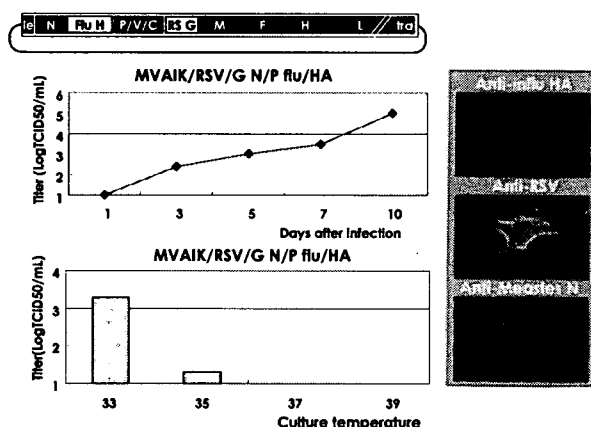
#### MVAIK/Flu/HA MVAIK/Flu/HA N/P GFP

Influenza/HA蛋白遺伝子を挿入したpMVAIK/Flu/HAから感染性ウイルスMVAIK/Flu/HAを回収できた。GFP蛋白遺伝子を同時に組み込んだpMVAIK/Flu/HA N/P GFPからも感染性ウイルスMVAIK/Flu/HA N/P GFPを回収できた。同様にB95a細胞に感染させるとtsの性状は保持されていた。

麻疹ウイルスベクターとしてN/P junctionに

も外来ウイルス遺伝子を挿入し多価ウイルス抗原を発現する組換え麻疹ウイルスの可能性を検討した。N/P junctionにFlu/HAタンパク、P/M junctionにRSV/Gタンパクを挿入したpMVAIK/RSV N/P Flu/HAを構築し感染性ウイルスMV AIK/RSV N/P Flu/HAを回収することができた。このウイルスをB95α細胞に接種し1, 3, 5, 7, 10日後の培養上清中の感染価を測定し図3に示した。培養5-7日までは $10^{3.3-3.5}$ TCID<sub>50</sub>/mlであったが10日後には $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/mlと高い感染価を得ることができた。温度感受性に関しては今までの結果と同様に33℃で培養した場合が最も増殖し、39℃では感染性ウイルスは検出されなかった。感染させたB95α細胞をエタノールで固定し、抗RSV-polyclonal抗体、抗MV-N-monoclonal抗体、抗Flu-polyclonal抗体で反応後、FITC, Rhodamine, Alexa350でラベルした抗免疫グロブリン抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。RSV/G蛋白、Flu/HA蛋白どちらもMV/N蛋白が発現している部位と同じ部位に発現していることが確認された。

図3. RSV Gタンパク、インフルエンザHAタンパクを組み込んだキメラウイルスの性状



【考察】

N/P、P/M junctionの2箇所外来ウイルス抗原遺伝子を挿入した感染性cDNAクローンからキメラ麻疹ウイルスを回収し、AIK-C株のもつ弱毒マーカであるtsを保持し外来ウイルスタンパクが発現していることが確認された。ウイルス培養液を超遠心精製したウイルス粒子画分から外来ウイルスタンパクは検出できず能動的に麻疹ウイルス粒子には取り込まれていないと考えられた。小児の呼吸器感染症としてRSVは再感染

を繰り返し、未熟児出生、心奇形児では重篤化し死亡の原因ともなる。現在ではRSV Fタンパクに対するヒト型単抗体が予防的に使用されているが、使用対象に制限があり、高価であることからワクチンに開発が望まれていた。

一方、インフルエンザ感染は乳幼児、老人にとって大きな問題であり、現在はHAタンパク画分を精製不活化したワクチンが使用されているが有効性には問題点がある。現行インフルエンザワクチンは皮下接種のワクチンで感染の最初の部位である局所免疫を与えることができないため重症化は押えても感染を予防することはできない。麻疹ワクチンは、インフルエンザやRSVと同様に呼吸器感染するウイルスで麻疹ワクチンは現在皮下接種であるが、吸入でも有効であることが知られている。インフルエンザ、RSVの外殻タンパクを発現するAIK-C麻疹ワクチンウイルスを経鼻ワクチンとして利用することを考えている。

【結論】

弱毒麻疹ワクチンAIK-C株を生ワクチンウイルスベクターとして用いRSV、インフルエンザウイルスの外殻タンパクを発現する組換え麻疹ワクチンを構築した。

【健康危険情報】

なし

【研究発表】

1. 論文発表

- (1) Nakayama T, Onoda K.: Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004. *Vaccine* 25; 570-576, 2007.
- (2) Yoshida N, Fujino M, Ota Y, Notomi T, Nakayama T.: Simple differentiation method of mumps Hoshino vaccine strain from wild strains by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) *Vaccine* 25; 1281-1286, 2007.
- (3) Fujino M, Yoshida N, Kimura K, Zhou J, Motegi Y, Komase K, Nakayama T.: Development of a new neutralization test for measles virus. *Journal of Virological Methods* 142: 15-20, 2007.

2. 学会発表

- (1) 平成18年の愛知県内における麻疹小流行

- 第48回臨床ウイルス学会 富山 (2007. 6/2-3)
- (2) M蛋白欠損麻疹ウイルス増殖能の検討  
第48回臨床ウイルス学会 富山 (2007. 6/2-3)
- (3) RSウイルス外殻タンパクを発現するキメラ麻疹ウイルスの作製 第55回日本ウイルス学会 札幌 (2007. 10/21-23)
- (4) SSPE (亜急性硬化性全脳炎) ウイルスの細胞融合能の解析 第55回日本ウイルス学会 札幌 (2007. 10/21-23)
- (5) LAMP法による麻疹ウイルス感染症の迅速診断 第39回日本小児感染症学会 横浜 (2007. 11/9-11)
- (6) 2007年入学した小学1年生の麻疹・風疹抗体保有状況 第39回日本小児感染症学会 横浜 (2007. 11/9-11)
- (7) 細気管支炎を呈しLAMP法で百日咳と診断した新生児の一例 第39回日本小児感染症

- 学会 横浜 (2007. 11/9-11)
- (8) 2006-2007年に分離された麻疹ウイルスの性状 第11回日本ワクチン学会 横浜 (2007. 12/8-9)
- (9) 麻疹ウイルスベクターを用いた新規日本脳炎ワクチンの開発 第11回日本ワクチン学会 横浜 (2007. 12/8-9)
- (10) 麻疹既往歴を有する小児に対するMRワクチン追加接種—抗体反応と臨床反応— 第11回日本ワクチン学会 横浜 (2007. 12/8-9)

【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

## Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する 各種抗生物質の効果に関する研究

分担研究者 渡邊 浩（久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門）  
研究協力者 加地千春、渡辺貴和雄（長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野）  
Michael A. Apicella (Carver College of Medicine, Department of  
Microbiology, The University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA)

**研究要旨** バイオフィルム産生能が確認された $\beta$ -lactamase-negative ampicillin (ABPC)-susceptible (BLNAS)株および $\beta$ -lactamase-negative ABPC-resistant (BLNAR) 株を培養しバイオフィルムを産生させた後、ABPC, cefotaxime (CTX), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), gatifloxacin (GFLX)を添加し、バイオフィルムに対する効果を比較検討した。Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ABPC, CTX, EM, CAM では 10 MIC でもバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、LVFX は 1 MIC 以上、G FLX は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討では confocal laser scanning microscopy による観察でバイオフィルムの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、GFLX は 1 MIC で優位なバイオフィルム内の菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。LVFX, GFLX は NTHi が産生するバイオフィルムの中に浸透し、バイオフィルム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。

### A. 研究目的

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)は人に中耳炎や下気道感染症を引き起こす主要な病原菌である。現在、本邦では $\beta$ -lactamase-negative ampicillin (ABPC)-resistant (BLNAR)株が増加しており、小児の中耳炎症例などにおいて難治例の増加が臨床上的問題となっている。しかし、NTHi は近年バイオフィルムを産生することや細胞内に寄生することが知られるようになり、これらも難治化の一因として考えられるようになった。NTHi が産生するバイオフィルムに対する抗生物質の効果は明らかになっていないため、今回我々は NTHi が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果について基礎的研究を行った。

### B. 研究方法

バイオフィルム産生能をもつことが確認された $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS)株及び BLNAR 株を 96 穴マイクロプレートに接種して 48 時間培養し、in vitro でバイオフィルムを産生させ、その後各種抗生物質 (ABPC, cefaclor (CCL), erythromycin (EM),

clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), gatifloxacin (GFLX))をそれぞれ 0.1, 1, 10 MIC の濃度で 12 時間おきに 1 時間ずつ計 4 回添加し、Microtiter biofilm assay を行った。また continuous flow cell chamber 内に BLNAR 株を 48 時間培養し、ABPC, CTX, EM, GFLX を 0.1, 1, 10 MIC の濃度で加え、バイオフィルム内の生育菌数の測定および confocal laser scanning microscopy によるバイオフィルムの観察を行った。また本研究は Department of Microbiology, The University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA との共同研究として行われた。

### C. 研究結果

Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ABPC, CTX, EM, CAM では 10 MIC でもバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、LVFX は 1 MIC 以上、G FLX は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討では confocal laser scanning microscopy の観察でバイオフィルムの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、GFLX は 1 MIC で優位な菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。

#### D. 結論および考察

今回の検討ではペニシリン剤、セフェム剤およびマクロライド剤にはNTHiが産生するバイオフィルムに対する抑制効果はみられなかったが、LVFX, GFLXなどのキノロン剤はNTHiが産生するバイオフィルムの中に浸透し、バイオフィルム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。今後、動物実験などによる検討を加え、キノロン剤のNTHiが産生するバイオフィルムに対する効果を明らかにしていきたい。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, and Watanabe H. Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. *Tohoku J Exp Med* (in press).
- 2) Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, Imamura Y, Nakamura S, Taguchi C, Sugita M, Yamakawa R, Etoh Y, Sera N, Ishibashi T, Chijiwa K, and Watanabe H. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect* (in press).
- 3) Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, and Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother* (in press).
- 4) Qin L, Masaki H, Watanabe K, Furumoto A, and Watanabe H. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates indicating possible nosocomial transmission routes in a community hospital in Japan. *J Clin Microbiol*, 45: 3701-3706, 2007.
- 5) Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong DM, Rusizoka OS, Nagatake T, Watanabe H, and Oishi K. Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. *Pediatric Int* (in press).

- 6) Watanabe H, Batuwanthudawe R, Thevanesam V, Kaji C, Qin L, Nishikiori N, Saito W, Saito M, Watanabe K, Oishi K, Abeysinghe N, Kunii O. Possible prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka. *Intern Med*, 46: 1395-1402, 2007.
- 7) Anh DD, Huong PLT, Watanabe K, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong, DM, Tanimura S, Ohkusa Y, Nagatake T, Watanabe H, and Oishi K. Increased rates of intense nasopharyngeal bacterial colonization of Vietnamese children with radiological pneumonia. *Tohoku J Exp Med*, 213, 2007.
- 8) Iwahashi J, Hamada N, and Watanabe H. Two hydrophobic segments of the RTN1 family determine the ER localization and retention. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 508-512, 2007.
- 9) Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, and Oishi K. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. *Tohoku J Exp Med*, 211: 63-74, 2007.
- 10) Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, and Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000, including  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *Epidemiol Infect*, 135 : 665-668, 2007.
- 11) 渡邊 浩。旅行医学とトラベルクリニック。久留米医学会雑誌、70: 179-184, 2007.

##### 2. 学会発表

- 1) 渡邊 浩。教育セミナー3, デング熱。第77回日本感染症学会西日本地方会学術集会。佐賀、2007.11.16.
- 2) 秦 亮、真崎宏則、渡辺貴和雄、古本朗嗣、渡邊 浩。Clinical study of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from a community hospital in Japan. 第55回日本化学療法学会西日本支部総会、第50回日本感染症学会中日本地方会学術集会。神戸、2007.10.31.
- 3) 後藤憲志、渡邊 浩、渡辺貴和雄、大石和

徳。ベトナム、ナチャンにおける小児急性下気道感染症患者由来の薬剤耐性遺伝子を有するインフルエンザ菌に関する分子疫学的検討。第 48 回日本熱帯医学会大会。大分、2007.10.12.

- 4) 渡邊 浩。シンポジウム 2、トラベルクリニックネットワークの設立ートラベルクリニックの設立方法。第 11 回日本渡航医学会学術集会。東京、2007.7.21.
- 5) 渡邊 浩、渡辺貴和雄、川上健司。院内発症の菌血症症例より分離されたバイオフィルム産生 *Bacillus spp.*に関する分子疫学的検討。第 55 回日本化学療法学会総会。仙台、2007.6.1.
- 6) Watanabe H. Organisms of nosocomial infection and the prevention. Shanghai International Forum on Infection Control. Shanghai, China, 2007.4.21.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



平成19年度分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

小児急性呼吸器感染症に関する臨床的、細菌学的研究

分担研究者： 石和田 稔彦（千葉大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨

小児のインフルエンザ菌全身感染症の16%、肺炎球菌全身感染症の60%が呼吸器感染症であり、ワクチンに含まれる血清型の株によるものが主体であった。Hib ワクチンの普及、肺炎球菌結合体ワクチンの導入が望まれる。小児 RSV 感染症入院例では、細菌性 2 次感染を伴っている例が多く、原因菌としてはインフルエンザ菌が多かった。DSCG は、*in vitro* の系において RSV 感染時のインフルエンザ菌による 2 次感染を抑える作用があることが示唆された。

A. 研究目的

- ① 小児のインフルエンザ菌全身感染症、肺炎球菌全身感染症に占める呼吸器感染症の割合、分離菌の性状を明らかにする。
- ② 小児 RSV 感染症の 2 次細菌感染の割合を調査する。
- ③ RSV 感染症の 2 次細菌感染予防法を *in vitro* の系を用いて検討する。

B. 研究方法

- ① 血液培養からインフルエンザ菌、肺炎球菌が分離された呼吸器感染症の割合を調査し、分離された菌の薬剤感受性、血清型別を実施する。
- ② 小児 RSV 感染症入院例の洗浄喀痰培養を実施し、分離病原細菌の薬剤感受性検査を実施する。
- ③ 気道上皮細胞に RSV とインフルエンザ菌を感染させる実験系を用い、DSCG、ステロイドによるインフルエンザ菌の 2 次感染予防効果を検討する。

（倫理面への配慮）

臨床データならびに菌株の収集にあたっては、研究計画書を千葉大学の倫理委員会に提出し、承認を得た後行った。

C. 研究結果

- ① 血液培養陽性のインフルエンザ菌全身感染症のうち急性喉頭蓋炎は 10%、肺炎は 6%を占めた。分離株は、血清型 b 型が主体であり、βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性株が 30%を占めていた。血液培養陽性の肺炎球菌全身感染症のうち 60%は肺炎であり、ペニシリン耐性株は 20%であった。血清型別を行ったインフルエンザ菌は全て b 型であり、肺炎球菌の 80%は 7 価結合体ワクチンに含まれる型であった。
- ② 入院症例の RSV 感染症の 2 次細菌感染（優位病原細菌分離例：複数菌分離例を含む）は 55%あり、分離菌はインフルエンザ菌（54%）、肺炎球菌（36%）、モラキセラ（26%）の順に多かった。インフルエンザ菌では BLNAR が 23%を占め、肺炎球菌では PRSP が 30%を占めていた。
- ③ RSV 感染は気道上皮細胞のインフルエンザ菌

の付着を亢進させた。DSCG は、ステロイドに比較し、RSV 感染気道上皮細胞への付着を有意に抑制した。DSCG は、RSV 感染細胞上のインフルエンザ菌付着レセプター発現を抑制した。また、DSCG は RSV 感染増殖を抑制した。

#### D. 考察

- ① 全身感染症分離株の多くが Hib ワクチン、肺炎球菌結合体ワクチンで予防可能な血清型であり、両ワクチンの本邦への導入により、Hib による急性喉頭蓋炎・肺炎、肺炎球菌による肺炎の予防が可能であると考えられた。
- ② RSV 入院症例では、インフルエンザ菌を主体として細菌の 2 次感染を伴っている場合が多く、耐性菌の占める割合も高い。
- ③ DSCG は、RSV 感染気道上皮細胞上の付着レセプター発現を抑制し、かつ RSV 感染自体を抑制することで、インフルエンザ菌付着を抑制すると考えられた。

#### E. 結語

- ① Hib ワクチンの普及、肺炎球菌結合体ワクチンの導入・普及が望まれる。
- ② ③DSCG は、RSV 感染症の細菌性 2 次感染を抑制する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 石和田稔彦, 黒崎知道, 寺嶋周, 石川信泰, 金子堅一郎, 黒木春郎, 久保政勝, 鈴木宏, 中村明, 原木真名, 上原すゞ子, 河野陽一  
インフルエンザ菌による小児全身感染症罹患状況 日本小児科学会雑誌 111: 1568-72, 2007
- 2) 石川信泰, 菱木はるか, 石和田稔彦  
「小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2007」

に向けて 血液検査結果より重症例と判定された肺炎の検討。日本小児呼吸器疾患学会雑誌 18: 78-81, 2007

- 3) 会沢治朗, 石和田稔彦, 石川信泰, 河野陽一  
小児肺炎球菌性全身感染症の臨床的・細菌学的検討。小児感染免疫 19: 47-52, 2007
- 4) Ishiwada N, Fukasawa C, Inami Y, Hishiki H, Takeda N, Sugita K, Kohno Y.  
Quantitative measurements of *Hemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies in Japanese children. *Pediatr Int* 49:864-8, 2007

##### 2. 学会発表

- 1) 武田紳江他 乳幼児のマイコプラズマ肺炎の臨床的検討 第 40 回日本小児呼吸器疾患学会 (2007 年 11 月 大阪)
- 2) 永井文栄他 当院 NICU における人工呼吸器関連肺炎の検討 第 40 回日本小児呼吸器疾患学会 (2007 年 11 月 大阪)
- 3) 菱木はるか他 2006-2007 シーズンの RSV 感染症入院症例における細菌性下気道感染症合併頻度および分離菌の動向、使用抗菌薬に関する検討 第 39 回日本小児感染症学会 (2007 年 11 月 横浜)
- 4) 有馬聖永他 耳漏および喀痰より分離されたインフルエンザ菌の薬剤感受性の検討 第 39 回日本小児感染症学会 (2007 年 11 月 横浜)
- 5) Ishiwada N et al.

Comparison of sulbactam/ampicillin and tazobactam/piperacillin for the treatment of lower respiratory tract infection in paediatric patients. the 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases together with the 25th International Congress of Chemotherapy (2007 年 4 月 ミュンヘン)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

平成 19 年度分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

アマンタジン耐性 A 型インフルエンザの流行

分担研究者： 齋藤 玲子、鈴木 宏（新潟大学大学院医歯学総合研究科  
国際感染医学講座公衆衛生学分野）  
共同研究者： 李丹娟、鈴木康司、菖蒲川由郷、Hassan Zaraket

研究要旨

アマンタジンは A 型インフルエンザに有効である。従来市中株中の耐性頻度は 0-3%と低かったが、昨年度我々は本邦で 2005-06 年シーズンに H3N2 株の耐性頻度が 65.3%と急増し、さらに耐性株 HA 遺伝子には特有の二重変異を持つことを報告した。今回、本邦各地で引き続き A 型インフルエンザ中のアマンタジン耐性頻度調査を行った。

2006-07 年、本邦 4 県（新潟、群馬、京都、長崎）でインフルエンザ患者初診時検体を採取し、ウイルス分離後アマンタジン耐性変異（M2 遺伝子変異）確認と HA 遺伝子の樹形図解析を行った。

合計 797 件の A 型インフルエンザを解析し、A/H3N2 では 91.0%、A/H1N1 では 65.6%がアマンタジン耐性であり、二つのサブタイプで前年より耐性頻度が高くなったことを明らかにした。地域分布に大きな差はなく Am 耐性株は全国的に高い頻度で分布しており、耐性株の世界的な著増と連動していることが明らかとなった。HA 遺伝子解析上は A/H1N1 では耐性株には HA 遺伝子に特徴的な遺伝子変異があり、耐性株と感受性株とが異なる群を形成したが、H3N2 は前年度に耐性株にみられた HA 遺伝子変異を保持しながら、耐性株と感受性株が互いに別の群を形成しつつ混在していた。近年大流行したアマンタジン耐性株には M2 遺伝子だけでなく HA 遺伝子変異も連動して起きており、耐性株伝播率向上に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

はじめに

インフルエンザの治療には M2 阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤が有効である。A 型インフルエンザのみに有効な M2 阻害剤としてアマンタジン（シンメトレル®）とリマンタジンがある。本邦では 1998 年よりアマンタジンが A 型インフルエンザに保険適応されたが、リマンタジンは未承認である。アマンタジンは A 型インフルエンザ膜蛋白の水素イオンチャンネルである M2 蛋白を阻害して薬理作用を示す。アマンタジンは安価で安

定であるが、投与後、約 1/3 の患者で耐性株が生じ、副作用が多いことが問題である。耐性化はアマンタジンが阻害する M2 蛋白遺伝子膜通過部位の特定のアミノ酸変異(26、27、30、31 位)により生じる。リマンタジンにも相互耐性である。アマンタジン耐性株は自然条件では非常に少ない割合で感受性株に混在し、薬剤の投与による選択圧で優勢になると考えられる。一般的に、アマンタジン耐性株の人から人への伝播力は感受性株に比べて弱いとされ、これまで高齢者施設や家族などの密に接する集団での伝播感染が報告される

のみで、市中においてアマンタジン耐性株のみの流行は起きておらずヒトの A 型インフルエンザ市中株中の耐性頻度は世界的に 0-10%程度と低かった。

2005 年、米国 CDC よりアジアでの Am 耐性 H3N2 が 2003 年以降急増していることが報告され、Am 耐性をとりまく状況が一変した。本邦で我々が行った調査より 2005-06 年に A/H3N2 の耐性株が各地で増加し 65.3% の頻度であったことが判明した。この耐性株は全て M2 遺伝子の 31 位に変異を持ち、さらには HA 遺伝子の 193 位と 225 位の二重変異を持っているというこれまでのアマンタジン耐性株にはない特徴を持っていた。同シーズンに採取された A/H1N1 では耐性株は見られなかった。

我々はそれまでの調査に引き続き 2006-07 年シーズンに日本各地でインフルエンザの臨床検体から Am 耐性頻度調査を行い、M2 遺伝子、HA 遺伝子変異との関連性を解析した。

## B. 研究方法

2006 年 11 月から 2007 年 7 月まで、本邦 4 県（新潟、長崎、群馬、京都）の 14 医療施設に調査を依頼し、インフルエンザ様疾患患者より初診時の咽頭・鼻腔ぬぐい液を採取し、あわせて患者の臨床情報を聴取した。MDCK 細胞によりインフルエンザウイルス分離後、株の Am 感受性試験を TCID<sub>50</sub>/0.2ml 法にて行った。培養株よりウイルス RNA を抽出し、Uni12 を用いて RT 反応を行い cDNA を作成、M2 遺伝子特異プライマーにて膜通過部位を PCR 増幅し、シーケンスにて 26, 27, 30, 31 位のアミノ酸に変異を認めたものを Am 耐性と判定した。併せて分離株の HA 遺伝子、NA 遺伝子解析を行い、遺伝子データベース登録株とあわせ Neighbor-joining 法による系統樹解析を行い、2006-07 年シーズンに流行した Am 耐性株の特徴を解析した。

## C. 研究結果および考察

期間中協力医療機関より計 1453 件の咽頭ぬぐい液検体を採取し、A/H1N1 を 131 件、A/H3N2 を 667 件、B を 252 件分離した。A/H1N1 では 65.6%(86/131)が、A/H3N2 は 90.6% (604/667) が耐性であった。これらの株は全て M2 遺伝子に Ser31Asn(S31N)変異を持っていた。A/H3N2 の各地の耐性頻度は、新潟 85.1%(86/101)、群馬 91.8%(45/49)、京都 89.4%(304/340)、長崎 95.4%(169/177)とそれぞれ 9 割近く全国的に差はなかった(図 1)。A/H1N1 の各地の耐性頻度は、新潟 55.7%(44/79)、京都 54.5%(12/22)、長崎 100.0%(30/30)と地域によりやや頻度に片寄りがあるものの、先シーズンに比し非常に高い頻度であった(群馬は A/H1N1 が採取されなかった)(図 2)。Am 耐性株が検出された患者には全て Am 投与歴は無く、前年と同様に耐性株の伝播感染と考えられた。

HA 遺伝子解析では、2005-06 年に流行した Am 耐性株が二重変異 S193F, D225N を持つ一つのクレードに集積し(Clade N)、Am 感受性株は別個のクレードを形成した。しかしながら、2006-07 年シーズンの株は A/Wisconsin/67/2005 (2006-07 年ワクチン株)で代表される Clade N からさらに進化しており、S193F と D225N の変異を持ちながら、アマンタジン耐性株と感受性株がそれぞれでいくつかのグループを形成するという状況となった。Am 耐性株は A/Brisbane/10/2007 系統と、A/Henan Jinshui/147/2007 の二つの系統に分かれ、アマンタジン感受性株は A/Nepal/921/2006 の系統をふくむ二つの系統にわかれた。先シーズンと違い、アマンタジン耐性株に特徴的なアミノ酸変異は無かった(図 3)。

A/H1N1 株は全体的に新しいワクチン株である A/Solomon Islands/3/2006 に近い系統であった。さらに HA 遺伝子は急増したアマンタジン耐性と、感受性株で二つの系統に分かれた。アマンタジン耐性株は HA 遺伝子に全て K192M, A193T, T197K の S193F の変異を持ち一つのクレードを形成し、アマンタジン感受性株は D45N, K149R の変異を持つ別のクレードに属した。(図 4)。

今回の調査で2006-07年も引き続きアマンタジン耐性株が日本各地で流行の主流を占めていることが判明した。A/H3N2は昨シーズンよりさらに頻度が高くなり、さらには昨シーズンには耐性がみられなかった A/H1N1でも半数以上の株が耐性化していた。各地での頻度も大きな差はみられず、横浜市、奈良県でも同様の報告があることから、全国的な耐性株流行であったことが示された。

世界的には2006年にはアジア、ヨーロッパ、南北アメリカ、オセアニアでアマンタジン耐性株が A/H3N2は流行株の50-90%をしめており、A/H1N1でも流行株の20-100%をしめて世界的に二つのサブタイプで耐性株が大流行したことが報告されている。遺伝子データベースを使い、我々が独自に行った遺伝子解析より2005-06年に世界的に大流行した A/H3N2耐性株は Clade Nに属するウイルスであることがから判明し、さらに詳細な国別解析では Clade Nウイルスは2005年5月以降に中国南部、東南アジア、オセアニア、台湾、沖縄など8000km四方に渡る太平洋州の広範な範囲に分布したことが判明した(図5)。これらの耐性株はそれぞれの国でのアマンタジン使用との関連性は薄く、中国でSARSや鳥インフルエンザ流行以降に人や鳥でアマンタジンが大量に使用されたことと関連すると推測される。しかしながら、従来はM2遺伝子変異が起こることによって伝播性が低下して市中株流行を起こさなかったアマンタジン耐性株に、さらに他の何らかの遺伝子変異が加わることで Clade N以降の耐性株は飛躍的に伝播性が向上したものと思われる。

2006-07年シーズンの日本の株のHA遺伝子の特徴としては、前年の Clade Nは耐性株のみで構成されていたが、このシーズンは Clade Nからさらに遺伝子変化を起こし、耐性株と感受性株が混在したことである。これは、アマンタジン耐性株は Clade Nとなることで飛躍的な伝播率を獲得したものの、やはり耐性株には増殖または伝播に不

利益な条件が存在するために感受性株に逆戻りしつつあるのではないかと考えられる。一方、H1N1では2005-06年シーズンのアマンタジン耐性株同様に、HA遺伝子の特定の部位に変異が起こっており、その中でも特に193位は重要であると考えられる。何故ならH3N2の clade Nでも同部位に変異しており、2003-04年にベトナム、タイで大流行した Clade Iに属する A/H5N1は全てアマンタジン耐性株であり、その系統でも全てHA遺伝子の193位に変異を持っていた。このため、これら大流行したHA遺伝子の193位の変異は3つのサブタイプに共通である。これらのHA部位は宿主シアル酸レセプター結合部位近傍であるため、この部位が伝播率の飛躍的向上に寄与している可能性がある。今後、伝播性の向上と他の遺伝子変異との関連性、HA変異とM2イオンチャンネル機能との関連性を含めて検討する必要があると思われる。

## E. 結語

近年のA型インフルエンザのアマンタジン耐性株は薬剤の選択圧無しに急速な勢いで世界各地に伝播しており、原因・機序の解明が急がれる。このアマンタジン耐性株の広がりや、新型インフルエンザ出現の際の伝播経路・伝達速度予測のモデルとしても使うことができると考えられ、今後有用なデータであると考えられた。

抗インフルエンザ剤に対する耐性は臨床での薬剤選択に大きく関わるため、今後も注意深くモニタリングを続ける必要がある。

## F 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

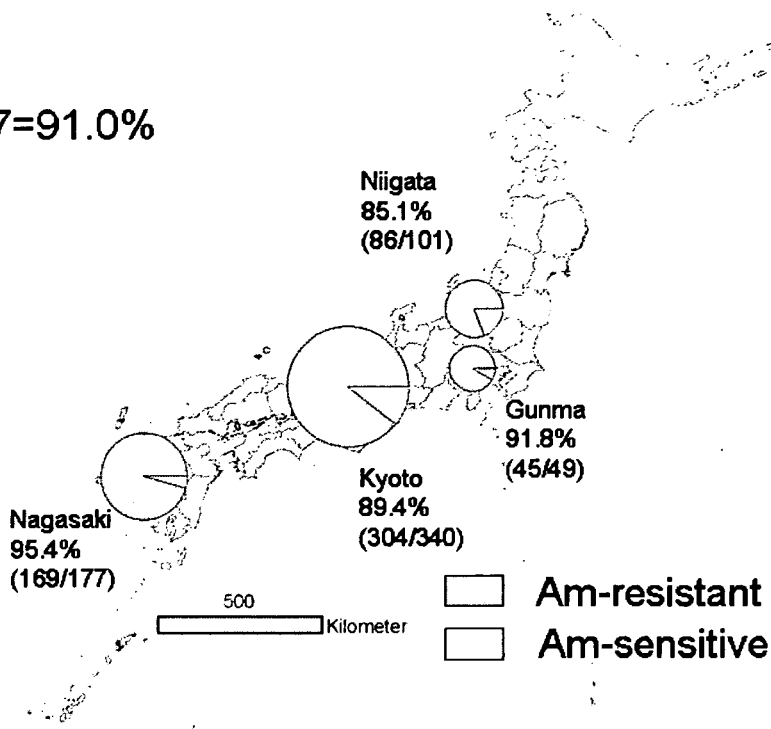
- 1) Saito R, Suzuki Y, Li D, Zaraket H, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Hibi S, Sano Y, Shobugawa Y, Oguma T and Suzuki H.

- Increased Incidence of Adamantane-Resistant Influenza A (H1N1) and A(H3N2) Viruses During the 2006-2007 Influenza Season in Japan. *J Infect Dis* 197, 2008, 630-633
- 2) Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Li D, Suzuki Y, Sasaki A, Sato M, Suzuki H. Recurrence and Persistence of Fever in Children Who Shed Amantadine-Resistant Influenza Viruses after Treatment. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008, 214(2), 129-138
  - 3) Sato M, Saito R, Sato I, Tanabe N, Shobugawa Y, Sasaki A, Li D, Suzuki Y, Sato M, Sakai T, Oguma T, Tsukada H, Gejyo F, and Suzuki H. Effectiveness of oseltamivir treatment among children with influenza A or B virus infections during four successive winters in Niigata City, Japan. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008, 214(2), 113-120
  - 4) Li D, Saito R, Le MTQ, Nguyen HLK, Suzuki Y, Dinh DD, Hoang PVM, Tran HTT, Nghiem THK, Hoang LT, Huynh LP, Nguyen HT, Nishikawa M, Suzuki H. Genetic analysis of influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006, *J Clin Microbiol*, 2008, 46(2), 399-405.
  - 5) Saito R, Li D, Suzuki Y, Sato I, Masaki H, Nishimura H, Kawashima T, Shirahige Y, Shimomura C, Asoh N, Degawa S, Ishikawa H, Sato M, Shobugawa Y, Suzuki H. High prevalence of amantadine-resistance influenza a (H3N2) in six prefectures, Japan, in the 2005-2006 Season, *J Med Virol*, 2007, 79(10), 1569-1576.
  - 6) 齋藤玲子, 鈴木康司, 李丹娟, 菖蒲川由郷, 鈴木宏 アマンタジンの耐性, *インフルエンザ*, 2007, 8(4), 289-294.
  - 7) 齋藤玲子, 鈴木康司, 李丹娟, 鈴木宏, アマンタジン耐性インフルエンザウイルス, *感染炎症免疫*, 2007, 37(3), 275-277.
2. 学会発表
    - 1) 鈴木康司、齋藤玲子、鈴木宏、サイクリングプローブ法によるアマンタジン耐性A型インフルエンザ(S31N 変異)の迅速診断法の開発。第48回日本臨床ウイルス学会。2007年6月2-3日。富山。
    - 2) Saito R, Ki D, Suzuki Y, Shobugawa Y, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Taira K, Nishimura H, Le MT, Nguyen HLK, Nguyen HT, Suzuki H. Prevalence of amantadine resistant influenza A in Japan and Vietnam, and clinical courses of amantadine resistant patients, *Options for the Control of Influenza VI*, June 17-23, 2007, Toronto, Canada.
    - 3) 李丹娟、齋藤玲子、鈴木康司、菖蒲川由郷、西川眞、鈴木宏。ベトナム国における2001-2006年のインフルエンザA/H1N1及びA/H3N2のウイルス遺伝子進化。第55回日本ウイルス学会学術集会。2007年10月21-23日。札幌
    - 4) Reiko Saito Hiroshi Suzuki. Prevalence of amantadine resistance influenza A in Japan and Asian countries. 12<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim December 4-6, 2007, Hainan, China.
    - 5) Reiko Saito, Yasushi Suzuki, Danjuan Li, Hiroshi Suzuki. Circulation of amantadine resistance influenza A in Japan. 12<sup>th</sup> Annual Meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program-Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. February 25-26, 2008. Bethesda, Maryland, 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

☒ 1

**Prevalence of amantadine resistance A/H3N2 in 2006-07 in Japan  
(excluding Okinawa)**

604/667=91.0%

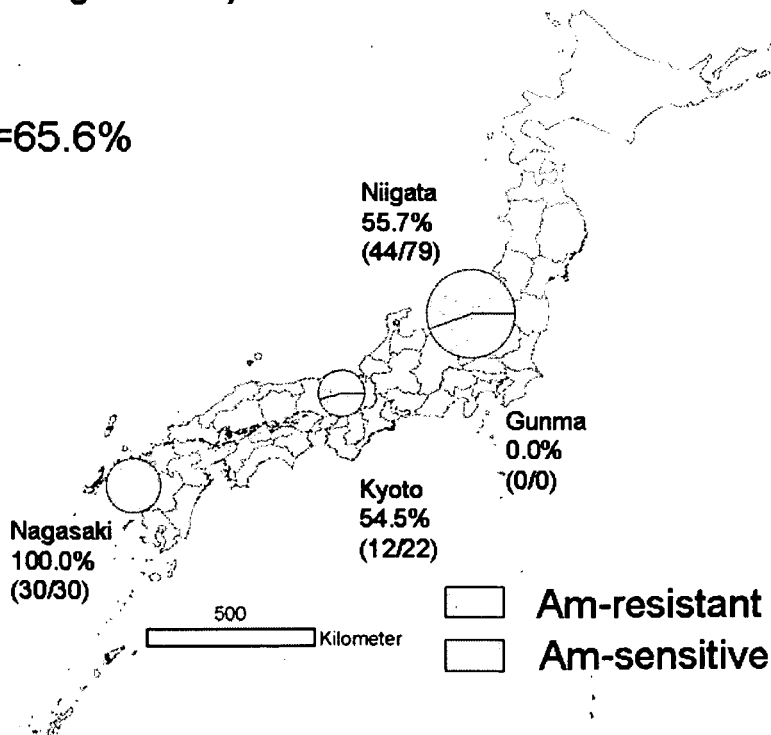


Saito et al. JID 2008

☒ 2

**Prevalence of amantadine resistance A/H1N1 in 2006-07 in Japan  
(excluding Okinawa)**

86/131=65.6%



Saito et al. JID 2008

図 3

Phylogenetic tree analysis  
for A/H3N2 in 2006-07  
season  
(Neighbor-joining method)

Red - Amantadine resistance  
Blue - Amantadine sensitive

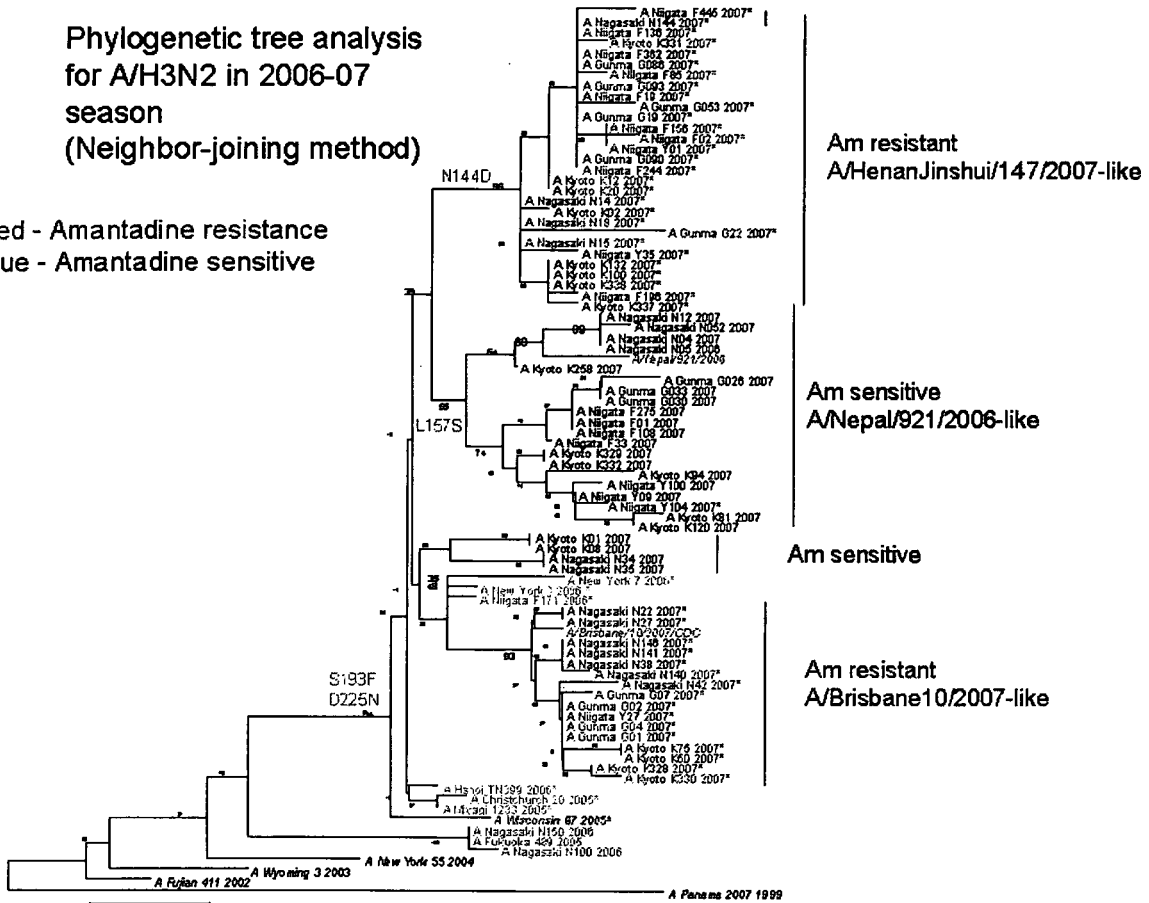
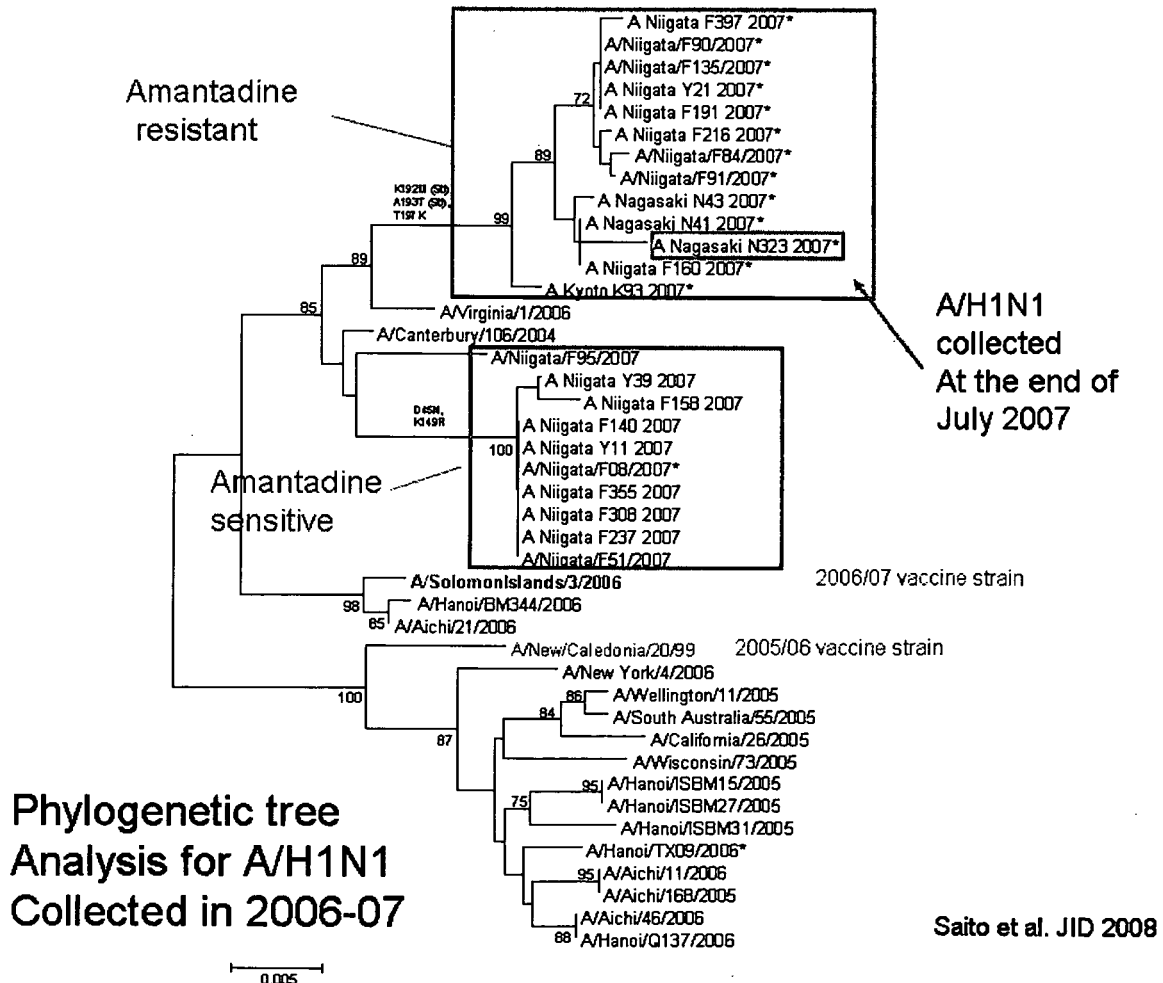


図 4



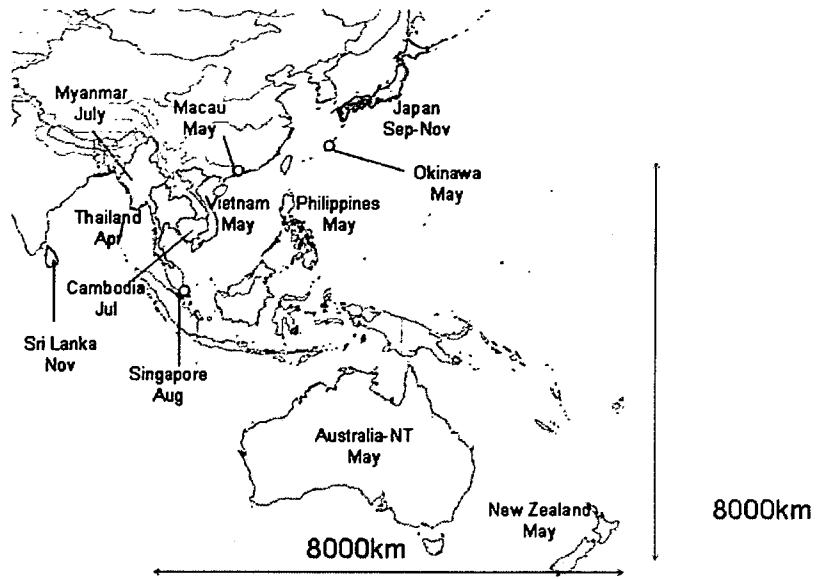
Phylogenetic tree  
Analysis for A/H1N1  
Collected in 2006-07

Saito et al. JID 2008



图 5

## Distribution of clade N amantadine resistance strains in 2005 in Asia



Clade N strains appeared in Asia in early 2005 and spread to wide areas in several months.

### 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表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大石和徳	髄膜炎菌 肺炎桿菌 モラキセラ・カタラーリス	杉本恒明 矢崎義雄	内科学	朝倉書店	東京	2007	p306 p311 p318
大石和徳	新興・再興感染症	井村裕夫	わかりやすい 内科学	文光堂		2008	P523- 526

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Saito R, Suzuki Y, Li D, Zaraket H, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Hibi S, Sano Y, Shobugawa Y, Oguma T and Suzuki H.	Increased Incidence of Adamantane-Resistant Influenza A (H1N1) and A(H3N2) Viruses During the 2006-2007 Influenza Season in Japan.	J Infect Dis	197	630-633	2008
Shobugawa Y, Saito R, Sato I, LI D, Suzuki Y, Sasaki A, Sato M, Suzuki H.	Recurrence and Persistence of Fever in Children Who Shed Amantadine-Resistant Influenza Viruses after Treatment.	Tohoku J. Exp. Med.	214(2)	129-138	2008
Sato M, Saito R, Sato I, Tanabe N, Shobugawa Y, Sasaki A, Li D, Suzuki Y, Sato M, Sakai T, Oguma T, Tsukada H, Gejyo F, Suzuki H.	Effectiveness of oseltamivir treatment among children with influenza A or B virus infections during four successive winters in Niigata City, Japan	Tohoku J. Exp. Med	214(2)	113-120	2008
Li D, Saito R, Le MT Q, Nguyen HLK, Suzuki Y, Dinh DD, Hoang PV M, Tran HTT, Nghiem THK, Hoang LT, Huynh LP, Nguyen HT, Nishikawa M, Suzuki H.	Genetic analysis of influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006,	J Clin Microbiol	46(2)	399-405	2008

Saito R, Li D, Suzuki Y, Sato I, Masaki H, Nishimura H, Kawashima T, Shirahige Y, Shimomura C, Asoh N, Degawa S, Ishikawa H, Saito M, Shobugawa Y, Suzuki H.	High prevalence of amantadine-resistance influenza A (H3N2) in six prefectures, Japan, in the 2005-2006 Season,	J Med Virol	79(10)	1569-1576	2007
齋藤玲子, 鈴木康司, 李丹娟, 菖蒲川由郷, 鈴木宏	アマンタジンの耐性	インフルエンザ	8(4)	289-294	2007
齋藤玲子, 鈴木康司, 李丹娟, 鈴木宏,	アマンタジン耐性インフルエンザウイルス,	感染炎症免疫,	37(3)	275-277	2007
Han HJ, Kamachi K, Okada K, Toyozumi-Ajishaka H, Sasaki Y, Arakawa Y.	Antigenic variation in <i>Bordetella pertussis</i> isolates recovered from adults and children in Japan	Vaccine	26(12)	1530-1534	2008
Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, Yamanaka N.	Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan.	Antimicrob Agents Chemother	51(11)	3969-3976	2007
Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N.	Can the Etest correctly determine the MICs of beta-lactam and cephalosporin antibiotics for beta-lactamase-negative ampicillin-resistant <i>Haemophilus influenzae</i> ?	Antimicrob Agents Chemother	51	3463-3464	2007
Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Arai J, Katsurahara T, Moriyama S, Fujihara K, Yamanaka N.	Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex PCR.	Eur J Pediatr	24		2007