

2. 学会発表

1. Yamanaka N: Clonal spread of drug-resistant *S.pneumoniae* and *H.influenzae*. 12th Annual Meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections (ARI) Panel. February 25-26, 2008, Bethesda, Maryland, USA
 2. Yamanaka N: How to select and use antimicrobial agents for intractable otorhinolaryngological infections? . 12th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology- Head and Neck Surgery. Luncheon Seminar 2008.4.3-5 Nara Japan
 3. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N: Serotype Distributions and Penicillin Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Middle Ear Fluids of Pediatric Acute Otitis Media in Japan. 108th General Meeting. 2008.6.1-5 Boston, USA
 4. Yamanaka N, Hotomi M, Akamatsu Y, Sugita R, Uno Y: Rapid Detection of Pneumococcal Antigen by Immunochromatography Test. 108th General Meeting 2008.6.1-5 Boston, USA
 5. Moriyama S, Hotomi M, Billal DS, Yamanaka N: Production of Biofilm by *Haemophilus influenzae* Isolated from Pediatric Intractable Otitis Media. 108th General Meeting 2008.6.1-5 Boston, USA
 6. Yamanaka N, Hotomi M, Katsurahara T, Yamauchi K, Billal DS, Hollingshead S, Briles D: Maternal intranasal immunization against *H.influenzae* and *S.pneumoniae*. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. 2008.6.8-12 Reykjavik, Iceland
 7. Yamauchi K, Hotomi M, Sugita R, Uno Y, Akamatsu Y, Billal DS, Yamanaka N: Rapid detection of pneumococcal antigen by immunochromatography test. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. 2008.6.8-12 Reykjavik, Iceland
 8. Sugita R, Sugita G, Funaki T, Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N: Molecular biological study of infectious mechanisms in Conjunctivitis, Otitis media, and Rhinosinusitis in young children. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008.4.19-22 Barcelona, Spain
 9. Yamanaka N, Hotomi M, Billal DS: Molecular identification and clonal dissemination of *Haemophilus haemolyticus* in acute pharyngotonsillitis. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008.4.19-22 Barcelona, Spain
- G. 知的所有権の取得状況: 無し

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

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 秦 亮 (久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門)
後藤 憲志 (久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門)

研究要旨 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果について検討した。β-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-susceptible (BLNAS) 3 株及び β-lactamase-negative ABPC-resistant (BLNAR) 3 株を 48 時間培養後、ABPC, cefotaxime (CTX), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), imipenem (IPM), meropenem (MEPM), biapenem (BIPM) を加え、それぞれバイオフィルムに対する効果を比較検討した。Microtiter biofilm assay において CAM, LVFX では 10 MIC 以上の濃度で BLNAS 株及び BLNAR 株のいずれにもバイオフィルムの抑制効果がみられたが、その他の薬剤では BLNAS 株よりも BLNAR 株に対するバイオフィルムの抑制効果が乏しく、特にカルバペネム剤 (IPM, MEPM, BIPM) の BLNAR 株に対するバイオフィルムの抑制効果が単剤では乏しいことが示唆された。

A. 研究目的

近年、人に中耳炎や下気道感染症を引き起こし、時に難治化することがある Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) がバイオフィルムを産生することが明らかとなってきた。現在、本邦では β-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-resistant (BLNAR) 株の増加が臨床上的の問題となっているが、薬剤耐性菌のバイオフィルムに対する抗生物質の効果は明らかではない。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、特に重症感染症に用いられることが多いカルバペネム剤を含め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 β-lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS) 3 株及び BLNAR 3 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, cefotaxime (CTX), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), imipenem (IPM), meropenem (MEPM), biapenem (BIPM)) をそれぞれ 0.01, 0.1, 1, 10, 100MIC の濃度で 12 時間おきに計 4 回添加し、Microtiter biofilm assay を

行った。

C. 研究結果

Microtiter biofilm assay では CAM, LVFX では 10MIC 以上の濃度で BLNAS 株及び BLNAR 株のいずれにもバイオフィルムの抑制効果がみられたが、その他の薬剤では BLNAS 株より BLNAR 株に対するバイオフィルムの抑制効果が乏しく、特にカルバペネム剤 (IPM, MEPM, BIPM) の BLNAR 株に対するバイオフィルムの抑制効果が乏しかった。

D. 結論および考察

カルバペネム剤は重症感染症に切り札的に用いられることが多い抗生物質であるが、本研究では薬剤耐性菌である BLNAR 株に対し、他剤よりもバイオフィルムの抑制効果が乏しいという結果が得られた。NTHi、特に耐性菌である BLNAR 株による難治性感染症の場合、カルバペネム剤単剤による治療では治療効果が乏しいことが示唆された。今後、同剤の他剤との併用での NTHi が産生するバイオフィルムに対する効果について検討していきたい。

E. 健康危険情報
特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Qin L, Masaki H, Gotoh K, Furumoto A, Terada M, Watanabe K, and Watanabe H. Molecular epidemiological study of *Moraxella catarrhalis* isolated from nosocomial respiratory infection patients in a community hospital in Japan. Intern Med (in press).
2. Kuroki R, Kawakami K, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Kimura Y, Ishiguro C, Tanimura S, Tsuchiya Y, Hamaguchi I, Sakakura M, Sakabe S, Tsuji K, Inoue M, and Watanabe H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Intern Med (in press).
3. Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, and Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant gene isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. J Infect Chemother, 14: 349-353, 2008.
4. Ogata K, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hara K, Honda H, Ide T, Kumashiro R, Kohara M, Sata M, Watanabe H, and Hamada N. A mutational shift from domain III to II in the ribosomal entry site of hepatitis C virus with interferon-ribavirin therapy. Archives of Virology, 153: 1575-1579, 2008.
5. 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, 214: 121-128, 2008.
6. 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, 68: 262-268, 2008.
7. 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, 14: 105-109, 2008.

8. 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, 50: 514-518, 2008.
 9. 酒井義朗、井上光鋭、執行素美、石橋幹雄、有馬千代子、久保裕子、鶴田美恵子、永田見生、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩。点眼薬の分注に関するアンケート調査—流行性角結膜炎の集団発生を経験して—。医療薬学 34: 1028-1031, 2008.
 10. 久保裕子、酒井義朗、有馬千代子、鶴田美恵子、三浦美穂、升永憲治、本田順一、渡邊 浩。抗菌薬の適正使用に関する当院 ICT の取り組み—指定抗菌薬使用届出制導入後における MRSA 陽性患者数の推移も含めて—。環境感染誌 23: 201-205, 2008.
2. 学会発表
1. 秦 亮、真崎宏則、渡邊 浩。Characteristics and genetic relatedness of *Moraxella catarrhalis* isolated from a community hospital in Japan. 第 78 回日本感染症学会西日本地方会学術集会。広島、2008.12.5.
 2. 渡邊 浩。病理解剖室における空気感染対策。第 61 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会。沖縄、2008.11.6.
 3. 渡邊 浩。ワークショップ 3、臨床症状から診断する熱帯感染症、フィリピン帰国後に発熱、頭痛が出現し短期間で死亡した一症例。第 49 回日本熱帯医学会大会・第 23 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会。東京、2008.10.25.
 4. 後藤憲志、渡邊 浩。当院海外旅行外来における長期海外滞在者へのワクチン接種の現状。第 12 回日本渡航医学会学術集会。岡山、2008.7.18.
 5. Watanabe H. Infection control for airborne and droplet infection. 4th Shanghai International Forum of Infection Control. Shanghai, China, 2008.5.21.
 6. 渡邊 浩、後藤憲志。ワークショップ

5. 海外旅行者の感染症対策、久留米大学病院における海外旅行外来の現状と問題点。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
7. 原 好勇、渡邊 浩。ミニ特別講演、ヒト・メタニューモウイルス感染症－ウイルス学的性状および集団感染－。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.18.
8. 後藤憲志、渡邊 浩。Nontypable *Haemophilus influenzae* が産生する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。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
9. 秦 亮、真崎宏則、渡邊貴和雄、古本朗嗣、渡邊 浩。Genetic analysis of *Streptococcus pneumoniae* isolates indicating possible nosocomial transmission routes in Japan. 第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
10. Watanabe H, Kaji C, Watanabe K, Apicella MA. Analysis of the effectiveness of different classes of antibiotics for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Washington DC, USA, 2008.2.25.
11. 三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩。病院建物解体工事に伴う病院内での感染対策について。第 23 回日本環境感染学会総会。長崎、2008.2.23.
12. 渡邊 浩、三浦美穂、升永憲治。久留米大学病院で発生したアデノウイルス 37 型による流行性角結膜炎のアウトブレイク事例。第 23 回日本環境感染学会総会。長崎、2008.2.22.
13. 渡邊 浩。特別講演 2; 注目すべき院内感染の事例とその対策。日本医療マネジメント学会第 8 回福岡地方会。久留米、2008.1.19.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

臨床検体を用いた百日咳菌タイピング法の迅速化に関する検討

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨 臨床検体からの百日咳菌タイピング法(multilocus sequence typing, MLST)には操作性ならびに迅速性が劣るといふ欠点があり、本法の迅速化を目的に改良を行った。従来法の nested-PCR について PCR プライマーと酵素を検討したところ、異なる3種類の PCR を同一条件で行うことが可能となり、改良法では操作性と迅速性が向上した(全工程 2 日間)。また、改良法は高い検出感度(2.4 genomic DNA copies)を有し、さらに臨床検体に対する解析率(84.6%)は従来法よりも優れていることが示された。

研究協力者

蒲地一成(国立感染症研究所 細菌第二部)

韓 賢子(同上)

鯉坂裕美(同上)

で、本研究では簡便かつ迅速な MLST 法の確立を目的に、3種類の allelic gene について同一条件での nested-PCR を試みた。また、2008 年の地域流行で採取された臨床検体を用いてその有用性を評価した。

A. 研究目的

近年、わが国では成人百日咳患者の急増が認められ、2007 年には日本各地で青年・成人層を中心とする集団感染事例が発生した。また、愛媛県宇和島市では百日咳の地域流行が認められ、罹患者の多くを小児が占めた。これらの集団感染と地域流行から分離菌はほとんど得られず、臨床分離株を必要とする分子疫学は適用できない状況にあった。我々はこの問題を解決するため臨床検体からの直接タイピング法を(multilocus sequence typing, MLST)を開発し、2007 年の集団感染事例の解析に本法を応用した。

我々が開発した MLST 法は nested-PCR とシーケンスにより百日咳流行株の allelic gene (*ptxS1*, *prn*, *fim3*)を決定し、その allele タイプの組み合わせから菌タイピングを行う方法である。本法により臨床検体からの直接タイピングが可能となったが、本法には操作性と迅速性が劣るといふ欠点があった。そこ

B. 研究方法

MLST:百日咳菌の allelic gene (*ptxS1*, *prn*, *fim3*)を nested-PCR により増幅した。1st PCR と 2nd PCR は同一条件(98°C 10s, 55°C 30s, 68°C 45s, 30 cycle)で行い、PCR 酵素には KOD FX (TOYOBO)を使用した(図1)。PCR 産物は ExoI/SAP で処理後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit を用いてシーケンス反応を行った。反応産物は BigDye X Terminator キットにより精製した後、シーケンス解析に供試した。表 1 にプライマー配列を示した。

感度評価: *Bordetella pertussis* 東浜株からゲノム DNA を精製し、EASY Dilution (TAKARA)を用いて 1 pg/μl から 0.1 fg/μl にまで連続希釈した。この精製 DNA を本法の nested-PCR に供試し、増幅産物を 2%アガロースゲルにより解析した。

臨床検体: 2008 年に秋田県で発生した百日咳地域

流行から採取された臨床検体(72 検体)のうち、遺伝子検査(LAMP 法)で陽性となった 13 検体を MLST に供試した。なお、DNA 検体は患者の鼻腔分泌物から QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)を用いて精製した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト臨床検体は診断目的に採取されたものであり、ヒト遺伝子の解析を目的としない。ただし、臨床検体は非連結匿名化し、個人が特定できないよう配慮した。

C. 結果

従来の MLST 法は PCR 酵素に *TaKaRa EX Taq* を使用し、さらに *prn* の遺伝子増幅には DMSO(終濃度 10%)の添加が必要であった。この DMSO 添加は ExoI/SAP 処理の妨げとなるため PCR 産物の精製が必須であった。そこで、DMSO 添加を必要としない PCR 酵素として KOD FX を選択し、さらにプライマーの変更を行った(表1)。その結果、1st PCR と 2nd PCR は同一条件(98°C 10s, 55°C 30s, 68°C 45s, 30 cycle)で実施することが可能となり(図1)、さらに全工程を 2 日間に短縮することが可能となった。精製百日咳菌 DNA を用いて本法の検出感度(analytical sensitivity)を検討したところ、*ptxS1* と *fim3* は 2.4 genomic copies (10 fg DNA)、*prn* は 0.2 genomic copies (0.1 fg DNA)まで遺伝子増幅が認められ、本法の検出感度は 2.4 genomic copies と判断された(図2)。

本法の臨床検体に対する解析率(clinical sensitivity)を検討したところ、13 検体中 11 検体で MLST が決定され、その解析率は 84.6%と算出された(MLST-1, 9 件; MLST-2, 1 件; MLST-4, 1 件)(表2)。なお、MLST が決定できなかった 2 検体のうち 1 検体は *ptxS1*、残り 1 検体は *prn* と *fim3* の両者に遺伝子増幅が認められなかった。従来法による解析率は大学の集団感染事例では 11.7%、愛媛県宇和島市の地域流行では 58.3%であったこ

とから、今回の改良法は高い解析率を持つことが示された。

D. 考察

百日咳菌は菌分離率の低い感染症であり、特にワクチン既接種者の青年・成人患者からの菌分離はほとんど期待できない。そのため、成人の百日咳集団感染事例では分子疫学的な解析が適用できず、他の流行との疫学的な関連性を考察することは難しい状況にあった。2007 年、我々はこの問題を解決するため臨床検体からの菌タイピング法を開発し、百日咳の事例解析に応用を進めてきた。本法により流行株のゲノムタイピングは可能となったが、操作が煩雑で多数の検体を扱うには操作性ならびに迅速性が劣るという問題点があった。そこで、迅速化を目的に本法の改良を試みたところ、PCR プライマーならびに酵素を変更することにより、同一条件での遺伝子増幅が可能となり全工程を 2 日間に短縮することが可能となった。また、本改良法の臨床検体に対する解析率は従来法に比べ高く、今後、本法により百日咳集団感染や地域流行の実態解明が進むものと期待される。

本法は病原性遺伝子のうち多様性が認められる *ptxS1*、*prn*、*fim3* 遺伝子を標的とし、わが国の臨床分離株は主に 5 タイプに分類することが可能である。ただし、MLST-1 は臨床分離株の 50%を占めるため、詳細なタイピングには上記 3 遺伝子の他に新たな allelic gene を組み合わせることが必要である。現在までに、国外の流行株には *fim2*、*shaB*、*tefA* などに多様性が認められているが、わが国の臨床分離株はすべて *fim2-1*、*shaB1*、*tefA2* を示し多様性は確認されていない。ただし、近年 Mooi らは *ptxS1* の 5'-UTR に多様性を見出しており、わが国の流行株にもその多様性が存在する可能性が指摘される。今後は本法の解析能を高めることが重要となり、*ptxS1* の 5'-UTR のみならず新たな allelic gene の検索が必要である。

E. 結論

臨床検体からの百日咳菌 MLST 法について迅速化を目的に改良を加えたところ、全工程を2日間に短縮することが可能となった。また、PCR プライマーと酵素の変更により、従来法よりも高感度な検出系を確立することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:なし
2. 学会発表:

1) 蒲地一成, 韓賢子, 豊泉裕美, 荒川宜親. 百日

咳菌の新規タイピング法の確立とその応用. 第82回日本細菌学会総会, 平成21年3月, 名古屋(予定)

- 2) 韓賢子, 蒲地一成, 桑江朝臣, 阿部章夫, 荒川宜親. 百日咳菌タイプIIIエフェクターBopCのIS481による発現調節. 第82回日本細菌学会総会, 平成21年3月, 名古屋(予定)

H. 知的所有権の出願・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

表1 百日咳菌MLSTのプライマー

primer	5'→3'	GenBank for allele type
ptx-outerF	TAACGCGGGTCTATCACAAC	<i>ptxS1A</i> :AJ245366
ptx-outerR	TAGAACGAATACGCGATGCT	<i>ptxS1B</i> :AJ245367
ptx-innerF	GACCACGACCACGGAGTATT	
ptx-innerR	GTACACGAGAACCATCGCCT	
prn-AF	GCCAATGTCACGGTCCAA	<i>prn1</i> :AJ011091
prn-AR	GCAAGGTGATCGACAGGG	<i>prn2</i> :AJ011092
prn-innerF	GTCATTGCAGCCGGAAGACC	
prn-innerR	CCGGTCTCGATGACATTGCC	
Fim3-F1	ATGTCCAAGTTTTTCATACCC	<i>fim3A</i> :X51543
Fim3-R1	GGTGACCTTGCCGGTAAA	<i>fim3B</i> :AY464180
fim3-innerF	CCAGCACCCCTCAACCATATC	
fim3-innerR	GGCTTGCGTGGTTTTGTC	

1st PCR		2nd PCR	
2xPCR buffer	7.5 μ l	2xPCR buffer	7.5 μ l
2 mM dNTPs	3.3 μ l	2 mM dNTPs	3.3 μ l
Primer-F (3 pmol/ μ l)	1 μ l	Primer-F (3 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer-R (3 pmol/ μ l)	1 μ l	Primer-R (3 pmol/ μ l)	1 μ l
KOD-FX	0.33 μ l	KOD-FX	0.33 μ l
Template DNA	1.87 μ l	Template DNA	1 μ l
Total	15 μ l	DW	0.87 μ l
		Total	15 μ l

Fig.1 改良 MLST 法の PCR 反応組成

1st PCR では患者 DNA 検体 1.87 μ l を添加し、94°C で 2 分間処理後 PCR 反応を開始する。

2nd PCR には 1st PCR の反応液 1 μ l を直接添加し、同条件で PCR 反応を開始する。

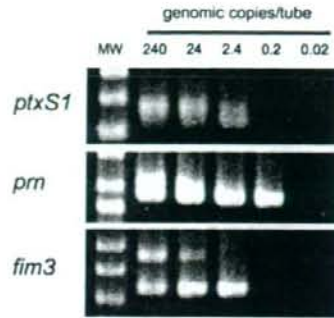


Fig.2 改良 MLST 法の検出感度

精製百日咳菌 DNA (240, 24, 2.4, 0.2, 0.02 genomic copies)を用いて nested-PCRを行った。反応後、1 μ l を 2%アガロースゲルに供試した。

表2. 改良MLSTの解析率 (clinical sensitivity)

MLST解析	outbreak	No. of tested sample	No. of identified sample	Analytic rate (%)
改良法	地域流行 (秋田県)	13	11	84.6
従来法	地域流行 (愛媛県)	12	7	58.3
	大学 (高知県)	94	11	11.7
	中高一貫校	1	1	—
	消防署 (青森県)	2	2	—

分担研究報告書

TLR agonist をアジュバントとした PspA 蛋白経鼻粘膜ワクチンの
気道における菌クリアランス効果

分担研究者 大石和徳、大阪大学微生物病研究所

研究要旨：

PspA と各種 Toll like Receptor (TLR) agonist のマウス経鼻粘膜接種による Th1 あるいは Th2 型 IgG アイソタイプ応答と気道における菌クリアランス効果との関連性を検討した。PspA と Pam3CSK4, Poly (I;C), LPS あるいは CpG 1826 の経鼻接種により、PspA 単独接種に比較して、有意な血漿中特異 IgG 抗体、BALF、NW 中特異 IgG と IgA の産生誘導が認められた。血漿中のアイソタイプ応答では、Pam3 と LPS が IgG1 優位 (Th2 応答) だったのに対し、Poly IC と CpG は IgG1 と IgG2a (Th1 応答) 双方の産生が認められた。WU2 株の菌接種 3 時間後の肺内菌数は PBS 接種群と PspA 単独接種群では同等であったが、PspA+TLR agonist ではいずれも肺組織中菌数が PBS 接種群あるいは PspA 単独接種群で有意に減少した。EF3030 株の菌接種 1 日後の nasal wash (NW) 中菌数は PBS 接種群と PspA 単独接種群では同等であったが、PspA+TLR アゴニストではいずれも NW 中菌数が PBS 接種群あるいは PspA 単独接種群に比較して有意に減少した。Th1/ Th2 応答の違いに関わらず、PspA+TLR agonist によるマウス上気道定着および肺炎モデルにおける菌クリアランス促進効果は同等であった。

A. 研究目的

現有の肺炎球菌コンジュゲートワクチンは小児において侵襲性感染症のみならず、肺炎の発症を予防する。しかしながら、血清型特異的ポリサッカライド抗体を誘導するためワクチン非含有血清型に無効なこと、価格が高価である点が問題である。一方、肺炎球菌の表層に存在する Pneumococcal surface protein A (PspA) は補体 C3 分子の菌表層への結合阻害を介して、その病原性因子としての機能を発揮する。PspA に対する特異 IgG 抗体は異なる血清型由来の PspA に対しても交叉反応し、オプソニン活性を介して感染防御効果を示すと推定される。また、肺炎球菌の主要な感染経路は経気道感染であるため、血中の PspA 特異 IgG のみならず、

気道粘膜に PspA 特異的 IgA 抗体産生を誘導することで、肺炎球菌による呼吸器感染症の予防が期待できる。

今回、我々は PspA に加え、TLR agonist を粘膜アジュバントとして経鼻接種し、気道中および血中の PspA 特異抗体産生を誘導し、それぞれの TLR agonist による IgG isotype による Th1/Th2 応答パターンの違いとマウスにおける気道クリアランス促進効果との関連性を明らかにする。

B. 研究方法

1) PspA+TLR agonist 経鼻接種による特異抗体産生誘導

C57/BL6 マウスを用いてリコンビナント PspA 蛋白(ファミリー 1, クレード 2)

2.5 μ g と TLR アゴニスト (Pam3CSK4, Poly (I:C), LPS, CpG 1826) 各 10 g を同時に 3 回、1 週間おきに経鼻免疫した。最終免疫より 1 週間後のマウスより血漿、鼻腔洗浄液 (NW) および 気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し PspA 特異抗体濃度を ELISA にて測定した。

2) PspA+TLR agonist 経鼻接種の気道における菌クリアランス促進効果

最終免疫 2 週間後にマウスに肺炎球菌 WU2 株 (血清型 3, PspA ファミリー 1, クレード 2 の強毒株を非致死量の 2×10^6 cfu) および EF3030 株 (血清型 19F, PspA ファミリー 1, クレード 1 の弱毒株 3×10^5 cfu) を経鼻接種し、感染後の肺内あるいは NW 中の生菌数をカウントした。

C. 研究結果

1) PspA+pFL 経鼻接種と DC 誘導

PspA と Pam3CSK4, Poly (I:C), LPS あるいは CpG 1826 の経鼻接種により、PspA 単独接種に比較して、血漿中の有意な特異 IgG 抗体レベルの増加が認められた。また、BALF (下気道) 中にも NW (上気道) 中にも特異 IgG と IgA の産生誘導が認められた。血漿中のアイソタイプ応答では、Pam3 と LPS が IgG1 優位 (Th2 応答) だったのに対し、Poly IC と CpG は IgG1 と IgG2a (Th1 応答) 双方の産生が認められた。

WU2 株の菌接種 3 時間後の肺内菌数 (Log_{10} cfu/g) は PBS 接種群と PspA 単独接種群では同等 (6.0 ± 0.3 , 6.0 ± 0.4) であったが、PspA+TLR アゴニストではいずれも肺組織中菌数が PBS 接種群あるいは PspA 単独接種群有意に減少した。一方、

菌接種 6 時間と 12 時間では PspA 単独群の肺内菌数が PBS 接種群に比較して有意に減少し、PspA+TLR アゴニストと PspA 単独群の差が消失した。次に、EF3030 株の菌接種 1 日後の NW 中菌数 (Log_{10} cfu/ml) は PBS 接種群と PspA 単独接種群では同等 (5.1 ± 0.1 , 5.2 ± 0.3) であったが、PspA+TLR アゴニストではいずれも NW 中菌数が PBS 接種群あるいは PspA 単独接種群に比較して有意に減少した。一方、EF3030 株の菌接種 6 日後の NW 中菌数も PBS 接種群と PspA 単独接種群では同等で、CpG を除いた PspA+TLR アゴニストではいずれも PBS 接種群あるいは PspA 単独接種群に比較して有意に減少した。

D. 考察

マウスにおける PspA+TLR アゴニストの経鼻接種により PspA 特異 IgA と IgG の産生誘導に伴い、異なる血清型の WU2 株、EF3030 株の気道中菌クリアランスは有意に促進された。TLR アゴニストにより、Th1 型 IgG アイソタイプ応答 (Poly IC, CpG) と Th1+Th2 型 IgG アイソタイプ応答 (Pam3, LPS) が認められたが、肺炎球菌によるマウス上気道定着および肺炎モデルにおける気道内菌クリアランス促進効果は同等であった。

E. 結論

TLR agonist による Th1/ Th2 応答の違いに関わらず、PspA+TLR agonist 併用経鼻粘膜ワクチンのマウス上気道定着および肺炎モデルにおける菌クリアランス促進効果は同等であった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, Oishi K. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine* 26:4284-4289, 2008
2. Chen M, Ssali F, Mulungi M, Awio P, Yoshimine H, Kuroki R, Furumoto A, Tanimura S, Kityo C, Nagatake T, Mugenyi P, Oishi K. Induction of opsonophagocytic killing activity with pneumococcal conjugate vaccine in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. *Vaccine* 26:4962-4968, 2008
3. Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother.* 14: 105-109, 2008
4. Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant genes isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. *J Infect Chemother.* 14:349-353, 2008
5. 大石和徳. 医学と医療の最前線 肺炎球菌ワクチン—5年後の再接種の是非—。日本内科学会雑誌. 97: 836-841, 2008

6. 大石和徳. 細菌ワクチンの現状. *Medical Science Digest.* 34: 444-447, 2008

2. 学会発表

1. 大間敬太, 大石和徳: Flt3 プラスミドを用いた PspA 経鼻粘膜免疫の肺炎予防効果. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.
2. 内田隆一, Kerdsin Anusak, 川上和義, 大石和徳: SYBER Green Triplex Real Time PCR による呼吸器マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラ感染の診断. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.
3. 大石和徳. : 日本とアジアにおける新興感染症の状況と対策. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.
4. 坂東園子, 大石和徳. : ウガンダ成人における肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性: 血清特異的 IgG のオプソニン活性の意義. 日本ワクチン学会, 熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.
5. 川上健司, 大日康史, 大石和徳. : 65 歳以上の成人における肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果に関する検討. 日本ワクチン学会, 熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.
6. 大間敬太, 趙 吉子, 大石和徳. : PspA に対する TLR ligand の粘膜アジュバント効果の比較. 日本化学療法学会西日本支部総会, 広島, 2008 年 12 月 6-7 日.

7. Oma K, Zhao J, Oishi K. Comparative analysis on mucosal adjuvancity of TLR ligands against PspA. 108 th General Meeting, American Society for Microbiology. 1-5 June, 2008, Boston, USA.

8. Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Tanaka Y, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Clinical and microbiological studies on pediatric pneumonia in Bangkok. Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Vietnam. Oct 6, 2008

9. Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Tanaka Y, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of correlation among bacterial carriage in nasopharynx, socioeconomics, and pediatric pneumonia: an interim report of case control study in Bangkok. The 13th Congress of Asia Pacific Society of Respiriology, Bangkok, Thailand. Nov 21,2008

10. Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of nasopharyngeal Pneumococcus for etiology of pediatric pneumonia. the 1st National Pneumococcus Symposium, Bangkok, Thailand. Nov 26,2008

11. Puangpatra P, Uchida R, Oishi K, Tanaka

Y, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Kawakami K, Verathamjamras C, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Surang Dejsirilert. Risk factors for nasopharyngeal Pneumococcal colonization and pneumonia in children. the 1st National Pneumococcus Symposium, Bangkok, Thailand. Nov 26,2008

H. 知的所有権の取得状況

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（社会保障国際協力推進研究事業）
分担研究報告書

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究
Programme of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010)
動物インフルエンザのサーベイランスと感染制御体制の検討

(分担) 喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座教授

研究要旨: 2005年夏、モンゴルの湖沼で死亡野鳥が発見され、死亡したオオハクチョウの臓器材料からH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスA/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1) (以下モンゴル株) が分離されたことをこれまでに報告した。感染実験により、本ウイルスは2週齢のアイガモに対して致死的な病原性を示すことが明らかとなった。そこで、リバーズジェネティクス法を用いてこの病原性に関与する遺伝子分節の特定を試みた。その結果、モンゴル株のカモに対する病原性にはPB2、PA、HA、NPおよびNS遺伝子が関与していることが明らかとなった。また、2008年の9月から11月にかけて、北海道およびモンゴルで採集した野生水禽の糞便1,312検体から75株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH3、H4、H6、H7、H9、H10、H11の7つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H5、N6、N7、N8、N9の7つの亜型に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められず、すべて弱毒タイプのウイルスであった。今回分離されたウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。実験室で作出した遺伝子再集合ウイルスを加え、16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通り全てのウイルスをワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザはアジア地域だけでなく、ヨーロッパ、アフリカ諸国においても発生が報告され、被害が拡大している。現在流行しているH5N1亜型のウイルスによるヒトへの感染・死亡例も報告されており、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。インフルエンザウイルスに感受性がある動物としては、ニワトリ、カモ、七面鳥、馬、豚、ミンクなどが報告されている。また、ヒトを含む哺乳動物および鳥のインフルエンザAウイルスの遺伝子の起源は、カモなどの野生水禽のウイルスであることが今までの研究から明らかにされている。これらのことから、本研究は動物インフルエンザのグローバルサーベイランスを継続して実施し、分離同定されたウイルス株の抗原性、遺伝子性状、病原性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

A/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1)

株(以下モンゴル株)の8本の遺伝子分節をクローニングし、人工的にウイルスを合成した。さらに、2週齢アイガモに対して病原性を示さないA/Hong Kong/483/97 (H5N1)株の8本の遺伝子分節も同様にクローニングし、人工的にウイルスを合成した。これらのウイルスおよびこれら2つのウイルスの遺伝子再集合ウイルスを作製した。これを2週齢アイガモにそれぞれ接種し、モンゴル株がカモに対して致死的な病原性を示すことに関与する遺伝子分節の特定を行った。

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からウイルス分離をした。分離されたウイルスのHAおよびNAの亜型を同定した。HAおよびNAの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、これらのウイルス株のHA遺伝子の塩基配列を決定し、HA開裂部位のアミノ酸配列を解析した。

C. 研究結果

リバーズジェネティクス法を用いて2つ

の親ウイルス（モンゴル株とA/Hong Kong/483/97 (H5N1)株）の8分節をそれぞれ置き換えた遺伝子再集合ウイルスをすべての組み合わせについて作出し、カモに接種した。その結果、モンゴル株がカモに対して致命的な病原性を示すためにはPB2、PA、HA、NPおよびNS遺伝子5分節が関与していることが明らかとなった。また、カモにおける病原性は脳におけるウイルスの増殖と高い相関があることがわかった。

野生水禽の糞便1,312検体から75株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH3、H4、H6、H7、H9、H10、H11の7つの亜型に、NA亜型はN1、N2、H5、N6、N7、N8、N9の7つの亜型に区分された。分離されたウイルス株のHA開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通り全てのウイルスをワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存した (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>)。

D. 考察

H5N1モンゴル株の水禽に対する病原性の分子基盤が明らかとなった。また、本年のグローバルサーベイランスでは、高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されることはなかった。高病原性鳥インフルエンザウイルスが野生水禽とその営巣湖沼水の間で存続しているかを明らかにするためにも疫学調査の継続が必要である。

E. 結論

動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスは、動物とヒトのインフルエンザ対策に有益な情報とウイルス株を得ることができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Soda, K., Sakabe, S., Sakamoto, R., Imamura, T., Sakaguchi, M., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Saijo, K., Sawata, A., Hagiwara, J.,

Lin, Z., and Kida, H. (2008). Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch Virol* 153, 1685-1692.

(2) Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawaoka, Y., Ogasawara, K., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.

(3) Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M., Bai, G. R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008). H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37, 16-21.

(4) Manzoor, R., Sakoda, Y., Mweene, A., Tsuda, Y., Kishida, N., Bai, G. R., Kameyama, K., Isoda, N., Soda, K., Naito, M., and Kida, H. (2008). Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes* 37, 144-152.

(5) Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamoto, M., and Kida, H. (2008). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* 83, 1572-1578.

- (6) Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., and Kida, H. (2008). Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci* 70, 557-562.
- (7) Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kishida, N., Isoda, N., and Kida, H. (2008). Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol*.
- (8) Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26, 2127-2134.
- (9) Sawai, T., Itoh, Y., Ozaki, H., Isoda, N., Okamoto, K., Kashima, Y., Kawaoka, Y., Takeuchi, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2008). Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124, 155-165.
- (10) Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida, H. (2008). Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch Virol* 153, 2041-2048.
- (11) 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.

2. 学会発表

- (1) 「2008年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡松正敏、迫田義博、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (2) 「インフルエンザウイルスのカモに対する病原性の分子基盤の解析」梶原将大、曾田公輔、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (3) 「鳥インフルエンザウイルスの病原性獲得メカニズムの解析」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (4) 「高病原性鳥インフルエンザウイルス Ck/Yamaguchi/7/04 (H5N1) のブタにおける増殖能獲得の分子基盤」迫田義博、Rashid Manzoor、野村直樹、津田祥美、岡松正敏、尾崎弘一、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (5) 「2008年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」岡

松正敏、迫田義博、吉田裕美、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏 第146回日本獣医学会学術集会（2008年、宮崎）

- G. 知的財産の出願、登録状況
予定なし。

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表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagao T, Morishima T, Kimura H, Yokota S, Yamashita N, Ichiyama T, Kurihara M, Miyazaki C, Okabe N.	Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy.	The Pediatric Infectious Disease Journal	27 (5)	384-389	2008
Saito R, Li D, Zaraket H, Sato I, Masaki H, Kawashima T, Hibi S, Sano Y, Shobugaea Y, Oguma T, Suzuki H	Increased Incidence of Adamantane-Resistant Influenza A (H1N1) and A (H3N2) Virus es During the 2006-2007 Influenza Season in Japan	JID	197	630-33	2008
Katsurahara T, Hotomi M, Yamauchi K, Billal DS, Yamanaka N.	Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA).	J Infect Chemother	14	393-398	2008
Yamanaka N, Hotomi M, Billal DS.	Clinical bacteriology and immunology in acute otitis media in children.	J Infect Chemother	14	180-187	2008
Hotomi M, Billal DS, Kamide Y, Kanesada K, Uno Y, Kudo F, Ito M, Kakehara S, Sugita R, Ogami M, and Yamanaka N for the Advanced Treatment for Otitis Media Study Group (ATOMS)	Serotype distribution and penicillin resistance of <i>streptococcus pneumoniae</i> isolates form middle ear fluids of pediatric patients with acute otitis media in Japan.	J Clin Microbiol	46 (11)	3808-3810	2008

Billal DS, Hotomi M, Shimada J, Fujihara K, Ubukata K, Sugita R, Yamanaka N.	Prevalence of streptococcus invasive locus (<i>siI</i>) and its relationship with macrolide resistance among group A <i>streptococcus</i> strains.	J Clin Microbiol	46 (4)	1563-1564	2008
Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N.	Rotavirus vaccine for developing countries.	Correspondence	372 August 9	444	2008
Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N.	Wealth and child survival: India and Bangladesh	Correspondence	372 October 25	1459	2008
Moriyama S, Hotomi M, Shimada J, Billal DS, Fujihara K, Yamanaka N.	Formation of biofilm by <i>Haemophilus influenzae</i> isolated from pediatric intractable otitis media.	Auris Nasus Larynx			2009
Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, <u>Oishi K.</u>	Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease.	Vaccine	26	4284-4289	2008
Chen M, Ssali F, Mulungi M, Awio P, Yoshimine H, Kuroki R, Furumoto A, Tanimura S, Kityo C, Nagatake T, Mugenyi P, <u>Oishi K.</u>	Induction of opsonophagocytic killing activity with pneumococcal conjugate vaccine in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults.	Vaccine	26	4962-4968	2008
Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, <u>Nakayama T</u>	Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification.	J Med Virol	80	517-523	2008

Shinjo M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, <u>Nakayama T.</u>	Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation.	Vaccine	26	9859-9863	2008
Sakata M, Komase K, <u>Nakayama T</u>	Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity.	Vaccine	27	234-242	2008
Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, and Watanabe H.	Prevalence of <i>Haemophilus influenzae</i> with resistant gene isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam.	J Infect Chemother.	14	349-353	2008
Ogata K, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hara K, Honda H, Ide T, Kumashiro R, Kohara M, Sata M, Watanabe H, and Hamada N.	A mutational shift from domain III to II in the ribosomal entry site of hepatitis C virus with interferon-ribavirin therapy.	Archives of Virology	153	1575-1579	2008
Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, and Watanabe H.	Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> isolates within biofilms.	Tohoku J Exp Med	214	121-128	2008