

平成22年1月26日(火)

新型コロナウィルス等新興・再興感染症研究事業 研究事業
予防接種後健康被害審査の効率化に関する研究
 (H21-新興-一般-018) 研究報告

研究者名	分担する研究項目	所属研究機関	職名
研究代表者 多摩雄子	予防接種後健康被害審査ならびに予防接種後副反応の発生率の効率化に関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター・予防接種学、小児感染症学、臨床ウイルス学	室長
研究分担者 岡部信彦	国内外の予防接種後健康被害審査ならびに予防接種後副反応の発生率の効率化に関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター・感染症疫学、予防接種学	センター長
研究分担者 安井良則	自治体での予防接種後健康被害審査ならびに副反応発生システムに関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター・感染症疫学、カー・バイオランス	主任研究官
研究分担者 妙川真生	海外での予防接種後健康被害審査と副反応報告の実態に関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター、薬学疫学	主任研究官
研究分担者 田中敬博	海外での予防接種後健康被害審査と副反応報告システムに関する研究	トトロト小児病院 臨床薬理学部門 小児臨床薬理学	クリニカル・フェロー 主任研究官
研究分担者 葉倉雅樹	予防接種後健康被害ならびに予防接種後副反応報告とワクチン・接種の成分ならびにその性状に関する研究	国立感染症研究所特定検定製品製造所	主任研究官
研究分担者 新井 智	予防接種後健康被害審査システムの開発に関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター、ウイルス学、疫学	主任研究官
研究分担者 依置 弘	予防接種後健康被害審査システムの開発に関する研究	国立感染症研究所感染症情報センター、血清疫学、ウイルス学	研究員
研究分担者 山本久美	国内外での予防接種後健康被害の発生調査と予防接種後健康被害の事例収集	国立感染症研究所感染症情報センター・感染症疫学	研究員

わが国の予防接種後健康被害に関するモニタリングならびに救済制度

- 定期接種後の安全性モニタリング(平成6年以降)
 - 定期の予防接種実施要領に基づく予防接種後副反応報告
 - 予防接種後健康状況調査
 - 予防接種法に基づく定期接種及び臨時接種
 - 予防接種法に基づく健康被害救済制度
- 法に基づかない定期外接種(任意接種)
 - 独立行政法人医薬品医療機器総合機構法に基づく救済制度

本研究班の概要

- 予防接種後副反応報告と予防接種後健康被害救済認定の2つを統合する「**予防接種後健康被害解析システム**」を構築する
- 過去10年以上にわたって蓄積されている**紙媒体の資料を電子化し、構築したシステムにデータ移行する**
- データ移行後は、**予防接種後副反応に関する集計、解析を行い、安全な予防接種の実施に資する研究を行うと共に、国民への迅速な情報提供を行う**
- 副反応に集積が認められた場合は、その**原因についてワクチンの成分の観点から検討する**
- 国内外の予防接種後副反応報告について情報収集し、海外の予防接種後副反応情報の収集ならびに健康被害救済システムについて情報収集することで、わが国に適したシステム(日本版VAERS)の構築を行う**

予防接種後副反応報告

- 平成6年の予防接種法の改正に伴い開始された制度です。
- 「定期の予防接種実施要領」に基づき、多くは医師、薬剤師、一部保健士、看護師から、市町村、保健所、都道府県を經由して、厚生労働省に報告されています。
- 対象となる予防接種は、予防接種法に定められている予防接種で、2010年1月現在、**DPT、DT、麻しん、風しん、麻しん風しん混合(MR)、日本脳炎、ポリオ、BCG、季節性インフルエンザワクチン**です。
- 現在の予防接種後副反応報告は、下記の報告書への**手書き入力**であり、厚生労働省には**紙媒体で報告**がなされています。
- 迅速かつ効率的な集計、解析、結果の公表が困難

構築した電子化報告ファイル
 入力補助機能・入力チェック機能・統合機能搭載

NIID National Institute of Infectious Diseases Infectious Disease Surveillance Center

予防接種後健康被害救済制度 (予防接種法に基づく)

第3章: 予防接種による健康被害の救済措置

第11条: 予防接種による健康被害の救済措置。定期または臨時接種を受けたことによる疾病、障害、死亡であると厚生労働大臣が認定した場合は、給付を行う。その際、厚生労働大臣等(国家行政組織法第8条に規定する機関)で聴かなければならない。

第12条: 給付の範囲: 認定された場合の給付は、以下の内容である。

- ① 一類疾病あるいは臨時接種の場合、①医療費及び医療手当、②障害児医療費(18歳未満)、③障害年金(18歳以上)、④死亡一時金、⑤葬祭料
- ② 二類疾病の場合、①医療費及び医療手当、②障害児医療費(18歳未満)、③障害年金(18歳以上)、④遺族年金、⑤又は遺族一時金、⑥葬祭料

多数の申請書類があるため、一括入力可能な電子化ファイルを作成し、申請者、自治体の負担を軽減する

・昨年度(1年目)に構築し、厚生労働省に納品

・健康被害救済認定の分科会で、委員からの質問に迅速に回答できるように、本システムを全場で使用することで、迅速な救済につなげる

・今後、厚生労働省がこのシステムをどのように活用するかが検討課題

構築した電子ファイル: 入力補助機能・入力チェック機能 統合機能搭載

IDSC

NIID National Institute of Infectious Diseases Infectious Disease Surveillance Center

定期予防接種副反応報告システム (A市)

発生時対策概要(A市)

予防接種副反応発生時対応の概要 (A市)

定期予防接種副反応報告システム (A市)

保健師又は本人
↓
A市 (予防接種担当部署、保健所)
↓
B県
↓
厚生労働省

保健師又は本人
↓
A市 (予防接種担当部署、保健所)
↓
B県
↓
厚生労働省

① 医師、医師が予防接種を提出
② 医師、予防接種副反応発生時発生届(予防接種による健康被害から)を提出
③ 医師、報告(健康被害発生届)を提出(報告はB県へ、知れたこの時点で)
④ 医師から厚生労働省への迅速な連絡(電話)を提出
⑤ 医師から厚生労働省への迅速な連絡(メール)を提出
⑥ 医師、健康被害発生届(予防接種による健康被害から)を提出
⑦ 厚生労働省へ送付
⑧ 厚生労働省の認定又は不認定の通知
⑨ 健康被害発生届(予防接種による健康被害から)を提出

※①～⑨ 半々一律1年

A市に対して、事前に行った調査では、ワクチン副反応報告自体が年間数例(2009年度はゼロ)である

自治体は、作成したファイルに入力されている情報をもとに、報告・管理すべきか? データの活用方法は? 緊急のままで電子ファイル化による自治体のメリットは何か? 情報の活用方法は?

各自自治体からの意見・要望を取りまとめ、次年度の修正に反映させていく予定

電子化データで蓄積・厚生労働省へ送付することで迅速化

IDSC

NIID National Institute of Infectious Diseases Infectious Disease Surveillance Center

予防接種後健康被害救済申請・予防接種後健康被害救済システム

「予防接種後健康被害救済申請」から「予防接種後健康被害救済申請」に認識されている情報もデータベースにて管理し、さまざまな角度からの統計および情報検索を可能にすることで、予防接種後の健康被害救済申請の迅速化ならびに適正化を目的とする。

目的

管理対象範囲

本システムでは、「予防接種後健康被害救済申請」ならびに「予防接種後健康被害救済申請書」について、従来は電子データとして蓄積された情報から管理対象とする。

予防接種後健康被害救済申請
・予防接種後健康被害救済申請書
・予防接種後健康被害救済申請書
・健康被害発生届
・健康被害発生届
・健康被害発生届

データベース
データ入力機能
ファイル入力機能
印刷機能
一覧印刷機能
単票印刷機能
統計機能

電子データ
データベース

図1 予防接種後健康被害救済申請・予防接種後健康被害救済システムの構築概要

IDSC

NIID National Institute of Infectious Diseases Infectious Disease Surveillance Center

定期予防接種副反応報告システム (A市)

発生時対策概要(A市)

予防接種副反応発生時対応の概要 (A市)

定期予防接種副反応報告システム (A市)

保健師又は本人
↓
A市 (予防接種担当部署、保健所)
↓
B県
↓
厚生労働省

保健師又は本人
↓
A市 (予防接種担当部署、保健所)
↓
B県
↓
厚生労働省

① 医師、医師が予防接種を提出
② 医師、予防接種副反応発生時発生届(予防接種による健康被害から)を提出
③ 医師、報告(健康被害発生届)を提出(報告はB県へ、知れたこの時点で)
④ 医師から厚生労働省への迅速な連絡(電話)を提出
⑤ 医師から厚生労働省への迅速な連絡(メール)を提出
⑥ 医師、健康被害発生届(予防接種による健康被害から)を提出
⑦ 厚生労働省へ送付
⑧ 厚生労働省の認定又は不認定の通知
⑨ 健康被害発生届(予防接種による健康被害から)を提出

※①～⑨ 半々一律1年

A市に対して、事前に行った調査では、ワクチン副反応報告自体が年間数例(2009年度はゼロ)である

自治体は、作成したファイルに入力されている情報をもとに、報告・管理すべきか? データの活用方法は? 緊急のままで電子ファイル化による自治体のメリットは何か? 情報の活用方法は?

各自自治体からの意見・要望を取りまとめ、次年度の修正に反映させていく予定

電子化データで蓄積・厚生労働省へ送付することで迅速化

IDSC

NIID National Institute of Infectious Diseases
Infectious Disease Surveillance Center

予接種種後副反応に関するワクチン製剤の成分 ならびにその性状に関する研究

国際的に動物福祉や倫理上の観点から、動物試験の代替法に関する研究が精力的に進められている。我が国においても、*in vitro*代替試験法の開発を進めると共に、その妥当性および限界を十分に評価していくことが重要である。

精製百日せきワクチン中の残存百日咳毒素活性を検出するマウスヒスタミン増感試験の代替法として、百日咳毒素-AサブユニットのADP/リボシル化活性およびBサブユニットのレクチン様(Binding)活性を測定する *in vitro*試験法について検討した。これらの *in vitro*試験法によりDTaPワクチンのADP/リボシル化活性およびBinding活性の測定が可能であった。

マウスモデルにおいて追加接種時の局所反応原性が初回接種時の百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感活性(残存百日咳毒素活性)と相関する結果が得られている。上記 *in vitro*試験法により、百日咳毒素-AサブユニットのADP/リボシル化活性およびBサブユニットのBinding活性を別々に測定することが可能となり、追加接種時の局所反応原性と百日咳毒素のいずれの活性が強い相関を示すが評価することで、詳細なワクチン側の副反応(局所反応)因子が明らかになることが期待される。

NIID National Institute of Infectious Diseases
Infectious Disease Surveillance Center

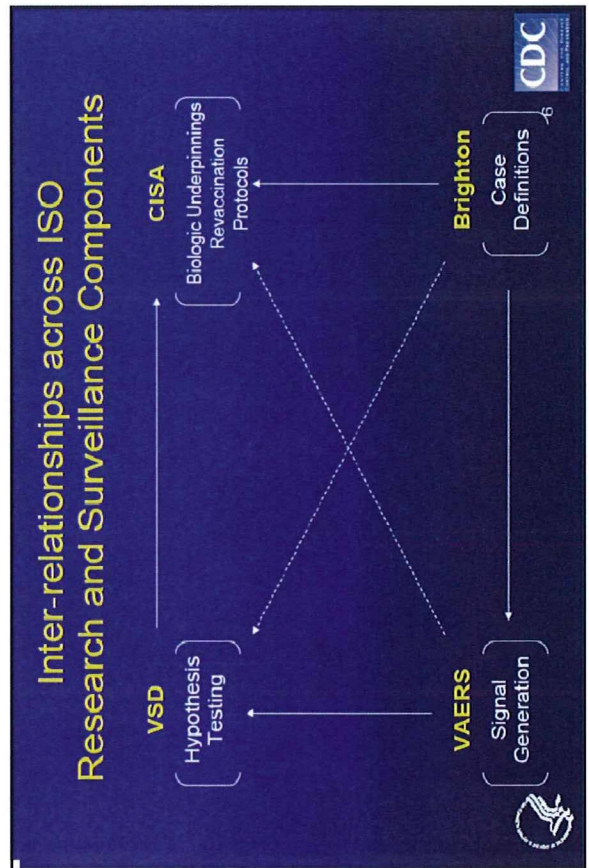
NIID National Institute of Infectious Diseases
Infectious Disease Surveillance Center

国内の予接種種後副反応に関する情報収集 調査結果(医中誌WEB①)

2006~2009年	
ワクチン	5,277件
予接種種	2,505件
副反応	188件
ワクチン or vaccine	(#A) 5,285件
予接種種 or immunization	(#B) 3,223件
副反応 or adverse	(#C) 318件
#A or #B	(#D) 6,220件
#A and #C	132件
#B and #C	115件
#D and #C	138件

(2009年12月21日現在)

IDSC



NIID National Institute of Infectious Diseases
Infectious Disease Surveillance Center

VAERS報告例-2009年掲載-

- Barbara AS, et al. Human papillomavirus vaccine safety in pediatric patients: an evaluation of the vaccine adverse event reporting system. JAMA 2009; 302 (7): 750-757
- Melissa R, et al. Serious adverse events rarely reported after trivalent inactivated influenza vaccine (TIV) in children 6-23 months of age. Vaccine 2009; 27: 4278-4283
- Manette TN, et al. Adverse events after anthrax vaccination reported to the vaccine adverse event reporting system (VAERS), 1990-2007. Vaccine 2009; 27: 290-297
- Wei H, et al. Kawasaki disease after vaccination: reports to the vaccine adverse event reporting system 1990-2007. Pediatr Infect Dis J 2009; 29 (11): 943-947
- Nancy LB, et al. Postlicensure safety surveillance for quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine. Ann Pharmacother 2009; 43 (2): 356-359

VSD報告例-2009年掲載-

- Donahue JG, et al. Varicella vaccination and ischemic stroke in children: is there an association. Pediatrics. 2009; 123 (2): e228-34
- Tate JE, et al. Burden of acute gastroenteritis hospitalizations and emergency department visits in US children that is potentially preventable by rotavirus vaccination: a probe study using the non-withdrawn rotavirus vaccine. Pediatrics. 2009; 123 (3): 744-9
- Batra JS, et al. Evaluation of vaccine coverage for low birth weight infants during the first year of life in a large managed care population. Pediatrics. 2009; 123 (3): 951-8
- Neelson JC, et al. Compliance with multiple-dose vaccine schedules among older children, adolescents, and adults: results from a vaccine safety data link study. Am J Public Health. 2009; 99 Suppl 2: S389-97
- Jackson LA, et al. Frequency of medically attended adverse events following tetanus and diphtheria toxoid vaccine in adolescents and young adults: a vaccine safety data link study. BMC Infectious Diseases 2009; 9: 165

IDSC

平成 21 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した新規アジュバントシステムの開発

課題番号：H20-新興-若手-020

研究代表者：角田 慎一

I. 研究の意義

(1) 新型インフルエンザ等新興再興感染症の服のため、全身系の免疫のみならず、感染が起こる場である粘膜面での免疫をも誘導可能な粘膜ワクチンの確立に大きな期待が寄せられている。また、粘膜ワクチンは非侵襲的投与が可能であることから、注射型ワクチンよりも簡便に使用可能であり、途上国はもとより、先進国でさえ医師等が不足するパンデミック時のワクチンとしても期待される。

(2) 病原性の高い感染症に対しては、生ワクチンよりも安全性の高い成分ワクチン等が望ましいが、抗原を単独で粘膜に投与しても効率よく IgA 産生等を誘導できないため、粘膜ワクチン用のアジュバントが必要である。しかし、これまでに研究されてきたアジュバントの多くは細菌毒素由来物質であり、より安全なアジュバントが望まれる。したがって有効かつ安全な新規粘膜ワクチンアジュバントが開発できれば、新興・再興感染症に対するワクチンの開発に大きく寄与することになる。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 有効性・安全性の観点から、生体（ヒト・マウス）由来物質であり、免疫系制御の主役を担うサイトカイン（TNF スーパーファミリー、インターロイキンファミリー）に着目し、その中から、粘膜ワクチンアジュバントとして有用なサイトカインを探索する。さらに、独自の機能性蛋白質創製技術を駆使することで、粘膜ワクチンアジュバントとして有用な、活性や安定性に優れた機能性サイトカインを創製する。

(2) 以上の研究の成果は、新興・再興感染症に対する新規ワクチン開発に資するとともに、未だ不明な点が多い粘膜免疫システムとサイトカインの役割について有用な知見を提供する。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者（角田慎一）

(1) 粘膜アジュバントとして有効なサイトカインの選択を目的に、マウス経鼻ワクチン実験において、インフルエンザ HA 蛋白質をワクチン抗原とし、26 種類のインターロイキンファミリーサイトカインのアジュバント効果をスクリーニングした。その結果、インターロイキンファミリーサイトカインの中で、IL-1 ファミリーに属する IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33 のみが効率よく全身（IgG）および粘膜面（IgA）の免疫応答を誘導するという新規知見を得た。

(2) IL-1 ファミリーサイトカインによるアジュバント効果は、Th2 および Th1 両タイプ免疫応答を、全身および粘膜面（IgA 産生）において誘導するものであることが示唆された。

(3) 肥満細胞が欠損している W/W^o マウスでの実験から、IL-1 ファミリーサイトカインによる粘膜アジュバントの活性化には肥満細胞が関与する可能性が示唆された。

・研究分担者（吉岡靖雄）

(1) 16 種類の TNF スーパーファミリーサイトカインを用いて経鼻ワクチンアジュバント効果に基づいたスクリーニングを行ったところ、TNF- α 、APRIL、TL1A が効率よく抗原特異的免疫を誘導した。

(2) TNF- α 、APRIL、TL1A によるアジュバント効果は、Th2 タイプの免疫応答を効率よく誘導するものであることを見出した。

アジュバントに用いるサイトカインの種類によって、異なったタイプの粘膜免疫応答を示すことは、有効な粘膜ワクチンシステムの開発に資する極めて興味深い知見である。また、細胞性免疫誘導に関連する Th1 タイプの応答も同時に誘導しうるサイトカインが見出されたことは、有効な粘膜ワクチンシステムの開発に向けて有用な知見と考えられる。詳細な解析は必要であるが、肥満細胞の粘膜免疫制御への寄与が示唆されたことは興味深い。

IV. 22年度の課題

- (1) IL-1 ファミリーサイトカインの粘膜アジュバント効果について、作用点や副作用も含めた、より詳細な検討を実施するとともに、粘膜免疫誘導機序の解析を行う。
- (2) 独自の機能性蛋白質の創出システム (Shibata et Al. *J. Biol. Chem.* (2008), Yamamoto et al. *Nat. Biotechnol.* (2004)) を有効活用し、生体内安定性や生物活性等に優れた機能性サイトカインにすべく分子設計する。
- (3) 粘膜でのトランスサイトシスを担うM細胞に対する特異抗体 (抗 gp2 抗体:大野ら *Nature* 2009, NKM16-2-4 抗体:清野ら *J Exp Med* 2007) を利用してさらなる効果増強できないか検討する。
- (4) 上記成果をもとに、有用な機能性サイトカイン変異体の創製を図るとともに、最適な粘膜アジュバントシステムを構築し、in vivo、in vitro 実験において、インフルエンザウイルス感染・増殖阻害効果を検証する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新型インフルエンザ等の新興・再興感染症に有効な粘膜ワクチンの開発に資することにより、厚生労働行政に貢献する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(論文発表)

- (1) Yoshioka Y., Watanabe H., Morishige T., Yao X., Ikemizu S., Nagao C., Ahmad S., Mizuguchi K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin-alpha with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials*, in press.
- (2) 萱室裕之、角田慎一、堤 康央、新規粘膜ワクチンアジュバントとしての機能性サイトカインの開発 (review)、Drug Delivery Systems. in press.
- (3) 萱室裕之、吉岡靖雄、阿部康弘、形山和史、廣井隆親、角田慎一、堤 康央. 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用 (review). 薬学雑誌, in press.
- (4) Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Kamada H., Nagano K., Tsunoda S. (C.A.), Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*, 29: 5869-76, 2009.
- (5) Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S. (C.A.), Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3): 296-300, 2009.
- (6) Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniyai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.* 385: 1221-1229, 2009.
- (7) Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniyai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Fast binding kinetics and

conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists. *J. Biochem.*, 146(2): 167-72, 2009.

- (8) Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S. (C.A.), Tsutsumi Y. Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J. Immunol. Methods.*, 335(1-2): 71-8, 2008.
- (9) Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S. (C.A.), Tsutsumi Y. The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF-alpha in murine hepatitis models. *Cytokine* 44(2): 229-233, 2008.
- (10) Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandenberg P., Aggarwal B., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor-1 selective mutant of a TNF alpha antagonist. *J. Biol. Chem.* 283: 998-1007, 2008.

ほか2件

(学会発表)

- (1) Kayamuro H., Yoshioka Y., Tsunoda S., et al. Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines., 12th International TNF Conference. Madrid, April 2009.
- (2) Abe Y., Yoshioka Y., Tsunoda S., et al. Mast cells are required for interleukin-18 dependent mucosal immune responses. 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research, Lisbon, October 2009.

ほか7件

(特許出願)

- (1) 角田慎一、堤 康央、吉岡靖雄、「粘膜ワクチン用アジュバント」(特願 2009-055953)

(受賞等)

- (1) ファーマバイオフォーラム優秀発表賞、萱室裕之(研究協力者)ほか「活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用」 2008年11月.
- (2) 12th International TNF Conference ANRF Travel Award、Kayamuro H. (研究協力者) et al. 「Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines」 2009年3月.
- (3) 日本 DDS 学会ベストポスター賞、阿部康弘(研究協力者)ほか「生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価」 2009年7月.
- (4) 第39回 日本免疫学会 Melchers' Travel Award、萱室裕之(研究協力者)ほか「Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal vaccine adjuvant against influenza virus」 2009年12月.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果) の概要図等

**有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発**

背景・ニーズ

新型インフルエンザをはじめとする新興・再興感染症の制圧のため、粘膜面、および全身の両者の免疫を誘導可能な粘膜ワクチンの確立が急務

➡ しかし、抗原単独の投与では、粘膜免疫を効率よく誘導できないため、有効かつ安全な、粘膜ワクチン用のアジュバント開発が必要

アプローチ

独自技術を活用して新規粘膜ワクチンアジュバントシステムを確立する

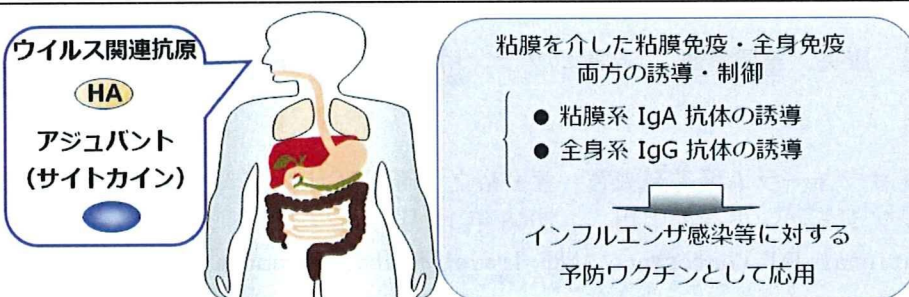
- ①免疫制御を担うサイトカインの応用を試みる
- ②機能性蛋白質改変体創製技術による、新規機能性サイトカインアジュバントの開発
- ③M細胞特異抗体等、ワクチンのDDS化

計画・目標

- ・TNFファミリー、あるいはインターロイキンファミリーサイトカインの中から、粘膜ワクチンアジュバントとして有用なサイトカインを見出すとともに、粘膜免疫システムにおけるそれらサイトカインの役割を解析する。
- ・機能性蛋白質創製技術を用いて、アジュバントとして有用な機能性サイトカイン(高活性、高安定性等)を創製する。
- ・上記粘膜ワクチンシステムの有用性を、インフルエンザウイルスの感染/増殖阻害性により評価する。

将来展開

- ・粘膜免疫の制御メカニズムの解明
- ・インフルエンザ粘膜ワクチン(非生ワクチン)の実用化
- ➡ ・ワクチンの普及、医療コストの削減、適用者の苦痛軽減
- ・厚生労働行政に貢献



- 有効かつ安全な粘膜免疫アジュバントとして、生体物質で免疫制御の主役である様々なサイトカイン (TNFファミリー、ILファミリー) の応用を試みた。
 これまでの研究により、粘膜ワクチンに関する下記の新規知見を得た。
 - ➡ ・IL-1, IL-18, IL-33: Th1およびTh2系免疫応答を誘導する。
 - ・TNF- α , APRIL, TL1A: Th2系免疫応答を誘導する。
 - ・上記サイトカインは副作用なしにHAに対する全身IgG, IgAを効率よく誘導した。
 - ・IL-1ファミリーサイトカインによる粘膜免疫誘導には肥満細胞の関与が示唆された。
 - ・機能性蛋白質変異体創製技術により、高活性TNF変異体の創製に成功した。
- 最終年度は、
 - ➡ ・サイトカインの高機能化による粘膜免疫誘導能の向上、
 - ・粘膜免疫システムにおけるTNFやIL-1ファミリーサイトカインの機能解析
 - ・インフルエンザウイルスの感染阻害効果の検証
 - を行い、新規インフルエンザ粘膜ワクチン開発に資する情報を得る。

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1999年 大阪大学大学院薬学研究科博士課程 修了 (薬剤学分野 真弓忠範 教授)
 1999-2000年 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所・ポスドク (生体物質部)
 2001-2004年 独立行政法人産業技術総合研究所・研究員 (生物機能工学研究部門)
 2004年 国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官 (大阪支所 早川堯夫支所長)
 2005-2007年 独立行政法人医薬基盤研究所・主任研究員
 (創薬プロテオミクスプロジェクト 堤 康央プロジェクトリーダー)
 2008年-現在 同・サブプロジェクトリーダー
 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・准教授 (併任)
 2009年6月- 大阪大学大学院薬学研究科医薬基盤科学分野・准教授 (併任)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・独立行政法人医薬基盤研究所・創薬プロテオミクスプロジェクト 堤 康央プロジェクトリーダー
- ・独立行政法人医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト 森 康子プロジェクトリーダー
- ・東京大学医科学研究所・炎症免疫分野 清野 宏教授
- ・東京都臨床医学総合研究所・花粉症プロジェクト 廣井隆親プロジェクトリーダー
- ・大阪大学微生物病研究所・感染免疫分野 生田和良教授
- ・富山大学大学院医学研究科・産婦人科学教室 斎藤 滋教授
- ・山口大学大学院医学研究科・分子病理学分野 佐々木功典教授
- ・神戸学院大学薬学部／(元)大阪大学大学院薬学研究科・薬剤学分野 真弓忠範教授
ほか

・主な研究課題

- 「ワクチン療法・抗体療法・抗体誘導療法の開発研究」 (医薬基盤研究所)
- 「プロテオミクスによる疾患関連蛋白質の探索とバイオ医薬開発に関する研究」 (医薬基盤研究所)
- 「ヒト腫瘍の分子病理学的解析と悪性度診断技術の開発研究」 (産業技術総合研究所)
- 「生理活性蛋白質のドラッグデリバリーシステムに関する研究」 (大阪大学大学院薬学研究科)

・これまでの研究実績

(論文)

1. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Tani M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y. : The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF-alpha in murine hepatitis models., *Cytokine*, (in press).
2. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3):296-300, 2009.
3. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Kamada H., Nagano K., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses., *Biomaterials*, 29:5869-76, 2009.
4. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y. : Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications

- for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380: 777-782, 2008.
5. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, 153: 1143-1152, 2008.
 6. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S. (C. A.), Tsutsumi Y.: Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., *J Immunol Methods.*, 335 : 71-78, 2008.
 7. Shibata H., Kamada H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tani M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Creation of receptor-selective TNFs with agonistic activity., *J. Biol. Chem.*, 282: 998-1007, 2008.

ほか

(特許出願)

1. 角田慎一, 堤 康央ほか、粘膜ワクチン用アジュバント、特願2009-055953.
2. 角田慎一, 堤 康央新規腫瘍マーカーを用いた乳癌の検査方法、特願2009-060706.
3. 角田慎一, 平野 隆、染色体異常に基づく肝細胞癌の診断方法、特願2004-282279.
4. 角田慎一, 平野 隆ほか肝細胞癌の悪性度評価方法、特願2003-090214.

(受賞等)

平成9年度日本学術振興会特別研究員
 平成11年度NEDO産業技術研究員
 日本薬剤学会第5回優秀論文賞
 平成10年度日本薬学会近畿支部奨励賞
 平成15年度日本サイトメトリー学会学術奨励賞受賞
 平成20年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発

(H20-新興-若手-020)

独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト

角田 慎一

目的

全身系と粘膜面での防御免疫を同時に誘導可能な粘膜ワクチンが、効果および簡便性等の点から確立が期待されている。
しかし、抗原を単独で粘膜に投与しても効率よくIgA産生等を誘導できないため、粘膜ワクチン用のアジュバントが必要である。
従来研究されてきた粘膜アジュバントの多くは細菌毒素由来物質であり、粘膜ワクチン実用化には**安全で有効な粘膜アジュバントの開発**が期待されている。

アプローチ

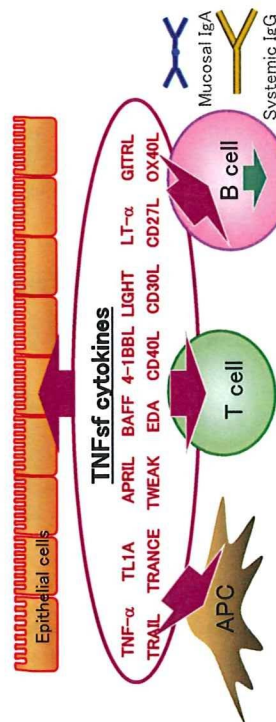
生体由来物質であり、免疫制御の中心を担う**“サイトカイン”を粘膜アジュバントとして応用**する。
機能性たんぱく質改変体創製技術や、DDSの適用による有用性向上を試みる。

目標

- ・TNFファミリー、インターロイキンの**粘膜アジュバント効果**を体系的に解析し、**有用なサイトカイン**を探索。(20, 21年度)
- ・**見出したサイトカインの粘膜免疫システムにおける機能解析**(21, 22年度)
- ・**機能性サイトカイン改変体(活性増強・安定性付与)を創製**。(22年度)
- ・**インフルエンザ感染阻害効果により有用性を検証**。(22年度)

粘膜アジュバント活性に優れたTNFsfサイトカインの探索

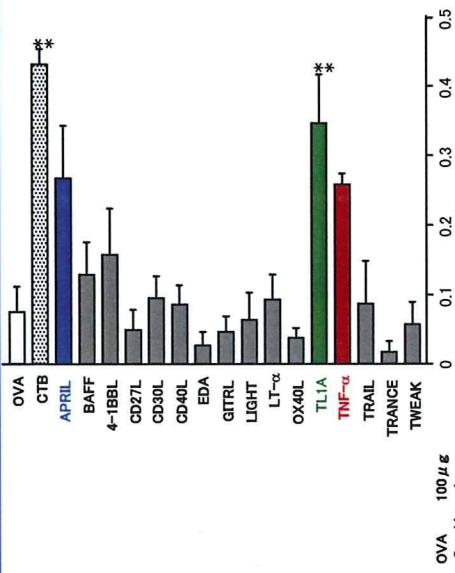
- ・TNFスーパーファミリー(TNFsf)は、生体免疫システムの調節に深く関与するサイトカイン
- ・粘膜アジュバントとしてのTNFsfに関する体系的解析例は無い。



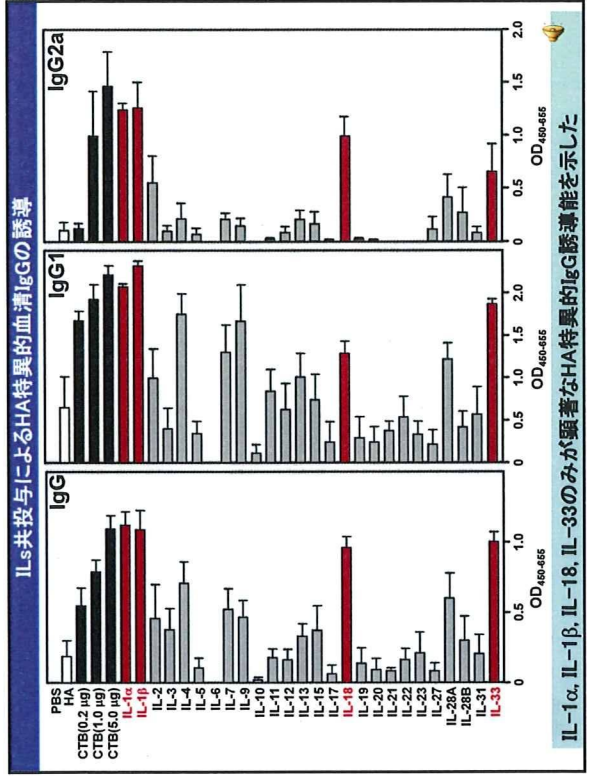
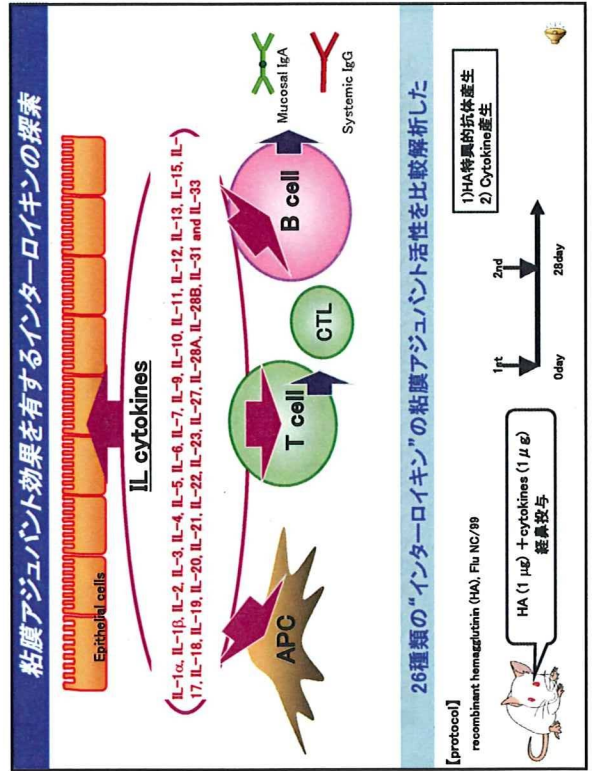
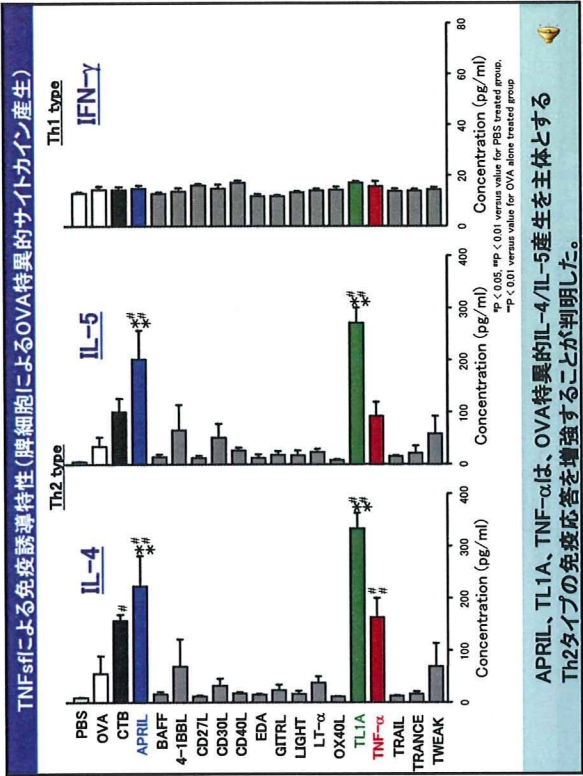
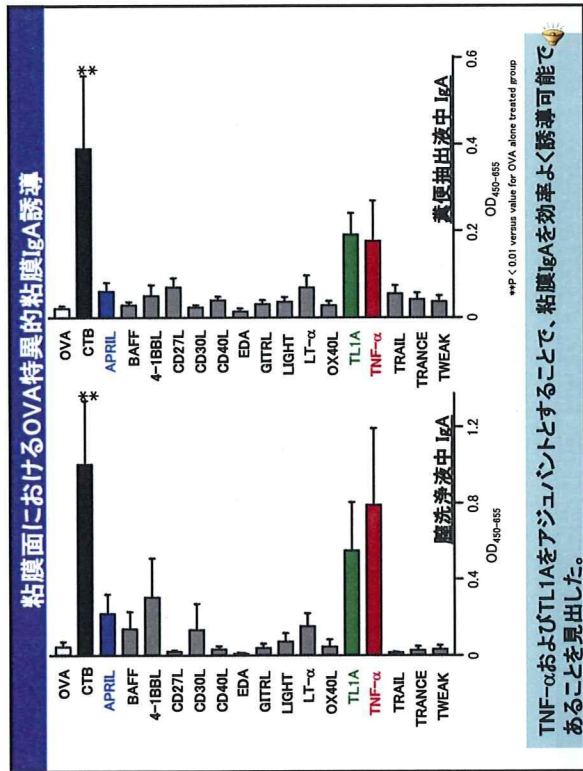
TNFsfによる粘膜アジュバント活性化能の比較解析

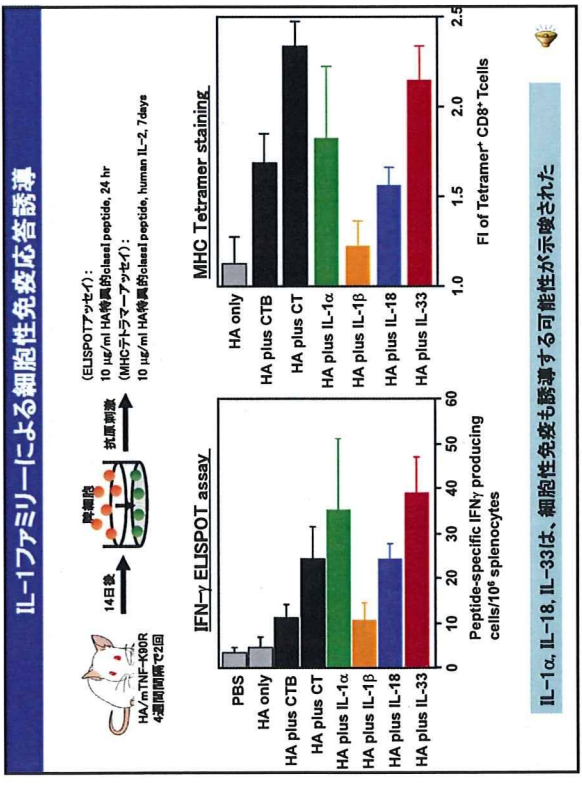
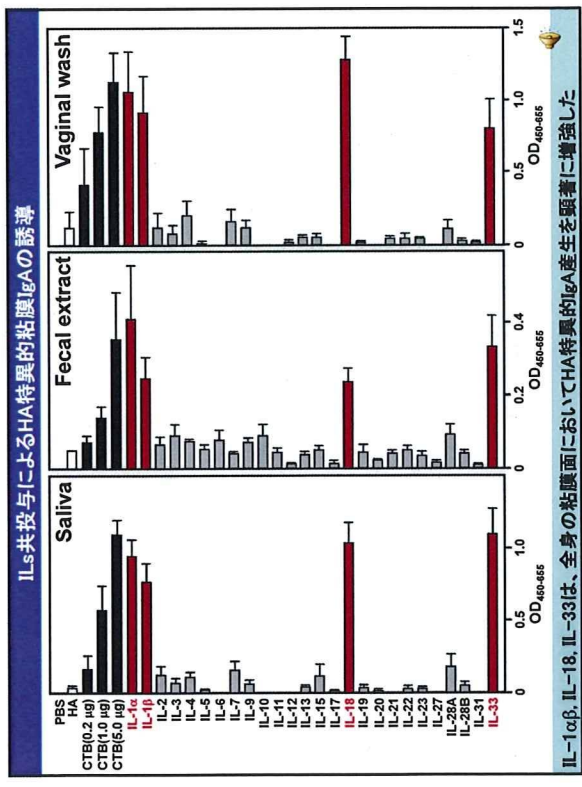
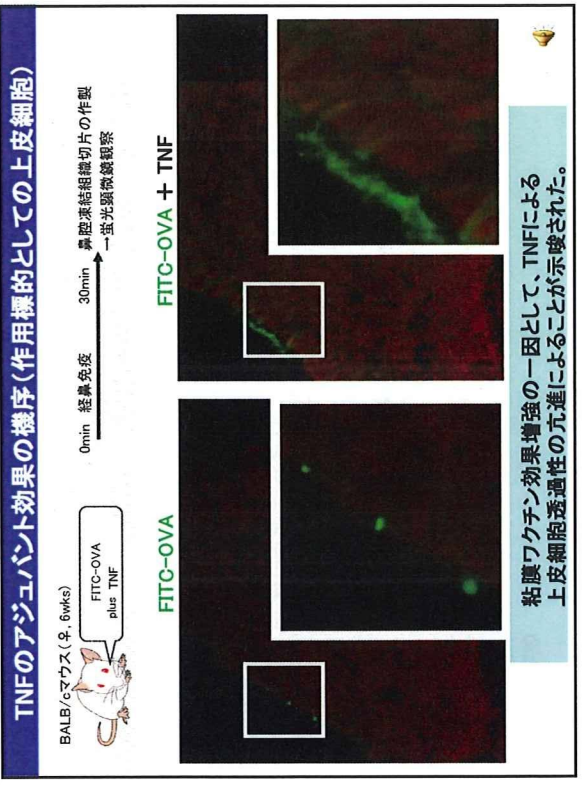
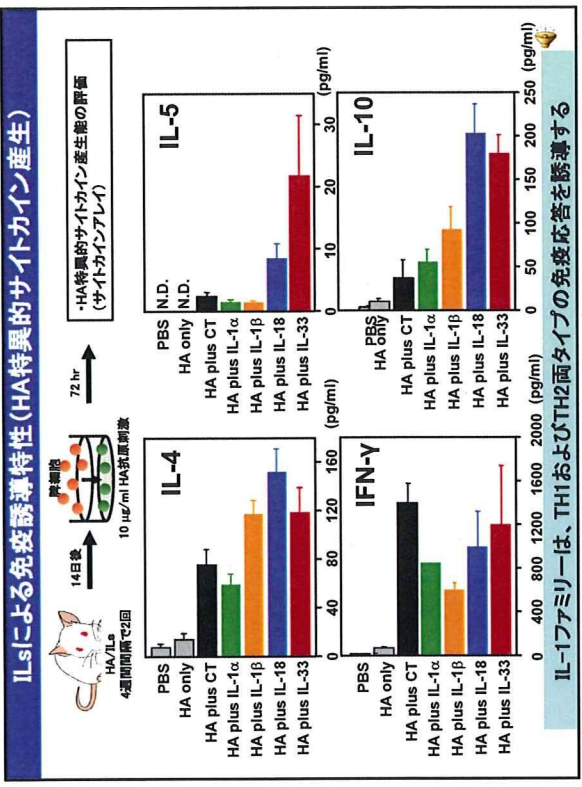


TNFsf共投与によるOVA特異的血清IgG誘導

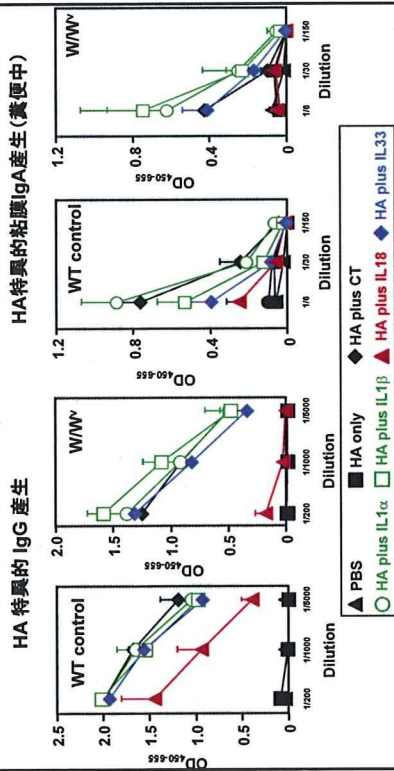


TNFsfサイトカインの中で、APRIL、TNF-α、TL1Aが抗原特異的IgG誘導能に優れていることを見出した





IL-18の粘膜アジュバント効果には肥満細胞が寄与する
肥満細胞欠損マウス(W/W^o)におけるIgG, IgA産生



IL-18による粘膜アジュバント活性の発現には、肥満細胞が重要な役割を担う可能性が
また、IL-1ファミリーの間でも、粘膜免疫誘導機序が異なる可能性が示唆された

結果まとめ

粘膜アジュバントとしてのTNFスーパーファミリーの体系的解析から、TNF- α , TLI1A, APRILが効率よく抗原特異的免疫を誘導しうることを見出した。

粘膜アジュバントとしてのインターロイキン体系的解析から、IL-1ファミリー(IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33)のみが効率よく抗原特異的免疫を誘導しうるといふ知見を得た。

TNF- α , TLI1A, APRILはTh2タイプの免疫応答を、IL-1ファミリーはTh2およびTh1両タイプの免疫応答を誘導しうることが判明した。

TNF- α の粘膜アジュバント効果には、上皮細胞の透過性亢進が寄与すること、IL-18の粘膜アジュバント効果には肥満細胞が寄与することが示唆された。

今後の予定

IL-1ファミリーサイトカインおよびTNF, APRIL, TLI1Aについて、
粘膜免疫誘導機序の詳細や副作用の解析

機能性蛋白質創出システム、を駆使した粘膜アジュバントとして有用な高機能
化サイトカイン変体(高活性、高安定性)の作製

インフルエンザウイルスの感染阻害効果の検証

進捗により、DDS技術(M-cell抗体によるターゲティング)を適用

得られた成果から、インフルエンザ等に対する粘膜ワクチンの開発へ

成果発表等

- 論文発表 12件
- 学会発表 9件 (国際2件、国内5件)
- 特許出願 1件 「粘膜ワクチン用アジュバント」
- 受賞 4件 (研究協力者による)
- 日本免疫学会Melcher's Travel Award
- 国際TNF学会ANRF travel Award
- ほか

3 年目研究課題

平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：医療機関における感染症伝播に関する研究

課題番号：H19-新興一般-001

研究代表者：切替照雄（平成20年10月より変更）宮崎久義（平成20年9月まで）

I. 研究の意義

- (1) 院内感染はどんな医療施設でも起こりえる医療事故であり、院内感染対策の均霑化が必要
- (2) 中小病院における感染対策活動が把握出来ていない
- (3) 新型インフルエンザ流行期に医療現場が必要とするものが不明である
- (4) 最新の消毒と滅菌に関するガイドラインがない
- (5) 感染症伝播の原因となる医療行動や遵守率の向上に有効な制御法は確立されていない
- (6) 日本の医療施設における *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) の実態が不明、日本の医療施設で利用できる予防策の手順書の基準となるものがない

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 病院における感染対策活動及び改正感染症法に対する病院の対応の実態を解明
- (2) 中小施設でも実施可能な感染対策やサーベイランスの手順書の作成
- (3) 新型インフルエンザ流行期に医療現場が必要としている地域支援のあり方の提案
- (4) 『消毒と滅菌のガイドライン』に結核菌、新型インフルエンザウイルスなどの6項目を追加
- (5) ホームページを通じた新型インフルエンザ対策をはじめとする感染対策情報の発信
- (6) *Clostridium difficile* の流行株の同定、感染防止手順を作成
- (7) 感染管理活動に関する診療報酬見直しのための資料を作成
- (8) 感染症伝播の原因となる行動様式に基づいた感染症伝播防止対策の確立

III. 3年間の研究成果

・研究代表者（切替 照雄、宮崎 久義）

- (1) 感染制御認定看護師(ICN)の絶対数の不足、中小病院における感染対策担当者(ICD や ICN)の著しい不足している実態が明らかとなった
- (2) 様々な規模の医療機関による研究グループを組織し感染対策手順例を収集し手順集として編纂
- (3) 中小病院で分子疫学調査、感染対策に関する介入を実施
- (4) 新型インフルエンザ対策に関する医療現場での問題点及び改善点を纏めて厚労省に報告

・研究分担者（工藤 宏一郎）

- (1) 国立国際医療センターホームページ内に院内感染に関するホームページを開設・公開

・研究分担者（加藤 はる）

- (1) 医療施設における *Clostridium difficile* 感染症（CDI）の実態調査を実施
- (2) 高病原性 *C. difficile* 菌による症例を日本で初めて同定、同菌株による感染について医療施設での取組の徹底について、厚生労働省医政局指導課より事務連絡がなされた（平成19年4月）

- (3) 臨床現場で実用可能な CDI の診断・感染予防に関する手順作成

- ・研究分担者（中村 浩幸）

- (1) 医療行動の分析に基づいた手指衛生の遵守率向上を阻む要因の抽出と解決策の立案

- ・研究分担者（大久保 憲）

- (1) 器械の洗浄・滅菌、手指衛生、手術時手洗い、術野の消毒方法、環境消毒、消化器内視鏡の処理などについて、我が国の医療関連感染対策の実情を明らかにした（アンケート調査）

- (2) 「消毒と滅菌のガイドライン」に結核、新型インフルエンザ（鳥インフルエンザを含むノロウイルス、クロストリジウム・ディフィシル、クロイツフェルト・ヤコブ病プリオン、軟性内視鏡の洗浄と消毒の項目を追加

- (3) 滅菌の項目に低温滅菌法の中で、新たに国内販売承認を取得したホルムアルデヒドガス滅菌器、過酸化水素蒸気滅菌器についての項目を追加

- ・研究分担者（河野 文夫）

- (1) 全入院患者を対象とする包括的院内感染サーベイランスの有用性を検証

- ・研究分担者（西岡 みどり）

- (1) サーベイランス実施状況に関する全国調査を実施し報告書を作成
- (2) 日本の病院における感染対策活動に関する概算人件費を施設規模別に概算
- (3) 6種類の中小施設向けサーベイランス手順書案を作成し意見収集後に改訂

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 中小病院での実施可能な感染制御手順書の評価
- (2) 非耐熱性の医療器材の増加に対応できる洗浄剤および低温滅菌法の開発が必要
- (3) 手指衛生の遵守率向上・定着のための共通する問題点及び成功要因を分析し、解決策を立案
- (3) *C. difficile* 感染症に関する全国調査、情報発信、検査技術の向上が必要
- (4) 中小施設向けサーベイランスの実践の普及

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 中小病院における院内感染対策活動及び地域支援ネットワークのあり方を提案できる
- (2) 将来遭遇する可能性の高い鳥インフルエンザウイルスの消毒、滅菌の分野で貢献できる
- (3) 有効な感染症伝播防止策およびその定着化を推進するための方策の確立し普及する
- (4) 平成19年4月2日付け厚生労働省医政局指導課事務連絡（高病原性 *C. difficile* 菌による感染について医療施設での取組の徹底）の技術面での支援ができる
- (5) 中小病院におけるサーベイランス導入の方法を提示できる
- (6) 感染対策活動に関する診療報酬見直しへの資料を提出できる

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者(宮崎 久義、切替 照雄)

- (1) 切替照雄, 宮崎久義: 医療施設における感染症対策の実態、日本医事新報, 4440:85-88, 2009
- (2) 切替照雄ら編: 「感染制御手順 2010年版」の発行予定(2010年1月発行予定)
- (3) Kitao, T., Kirikae, T.: AAC(6')-Iaf, a novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 6:2327-2334. 2009
- (4) Sekiguchi, J., Morita, K., Kitao, T., Kirikae, T.: KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-β-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4194-4197, 2008
- (5) Sekiguchi, J., Asagi, T., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Outbreaks of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45: 979-989. 2007
- (5) Sekiguchi, J., Miyazaki, H., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. *J. Infect. Chemother.* 13:418-422, 2007

・研究分担者(加藤 はる)

- (1) Kato, H., Kato, H., Nakamura, M, Ueda, R.: Rapid analysis of *Clostridium difficile* strains recovered from hospitalized patients by using the *slpA* sequence typing. *J. Infect. Chemother.* 15: 199-202. 2009

・研究分担者(大久保 憲)

- (1) 大久保憲. 洗浄・消毒・滅菌に関する最新情報. INFECTION CONTROL 2007; 16(5): 424-427.
- (2) 大久保憲. 医療法の改正—院内感染対策について—. 感染と消毒 2007;14(2): 75-77.
- (3) 大久保憲. 在宅ケアで問題となる感染症の対策—5類感染症の感染対策—. 在宅ケアの感染対策と消毒 2007; 5(4): 38-39.
- (4) 大久保憲. CDC 隔離予防策ガイドライン. CARLISLE 2008; 12(4): 1-7.
- (5) 大久保憲. 改正医療法で徹底される院内感染防止. 月刊新医療 2008; 4: 119-121.
- (6) 大久保憲. プリオン病予防のための手術器械の新しい滅菌法. 整形・災害外科 2008; 51: 1591-1595.
- (7) 大久保憲. 医療現場の滅菌包装. 医療現場の滅菌. へるす出版 2008; 142-164.
- (8) 大久保憲. 医療施設における洗浄と消毒の実情. 感染と消毒 2008; 15(2): 82-90.
- (9) 大久保憲. 「手術医療の実践ガイドライン」にみる手術と感染制御. CARLISLE 2009; 14(1): 1-3

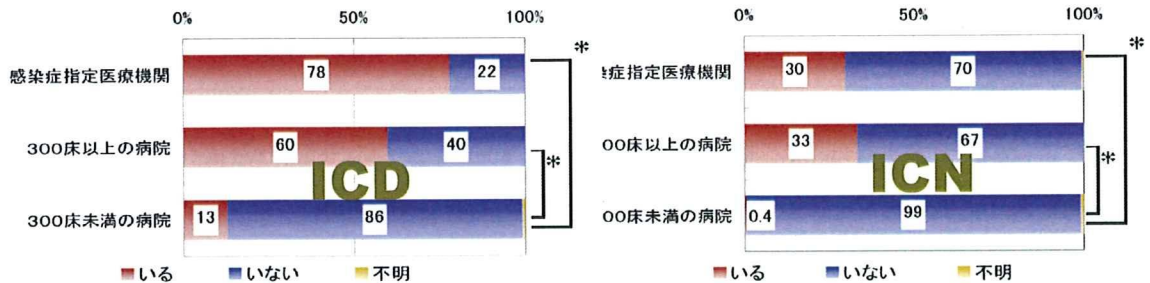
・研究分担者(西岡 みどり)

- (1) 西岡みどり, 森那美子, 坂木晴世, 藤田烈, 沼直美, 平松玉江, 森兼啓太: 施設規模・資源別サーベイランス実施状況調査報告書 2008年12月26日.
http://www.dcc.go.jp/nosocomial_infection/pdf/surveillance.pdf
- (2) 西岡みどり: 中小病院のサーベイランスはどうあるべきか. 感染と消毒 16(2):138-142, 2009
- (2) 西岡みどり, 森那美子, 坂木晴世, 藤田烈, 沼直美, 平松玉江, 森兼啓太: 中小規模の医療施設向けサーベイランス手順書(案) 2009年7月10日改訂4版. <http://www.ncn.ac.jp/img/survey-all.pdf>

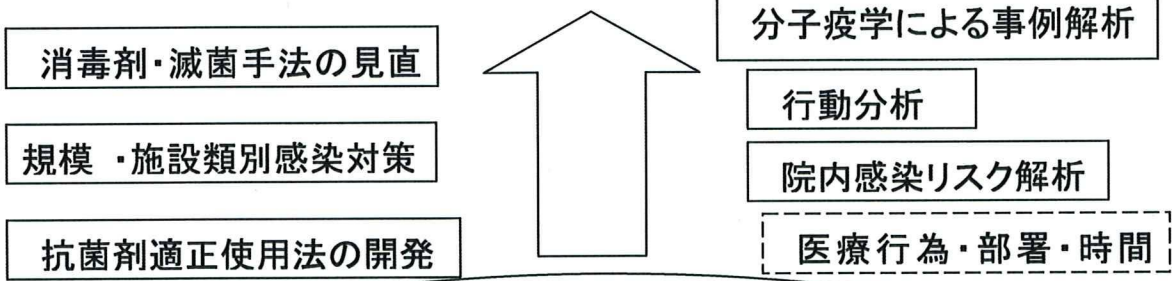
Ⅶ. 研究の概要図

医の安全の確保
院内感染対策の普及
院内感染リスクの低減

院内感染対策均霑化
中小病院での感染対策活動支援が必要



- (1) 様々な規模の医療機関で使用できる感染対策手順を作成
- (2) 中小病院における院内感染対策活動のあり方を提案
- (3) 新型インフルエンザ対策に関する医療現場の声を厚労省に報告
- (4) 改正感染症法に基づいた消毒と滅菌のガイドラインの改訂
- (5) 日本における *C. difficile* 感染症の実態の解明と対策
- (6) 中小病院で実施可能なサーベイランス手順の作成
- (7) 感染対策活動に関する概算人件費を施設規模別に概算



医療現場研究グループ
国立病院機構やナショナルセンターを中心とした全国
様々な規模の感染対策担当者

ボトムアップ型研究班を組織

院内感染はどんな医療施設でも起こりえる

ICD: インфекションコントロールドクター
ICN: インфекションコントロールナース

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 57 年 岩手医科大学医学部卒業
 昭和 57 年 岩手医科大学医学部大学院 (病理系、細菌学) 入学
 昭和 62 年 4 月 日本学術振興会特別研究員 (平成元年 3 月まで)
 平成元年 4 月 アレキサンダー・フォン・フンボルト財団奨学研究員 (ボルステル研究所、ドイツ)
 平成 3 年 9 月 カンザス大学医学部 博士研究員
 平成 4 年 10 月 自治医科大学微生物学教室助手、同講師
 平成 11 年 6 月 国立国際医療センター研究所部長、現在に至る。

・主な共同研究者 (又は指導を受けた研究者)

大学院では、岩手医大の川名林治教授に院内感染制御について指導を受ける。その後、新興・再興感染症 研究事業では「院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発等に関する研究 (平成 11-13 年度)」(主任研究者: 吉倉 廣) 及び「同 (平成 14-16 年度)」(主任研究者: 倉辻忠俊) の分担研究者として院内感染対策に関する研究を実施してきた。

・主な研究課題

(1) 院内感染対策に関する研究: 分子疫学と薬剤耐性機序に関する研究

(2) 薬剤耐性結核の疫学と耐性機序に関する研究

・これまでの研究実績 (2005 年以降の英文原著論文)

- 1) Ando, H., Mitarai, S., Kondo, Y., Suetake, T., Sekiguchi, J., Kato, S., Mori, T., Kirikae, T.: Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect.* 2009, Oct 14. [Epub ahead of print]
- 2) Kitao, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kirikae, T.: AAC(6')-Iaf, a novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 6:2327-2334. 2009.
- 3) Miyoshi-Akiyama, T., Zhao, J., Uchiyama, T., Yagi, J., Kirikae, T.: Positive correlation between low adhesion of group A *Streptococcus* to mammalian cells and virulence in a mouse model. *FEMS Microbiol Lett.* 293:107-114, 2009.
- 4) Patrick, M.S., Oda, H., Hayakawa, K., Sato, Y., Eshima, K., Kirikae, T., Iemura, S., Shirai, M., Abe, T., Natsume, T., Sasazuki, T., Suzuki, H.: Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 16345-16350. 2009.
- 5) Kirikae, T., Mizuguchi, Y., Arakawa, Y.: Investigation of isolation rates of *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance in medical facilities and clinical laboratories in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 612- 615. 2008.
- 6) Sekiguchi, J., Morita, K., Kitao, T., Watanabe, N., Okazaki, M., Miyoshi-Akiyama, T., Kanamori, M., Kirikae, T.: KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4194-4197, 2008.
- 7) Xu, H., Sullivan, T.J., Sekiguchi, J., Kirikae, T., Ojima, I., Stratton, C.F., Mao, W., Rock, F.L., Alley, M.R., Johnson, F., Walker, S.G., Tonge, P.J.: Mechanism and inhibition of saFabI, the enoyl reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 47: 4228-4236, 2008.
- 8) Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yasumoto, K., Kusumi, T., Okumura, K., Kirikae, T.: New Sulfoalkylresorcinol from Marine-derived Fungus, *Zygosporium* sp. KNC52. *J. Antibiotics* 61: 192-194, 2008.
- 9) Nishiyama, A., Wakasugi, N., Kirikae, T., Quy, T., Ha, le D., Ban, V.V., Long, H.T., Keicho, N., Sasazuki, T., Kuratsuji, T.: Risk factors for SARS infection within hospitals in Hanoi, Vietnam. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 388-390, 2008.
- 10) Hatakeyama, S., Matsuoka, Y., Ueshiba, H., Komatsu, N., Itoh, K., Shichijo, S., Kanai, T., Fukushi, M., Ishida, I., Kirikae, T., Sasazuki, T., Miyoshi-Akiyama, T.: Dissection and identification of regions required to form pseudoparticles by the interaction between the nucleocapsid (N) and membrane (M) proteins of SARS coronavirus. *Virology* 380: 99-108, 2008.
- 11) Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watarai, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, M., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Outbreaks of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45: 979-989. 2007.
- 12) Sekiguchi, J., Miyoshi-Akiyama, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Kirikae, F., Toyota, E., Kobayashi, I., Morita, K., Kudo, K., Kato, S., Kuratsuji, T., Mori, T., Kirikae, T.: Detection of multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 45: 179-192, 2007.
- 13) Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukada, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., Okuno, T., Tamura, T., Kirikae, T.