

地域医療の問題解決に向けた保険薬局の実践的研究

北里大学大学院 薬学研究科

DP-10501 玉城 武範

目次

序論	1
第1章 保険薬局の医療従事者を対象とした手指衛生の実施状況と手指衛生による手荒れに関する検討	
目的	2
方法	3
結果	5
考察	6
第2章 保険薬局での妊婦の処方に対する薬剤師の疑義照会に関する検討	
目的	8
方法	8
結果	9
考察	11
第3章 宿主細胞を標的としたアムプロキシソールの抗インフルエンザウイルス効果に関する検討	
目的	13
方法	14
結果	17
考察	18
総括	21
謝辞	23
引用文献	24

序論

地域における健康支援拠点として期待される保険薬局において、薬剤師の担う役割は多い。地域に特異的な医療問題に対応するために、それぞれの地域にある保険薬局が大きな責任と役割を担っている。地域における医療問題の解決には、それぞれの地域で大きく異なる特異的な背景に応じた解決が求められる。例えば、インフルエンザウイルス感染症は冬の時期に流行し、夏に収束するのが一般的である。しかし、亜熱帯地域に属する沖縄県では、インフルエンザウイルス感染症が通年的に流行し全国の流行のピークをこえる人口当たりの患者数がたびたび観測されている。インフルエンザウイルス感染症は全国どの地域の保険薬局でも対応が求められるが、通年にわたってインフルエンザウイルスにさらされる機会の多い地域における保険薬局とその薬剤師は、保健衛生の観点からその地域に特異的な医療問題の解決が重要な課題といえる。今回、地域に特異的な医療問題の解決に向けた保険薬局が果たす役割の一例として、沖縄県に特異的なインフルエンザウイルス感染症の発生に基づく問題解決に向けた保険薬局の実践的研究を実施した。

保険薬局において医療従事者を介したインフルエンザウイルス感染症の感染拡大は重要な課題である。服薬指導中に患者と至近距離で向き合う保険薬局では、薬剤師自身の感染リスクだけでなく薬剤師を介した患者への感染リスクも高く、感染防止対策の基本である手指衛生を遵守しなければならない。先ず、保険薬局の医療従事者を対象とした手指衛生の実施状況と手指衛生による手荒れに関して検討した。次に、インフルエンザウイルス感染症のハイリスク患者としてだけではなく薬物治療にも特段注意が必要とされる、妊婦に対する薬物治療の安全性向上を推進するため、保険薬局での妊婦の処方に対する薬剤師の疑義照会に関して検討した。

最後に、地域の中でインフルエンザウイルス感染症に対し予防的な役割を果たす可能性を模索するため、ウイルスの標的となる宿主細胞への直接的な効果が期待されるアンブロキソール塩酸塩（以下、アンブロキソール）の抗インフルエンザウイルス効果に関して検討した。

本研究の目的は、沖縄県に特徴的なインフルエンザウイルス感染症の発生動向を踏まえて、地域医療の問題解決に向けた保険薬局における研究成果を臨床で実践することにある。

第1章

保険薬局の医療従事者を対象とした手指衛生の実施状況と手指衛生による手荒れに関する検討

【目的】

インフルエンザウイルス感染症の患者と通年的に濃厚に接触する機会が多い保険薬局の医療従事者は、感染予防の観点から対応が求められる。特に医療従事者を介した病原体の伝播を防ぐための手指衛生は非常に重要である。通常インフルエンザウイルスは飛沫として鼻腔・口腔・咽頭などの粘膜に直接接触することで感染を引き起こすが、飛沫核としても手指の表面などで感染性を短時間保持するため間接的な接触感染も同時に問題となる。そこでマスクの着用に加え手指衛生を行うことは、飛沫感染と接触感染の二つの経路を絶つことに對し有効である²⁾。保険薬局の医療従事者は、その職業上の性質からさまざまな感染症に罹患した患者に携わり曝露を受けるリスクが高い。医療従事者がそれら感染症に罹患することで自身が感染源となり、他の患者へ病原体を伝播させることで、感染症の集団発生の大きな危険因子となる可能性がある。それ故、保険薬局においても積極的に感染対策に取り組むことが重要である³⁾。

医療関連感染（Healthcare-Associated Infection）は医療従事者の関与が主な原因とされ、病原体の伝播防止策の中でも、手指衛生による呼吸器感染症に対する予防効果について明確な効果が数多く示されている⁴⁾。しかし、手指衛生に用いる消毒剤に関して近年では手荒れ防止に関する製剤的工夫が施された製剤が普及しているものの、病院の医療従事者を対象に手指の過敏な医療従事者の手荒れの問題がこれまでに報告されている⁵⁾。一方、保険薬局の医療従事者を対象とした手指衛生の状況と手荒れに関する検討を詳細に行った報告は見当たらない。本研究は、インフルエンザウイルス感染症の患者と濃厚に接触する機会が多く、頻繁な手洗いが必要となる沖縄県の保険薬局で手指衛生を実践する上で、手指衛生による手荒れの実態とその対策について検討することを目的とした。

【方法】

1. 対象：沖縄県下の研究協力が得られた保険薬局に勤務する医療従事者で、試験に関して同意が得られた 28 名（薬剤師 9 名、登録販売者および事務 19 名）を対象とした。なお、対象者に対し説明をし、同意を得て試験を実施した。
2. 試験期間：2014 年 9 月～10 月の期間に試験を実施した。
3. 調査及び試験内容

i) 現在の手指衛生の状況調査

試験開始前に、日常の業務における手指衛生の回数と手荒れの状況を調査した。

ii) 手洗い試験における手指衛生の回数および手荒れ調査

試験期間中の対象試験品毎の手指衛生の 1 時間当たりの回数および実施場面を記録した。

回数は、1 日の手指消毒の総回数を勤務時間あたりで除して求めた。実施場面はその都度記録し、後に集計した。また試験終了当日の皮膚状態を、アンケートを用いて調査した。

ii-① 試験品および使用方法

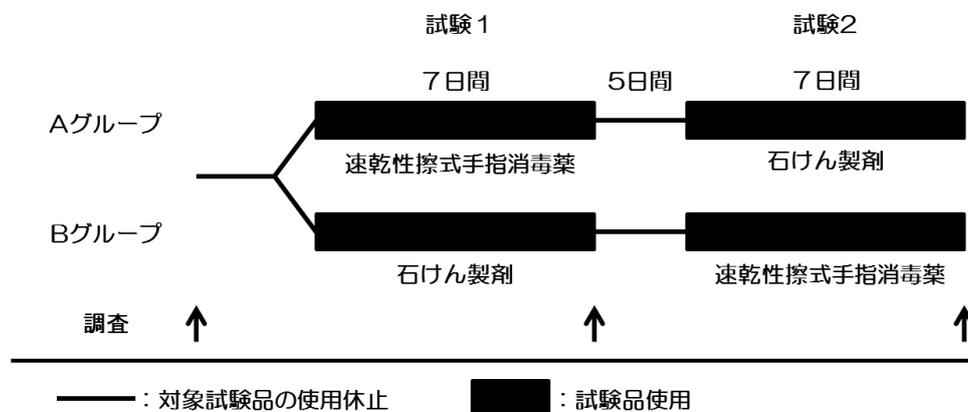


Fig. 1 調査方法の概要

試験品（速乾性擦式手指消毒薬[ウエルパス手指消毒液 0.2%, 丸石製薬(株)]もしくは石けん製剤[手洗い石鹼バブルガード, シャボン玉石けん(株)]）を 7 日間連続（勤務が休みの日も含む）使用し、休止期間を経たのち、他方の試験品を 7 日間使用した（Fig. 1）。休止期間は、角質層の損傷回復に 5～6 日要することが報告されている事を参考にして 5 日間と設定した⁶⁾。各対象試験品を使用する順序は、試験実施前に研究実施者により薬局毎に A グループと B グループに割り付けた。

ii-② 評価方法

アンケートによる主観的評価の項目を Fig. 2 に示した。皮膚状態（乾燥，硬化，亀裂，紋消失，紅斑，痒み）の程度を被験者本人がアンケート用紙に直接記入した。それぞれの評価項目は、久家らの方法⁷⁾に準じ、「0：なし」、「1：わずかに認める」、「2：明らかに認める」、「3：強く認める」の4段階で自己評価し、対応するスコアで点数化した。

Q1. 現在手荒れがありますか？
<input type="checkbox"/> 特に手荒れはない
<input type="checkbox"/> 少し手が荒れている
<input type="checkbox"/> ひどく手が荒れている
Q2. 現在の手の状態についてお答え下さい
① 乾燥（カサカサ感）：手の表面が白く粉をふくなどの症状の程度についてお答え下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める
① 手肌の硬化：手の皮膚が硬くなるような症状についてお答え下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める
① 亀裂：両手の亀裂の程度をお書き下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める
① 紋消失：指紋やキメが消失する程度についてお答え下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める
⑤ 紅斑：手のかぶれや炎症などによる赤みの程度についてお答え下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める
⑥ 痒み：手の痒みの症状のある程度についてお答え下さい
<input type="checkbox"/> なし
<input type="checkbox"/> わずかに認める
<input type="checkbox"/> 明らかに認める
<input type="checkbox"/> 強くその症状を認める

Fig. 2 皮膚状態に関するアンケート調査の評価項目(主観的評価)

4. 解析

両試験品の使用回数の比較では、Wilcoxon's signed rank test で検定した。また皮膚状態に関するアンケート調査については、Steel 's test で多重比較を行った。いずれも両側検定とし、危険率5%以下の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. 解析対象

試験品による手指衛生を最後まで遂行できた 18 名（A グループ 7 名、B グループ 11 名）を解析対象とした。10 名の脱落理由は、強い乾燥出現による試験中止が 1 例、嗜好（臭い）による試験中止が 8 例、アンケート回答無効が 1 例であった。

2. 手指衛生の状況

試験開始前および試験中の手指衛生の実施状況を Table 1 に示す。手指消毒または手洗いの頻度は、試験開始前の速乾性擦式手指消毒薬が

試験品	頻度	
	試験開始前	試験期間中
速乾性擦式手指消毒薬	1.55回/時間	1.32回/時間
石けん製剤	1.50回/時間	1.04回/時間

1.55 回/時間、石けん製剤が 1.50 回/時間、試験期間中は速乾性擦式手指消毒薬が 1.32 回/時間、石けん製剤が 1.04 回/時間であり、それぞれの試験品間に差は認めなかった。手指衛生の実施場面は、感染症が懸念される患者に対応した後が最も多かった。

3. 皮膚状態の主観的評価

各試験品使用後の皮膚状態に関する調査結果を Fig. 3 に示す。速乾性擦式手指消毒薬の試験終了時の乾燥スコア (1.33 ± 0.1) は、試験開始前の乾燥スコア (0.56 ± 0.2) に比べ有意に高値を示したが、石けん製剤の乾燥スコア (0.56 ± 0.1) は試験開始

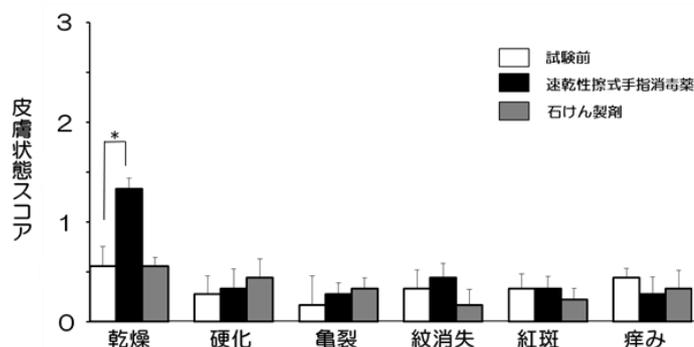


Fig. 3 速乾性擦式手指消毒薬および石けん製剤の使用による皮膚の状態

* $p < 0.05$ (Steel test)

前と比べ変化を認めなかった。その他の評価項目のスコアに有意差は認めなかった。

【考察】

手指衛生を継続するにあたって、手荒れに対する対策を講じなければならない。手荒れは、手指衛生の効果を低下させ継続を中断させる主な要因とされる⁸⁾。CDC（Centers for Disease Control and Prevention：米国疾病管理予防センター）の「医療現場における手指衛生のためのガイドライン」では、アルコールベースの速乾性擦式手指消毒薬を基本とした手指衛生を主に推奨している⁶⁾。しかし、これまでの病院の医療従事者を対象とした報告には、アルコールベースの速乾性手指消毒薬を用いた頻繁な手洗いが手荒れの一要因としているものもある⁹⁾。アルコールベースの速乾性手指消毒薬は簡便性と高い消毒効果を兼ね揃えているものの、手荒れなどの理由により手指衛生の遵守率が低い場合、臨床現場における病原体伝播の防止効果が十分に得られない^{7,10)}。一方、これまでに保険薬局の医療従事者における手指衛生の状況と手荒れに関する検討を詳細に行った報告はほとんど見当たらない。

今回、石けん製剤を用いて手指衛生を行った医療従事者は、アルコールベースの速乾性手指消毒薬を用いた時と比べ手指の乾燥を感じるものが少なかった。手指の乾燥は、アルコールベースの速乾性手指消毒薬を継続使用することにより、手荒れへと発展することが報告されている¹¹⁾。また、手荒れ原因の一つにアルコールベースの速乾性手指消毒薬を用いた頻繁な手洗いが指摘されている¹²⁾。アルコールベースの速乾性手指消毒薬は手荒れに関して種々の改良が加えられているものの、過敏な医療従事者にとっては他の製剤で代替できる環境が望まれる¹³⁾。頻繁な手洗いが必要とされる地域において、保険薬局の医療従事者で手指の乾燥が問題となる場合は、石けん製剤での代替による手指衛生の遂行が有用であることが示唆された。

英国の医療関連感染防止のためのガイドラインでは、石けんと流水による手洗いが適宜必要であることも勧告している¹⁴⁾。本研究で用いた手洗い石鹼バブルガードはインフルエンザウイルス H1N1 に対する抗ウイルス効果が報告されている¹⁵⁾。適切な石けんと流水による手洗いは手指衛生として有効であり、臨床現場の状況に合わせて速乾性擦式手指消毒薬または石けん製剤を選択し手指衛生を継続することは重要である。

保険薬局の感染対策に関する調査では、調査対象とした保険薬局の 88%が薬局内で実施可能な感

染対策を懸念していたことが報告されている¹⁶⁾。手指衛生は保険薬局内でも実施可能な感染対策の一つではあるが、本検討における試験期間中の手指消毒や手洗いの頻度（速乾性擦式手指消毒薬が1.32回/時間、石けん製剤が1.04回/時間）は、病院における医療従事者を対象とした使用頻度の報告例（速乾性擦式手指消毒薬が1.84回/時間、石けん製剤が1.68回/時間）¹⁷⁾と比べ大きな差はなく、手指衛生を実施する場面も適正に認識していた。これらのことから、今回調査を行った協力薬局での懸念された感染対策は適切に実施されていたと考えられる。本研究において示唆された内容を研究の協力薬局以外の沖縄県内の保険薬局にもフィードバックし、すべての薬局において石けん製剤を適宜使用するよう情報提供した。

本研究は、インフルエンザウイルス感染症の人口当たりの患者数が全国に比べ多い沖縄県で、その環境にある保険薬局の医療従事者の保健衛生の向上に寄与する事を強調したい。

第2章

保険薬局での妊婦の処方に対する薬剤師の疑義照会に関する検討

【目的】

インフルエンザウイルス感染症に対してハイリスク患者である妊婦への対応には、迅速な治療開始かつ慎重な薬物治療が求められる。加えて、インフルエンザウイルス感染症が引き金となる二次的な感染症に対しても薬物治療を受ける可能性がある。その為、通年的にインフルエンザウイルス感染症にさらされる沖縄県の保険薬局では、妊婦に対する処方薬剤の安全性確認には一層注意を要すると考えられる。妊娠中に処方頻度が高い薬効別薬剤の調査¹⁸⁾では、抗菌薬の処方が上位に報告されていることから、妊婦に対しても一般の患者同様に、感染症やかぜ症状に対する薬剤が処方される可能性を常に考えなければならない。妊婦への薬物療法は、患者本人への有効性・安全性を評価するだけでなく、母体に投与した薬物が胎児へ移行するため、その影響についても考慮が必要である。保険薬局の薬剤師は処方薬剤の母体および胎児に対する安全性の確認および、患者が不安なく服薬出来るような個別の服薬指導が求められる。今回、重点的な対応が必須である妊婦に対する服薬指導の実態を明らかにし、より薬物治療の安全性向上を推進する目的でアンケート調査を実施した。

【方法】

1. 調査対象施設と対象者

沖縄県を含む九州山口地区で無作為に抽出した保険薬局 427 施設の薬剤師（1 施設 1 名）を対象とした。

2. 調査内容と調査期間

アンケート調査内容を Fig. 4 に示す。設問内容は、1) 薬剤師の妊婦への対応の実態（処方医に妊娠中であることを告げていない妊婦を対応した経験の有無など）および、2) 薬剤師による安全性確認の実践内容（妊婦への処方薬剤に関して疑義照会した経験の有無とその後の結果など）とした。調査は 2012 年 3 月 27 日～7 月 6 日の期間で実施した。

『薬剤師』アンケート

- Q. 薬剤師経験年数を選択してください
1年未満 1～3年未満 3～10年未満 10年以上
- Q. 妊娠が可能な年齢の女性に『妊婦に禁忌』薬剤が処方された場合、患者が妊娠していないことを確認していますか？
はい いいえ 処方された経験がない
- Q. 現在、妊婦に服薬指導する機会がありますか？ はいの場合、患者数を選択してください。
はい → 1名以下/月 2-10名/月 11-30名/月
31-100名/月 101名以上/月
いいえ
- Q. 妊婦に服薬指導する時、医師に妊娠を伝えているか確認していますか？
はい いいえ
- Q. 妊婦が医師に妊娠していることを伝えていなかった経験はありますか？
はい いいえ
- Q. 妊婦に処方された薬剤の胎児への影響や安全性を確認していますか？
必ず確認している 医師に妊娠を伝えている場合、確認していない
確認していない その他（ ）
- Q. 妊婦に、添付文書で『妊婦に禁忌』と記載のある薬剤が処方された経験はありますか？
はい（薬剤名： ）（ ）（ ） いいえ
- Q. 妊婦への処方薬剤について疑義照会した経験はありますか？ はいの場合、疑義照会した「薬剤名」と「その後の経過」を選択してください。
はい（薬剤名： ）
→ 中止 継続 他薬剤に変更（薬剤名： ）
（薬剤名： ）
→ 中止 継続 他薬剤に変更（薬剤名： ）
（薬剤名： ）
→ 中止 継続 他薬剤に変更（薬剤名： ）
いいえ
- ご協力ありがとうございました

Fig.4 アンケート調査内容

【結果】

1. アンケート回収率、経験年数、1か月間に服薬指導する妊婦数

アンケート回収率は52%（224/427枚）であり、その中で妊婦に対して服薬指導経験を有する薬剤師166名を解析対象とした。薬剤師経験年数が3年以上である薬剤師は99%（165名）であった。1か月間に服薬指導を行う妊婦数は、1名以下が53%（88名）、2名以上10名以下が34%（56名）、11名以上が13%（21名）、無回答1%（1名）であった。

2. 保険薬局における妊婦への対応と安全性確認

1) 薬剤師の妊婦への対応の実態

処方薬剤に関して、胎児への影響や安全性を必ず確認している薬剤師は81%（135名）であったが、妊婦が処方医に妊娠を伝えている場合は確認していない薬剤師が14%（23名）存在した（Fig. 5）。また妊婦への服薬指導時に、処方医に妊娠していることを伝えているか確認している薬剤師は96%（159名）であり、その中で50%（79名）の薬剤師は妊婦が処方医に妊娠を伝えていない経験があった。禁忌薬剤が処方された経験がある薬剤師は33%（54件）であった（Fig. 6）。

2) 薬剤師による安全性確認の実践内容

妊婦への処方薬剤に対する疑義照会はのべ109件あり、処方薬の変更または中止に至った症例は78件（変更39件・中止39件）あり、禁忌薬のキノロン系経口抗菌製剤や非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAIDs）が多かった（Fig. 7）。

薬のキノロン系経口抗菌製剤や非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAIDs）が多かった（Fig. 7）。

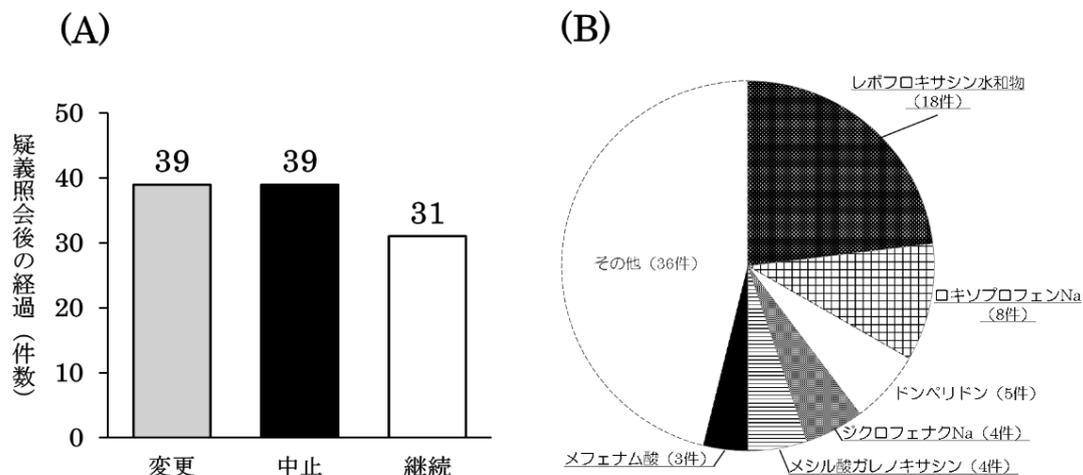


Fig. 7 妊婦への処方薬剤に関して薬剤師が行った安全性確認の実践内容 (A) 疑義照会後の経過（変更、中止、継続）の件数（109件）、(B) 変更または中止となった薬剤（78件）

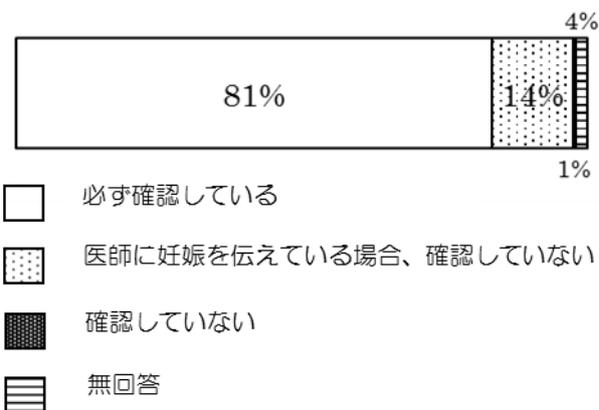


Fig. 5 処方薬の胎児に対する安全性確認（n=166）

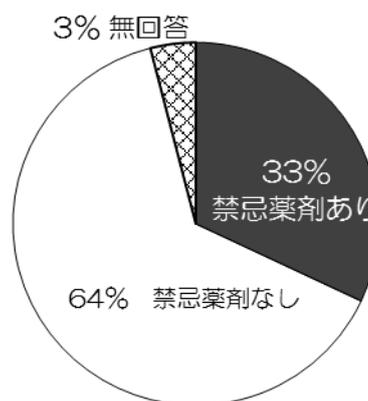


Fig. 6 妊婦に対する禁忌薬剤を処方中に経験した薬剤師の割合（n=166）

【考察】

厚生労働省の事業である妊娠と薬情報センターは、妊娠時の薬の使用に関する相談窓口として、妊娠を希望する女性や妊娠中の女性を対象に支援している。その窓口の一つである「妊娠と薬外来」が、沖縄県内の病院に事業の協力施設として 2013 年に設置された。そうした背景の中、九州山口薬学会より、沖縄県の薬剤師による妊婦に対する処方薬剤の安全性確認に関する研究に対して助成を得た¹⁹⁾。

今回の調査では、妊婦自身から処方医に妊娠を伝えていないことを確認できた薬剤師は 79 名 (50%) であり、来局した妊婦が処方医に妊娠を伝えていない実態が浮き彫りとなった。薬剤師が処方内容を評価して行った疑義照会の半数以上 (78/109 件) が、変更または中止となった。50%の薬剤師は妊婦が医師に妊娠を伝えていなかった経験があった結果を踏まえると、処方医が妊娠を知らずに薬剤を処方した可能性も考えられる。変更または中止となった処方内容は、キノロン系経口抗菌剤や非ステロイド系消炎鎮痛剤 (NSAIDs) など、妊婦に対する禁忌薬剤が主であった。キノロン系の薬剤は、Ingham が動物実験において関節に対する毒性を報告²⁰⁾して以来、多くの研究がされてきたものの、妊婦への投与は胎児に対する安全性の面から、本邦においてはその多くが禁忌薬として指定されている。一方、動物に対する研究において催奇形性が確認されなかった報告や²¹⁾、薬剤を使用した妊婦に関する前向き調査で、自然の奇形発生率を上回ることはなかったとする報告などもある²²⁾。しかし、添付文書上は妊婦に禁忌の薬剤であり、医師が妊娠を把握したうえでの処方であっても、疑義照会による禁忌薬の回避は必須である。病院の薬剤師による疑義照会を検討した中川らは、薬剤師が処方内容を評価し、疑義照会で処方設計と提案を実施することで、禁忌、副作用、用量超過、重複等の危険が回避できた事例が増加したことを報告している²³⁾。今回、継続となった処方 31 件の内容は、妊娠時期による薬物使用の判断が必要であった症例や、代替できる同効薬が存在する症例、処方医の判断により投薬を必要とした症例であった。本調査結果は、保険薬局の薬剤師による妊婦に対する処方薬剤の安全性確認の重要性を示すものと考えられる。

保険薬局において薬剤師が妊娠の有無を直接患者に確認し疑義照会を行うことは、インフルエンザウイルス感染症に広くさらされる地域においては、妊婦に対する禁忌薬剤の中でも、二次感染症

に処方される可能性の高い抗菌薬の処方を未然に防ぐことに寄与する可能性があることが示された。本研究が沖縄県の保険薬局における妊婦に対する薬物治療の安全性向上の一助となるよう、研究成果を沖縄県薬剤師会に所属する会員薬局へ周知した。

第3章

宿主細胞を標的としたアムブロキシソールの抗インフルエンザウイルス効果に関する検討

【目的】

沖縄県では、全国のインフルエンザウイルス感染症の流行時期以外にも、たびたび流行の兆しが観測されている¹⁾ (Fig. 8)。度重なる流行は地域住民に大きな健康被害を及ぼす。それ故沖縄県においては、保健衛生の観点の一つとして通年的に地域住民に対するインフルエンザウイルス感染症の予防が期待される。

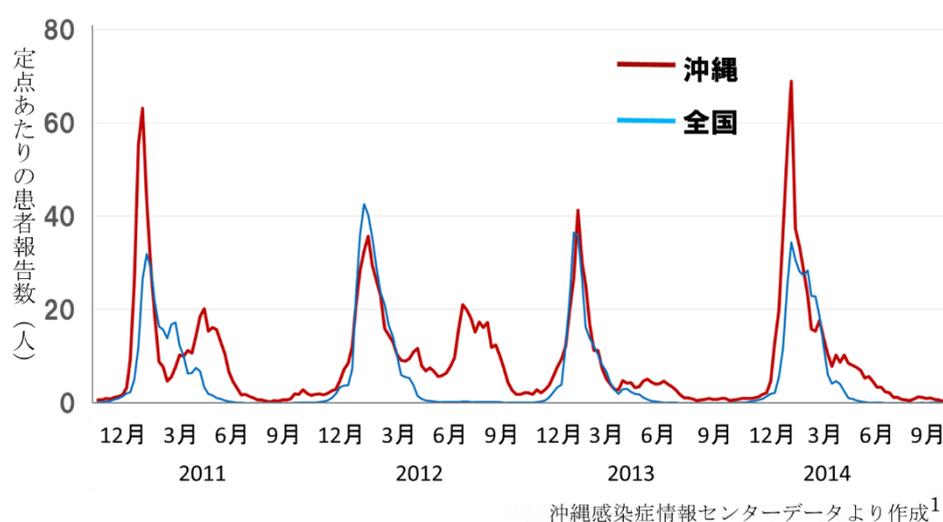


Fig. 8 沖縄県に特徴的なインフルエンザ発生動向

地域住民のかぜ症状に対しては、保険薬局での一般用医薬品がセルフメディケーションとしての役割を担うことも多い。近年この一般用医薬品に含まれる去痰薬成分に、喀痰の排出にかかわる作用以外の付加的効果が種々報告されている^{24, 25)}。特に医療用医薬品や一般用医薬品で繁用されているアムブロキシソールには、インフルエンザ感染モデルマウスへの腹腔内投与において、生体由来の感染防御タンパク質である肺サーファクタント蛋白質の分泌を気道領域において増加させ²⁶⁾、ウイルスが感染する際に必要なウイルス表面のヘマグルチニンの活性化を抑制することで、抗インフルエンザウイルス効果を示すことを報告している²⁷⁾。しかし、アムブロキシソールが宿主細胞へのインフルエンザウイルスの感染においても直接、抗インフルエンザ効果を有するかは不明である。一方、アムブロキシソール

ールと同様の去痰薬である L-カルボシステインは、宿主細胞としてヒト気道上皮細胞を用いた検討において、細胞上のインフルエンザウイルスレセプター発現の減少を誘導することで抗インフルエンザウイルス効果を示す可能性が報告されている²⁸⁾。しかし、アムブロキシソールにおいて L-カルボシステインと同様の機序の抗インフルエンザウイルス効果や、その作用の強弱については検討されていない。インフルエンザウイルスの感染の程度を軽減できる可能性を検討することは、臨床的にはインフルエンザウイルス感染症のみならず、本ウイルス感染に続発する細菌感染による肺炎の予防的観点から非常に意義あるものと考えられた。そこで今回、宿主細胞へのインフルエンザウイルスの感染に対するアムブロキシソールの影響を Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞（イヌ腎臓尿細管上皮細胞株）を用いて検討した。

【方法】

1) 使用インフルエンザウイルス株

American Type Culture Collection (ATCC) から購入した *Influenza A virus* (A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)) を使用した。H1N1 ウイルスを発育鶏卵の漿尿膜腔内に接種し、ふ卵器で培養後、尿膜腔液を採取し、密度勾配遠心法で精製後ウイルス液として使用した。ウイルス価は、MDCK 細胞が 50%感染する希釈の逆数値で表記し、 10^9 TCID₅₀/mL であった。

2) 細胞及び試験品

MDCK 細胞 (RIKEN CELL BANK より購入、継代歴約 40 代までの細胞を使用) を用いた。L-カルボシステイン (以下、カルボシステイン) は杏林製薬株式会社より無償で提供された。アムブロキシソール塩酸塩 (以下、アムブロキシソール) は東京化成工業株式会社、オセルタミビルリン酸塩 (以下、オセルタミビル) は中外製薬株式会社から各々購入した。また、カルボシステインは Eagle's Minimum Essential Media (MEM) 、アムブロキシソールは Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 、オセルタミビルは DMSO に溶解した後 MEM で希釈し、MEM で 1mM になるように希釈して用いた。10%FBS を含む DMEM 培地に懸濁した MDCK 細胞 (2.0×10^4 cells/mL) を 37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。

3) ニワトリ赤血球

ニワトリ赤血球は株式会社日本バイオテスト研究所より購入した。保存液中のニワトリ赤血球を各試験前に生理食塩水にて 1500rpm、10 分間遠心洗浄する操作を 3 回繰り返し、沈殿物をニワトリ赤血球とした。試験では 0.2% FBS を添加した PBS で 1 (v/v) %に調製して用いた。

4) 試験項目

① 細胞毒性試験

試験品の溶解液が供試ウイルスを感染させる細胞に対して細胞毒性を示す場合、抗ウイルス活性のスクリーニングが困難になるため、H1N1 ウイルスの感染に用いる MDCK 細胞に対する試験品の影響を調べた。試験品濃度は 1000~1.6 μ M とした。

MDCK 細胞を 96 ウェル培養プレートで単層培養とした後、培養上清を除去して所定濃度の試験品を含有する 0.42%ウシ血清アルブミン (BSA: Bovine Serum Albumin, SIGMA-Aldrich)、2 μ g/mL トリプシンを添加した MEM (以下、0.42%BSA 添加 MEM と記載) を 1 ウェルあたり 0.1mL 加え、5% CO₂-95% Air 雰囲気下 72 時間培養した。試験品の細胞毒性は MTT 法により判定した。培養後、各 well に MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, SIGMA-Aldrich) 溶液 (MTT を 5mg/mL の濃度で含有する PBS) を 10 μ L を加え、37°C で 3 時間培養した。次いで、20%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS: sodium dodecyl sulfate, WAKO) を含有した 0.1N HCl を 1well あたり 100 μ L 加え、37°C に一晚 (~24 時間) 静置した後、570nm の吸光度を測定した。リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS : Phosphate buffered saline) (pH 7.2, 131mM NaCl, 14mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄ 及び 2.7mM KCl) で細胞を処理した well を生細胞率 100%として、各試験品を添加した well の吸光度から、各試験品の細胞毒性を求めた。

② 赤血球凝集を指標とした抗ウイルス効果検討試験 (HA 価測定) (試験品後処理によるウイルス増殖の抑制効果: Fig. 9-A)

インフルエンザウイルス感染後の、MDCK 細胞に対する各試験品の影響を明確にする目的で、赤血球凝集を指標として抗インフルエンザウイルス効果を検討した。MDCK 細胞を 24well 培養プレートで単層培養とした後、培養上清を除去し、各 well に PBS 1.0mL を加え洗浄した。次いで、約 100

TCID₅₀/mL に調製したウイルス液 0.1mL を各 well に接種し、37°C で 1 時間培養することにより細胞に *Influenza A virus* (H1N1) を感染させた後、ウイルス液を除去した。各 well を PBS 1.0mL で洗浄した後、各濃度の試験品を含有する 0.42%BSA 添加 MEM を 1well あたり 1.0mL 加え、37°C で 72 時間培養を行った。培養後の培養上清液のウイルス価 (HA 価) をニワトリ赤血球による赤血球凝集反応を指標に判定した。HA 価の測定は AAAl-Jabiri et al. (1996) の方法²⁹⁾に準じ実施した。すなわち、96well の U 字型マイクロウェルプレートを用い、培養上清 50μL を 0.2% FBS 添加した pH6.6 のペロナール緩衝生理食塩水 (希釈液) 50μL で 2 倍段階希釈 (2 系列) を行った。次に 0.2% FBS を添加した PBS で 1% に調製したニワトリ赤血球液 50μL を添加し、室温で 1 時間静置後、赤血球凝集反応を確認した。完全な赤血球凝集作用 (HA) を引き起こすウイルスの最大希釈率を HA 価とし、コントロールの値に比べ 4 倍以上希釈倍率が低下した場合を抑制効果ありと判定した。

③ ウイルス感染価の測定 (アンブロキソール前処理によるウイルス感染価の抑制効果: Fig. 9-B)

インフルエンザウイルスが MDCK 細胞に感染する過程に対し、各試験品が影響を与えるかどうかを明確にするために、ウイルス感染価を指標として抗インフルエンザウイルス効果を検討した。MDCK 細胞に予め各濃度の試験品を含有する 0.42%BSA 添加 MEM を 1well あたり 1.0mL 加え、37°C で 72 時間培養を行った。各 well を PBS 1.0mL で洗浄した後、約 100 TCID₅₀/mL に調製したウイルス液 0.1mL を各 well に接種し、37°C で 1 時間培養することにより細胞に *Influenza A virus* (H1N1) を感染させ、その後ウイルス液の除去とウェルの洗浄を行った。ウイルス感染後から 72 時間培養を行い、顕微鏡下でインフルエンザウイルスによる細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) を確認し、培養上清液中のウイルス感染価 (TCID₅₀/mL) を 24 時間おきに Reed-Muench 法により測定した³⁰⁾。陽性対象にオセルタミビル (0.01mg/mL) を用いた。

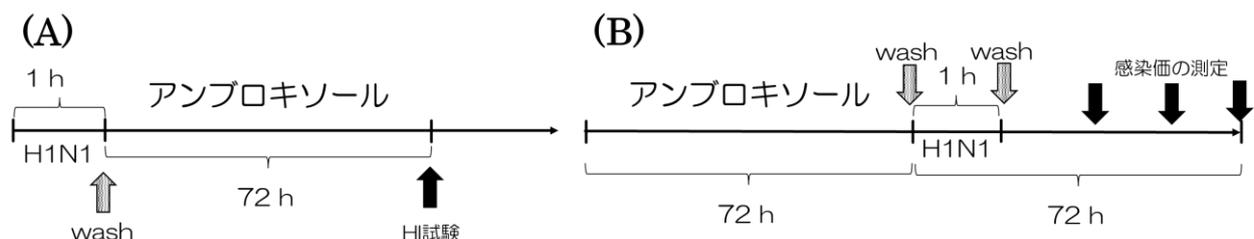


Fig. 9 アンブロキソールによる抗ウイルス作用の確認試験
 (A) アンブロキソール後処理 (B) アンブロキソール前処理

5) 統計

結果は一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) および post hoc Tukey multiple comparison tests の多重比較検定を行い、危険率 5%以下の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1) 試験品の細胞毒性

試験品の MDCK 細胞に対する細胞毒性は PBS を添加して培養した場合を生細胞率 100%として、生細胞率が 50%以下のとき「細胞毒性あり」と判定した。細胞毒性を示した試験品濃度はアンブロキソール塩酸塩の 1000 μ M (生細胞率 34.5 \pm 0.5%) であり、その他の濃度では細胞毒性を示さなかった (データ未掲載)。この結果より、試験品の MDCK 細胞に対する妥当な濃度を確認した。

2) 抗ウイルス効果検討試験 (HA 価測定)

Hirst が報告した A 型インフルエンザウイルスによるニワトリ赤血球凝集作用は、インフルエンザウイルスの分離や定量・精製などに用いられる³¹⁾。赤血球凝集作用は、H1N1 表面のヘマグルチニンが赤血球のシアル酸含有複合糖質糖鎖を含むレセプターと結合する反応であり、培養上清中に放出された H1N1 の亜型ウイルス量を反映している。抗ウイルス効果検討試験の典型的な 1 例では、インフルエンザウイルスを感染させ試験品を加えなかった場合の培養上清中のウイルス量は HA 価で 32 倍であり、L-カルボシステイン及びアンブロキソール (1.6 – 250 μ M) で処理した際の HA 価と差は認められなかった (Fig. 10)。

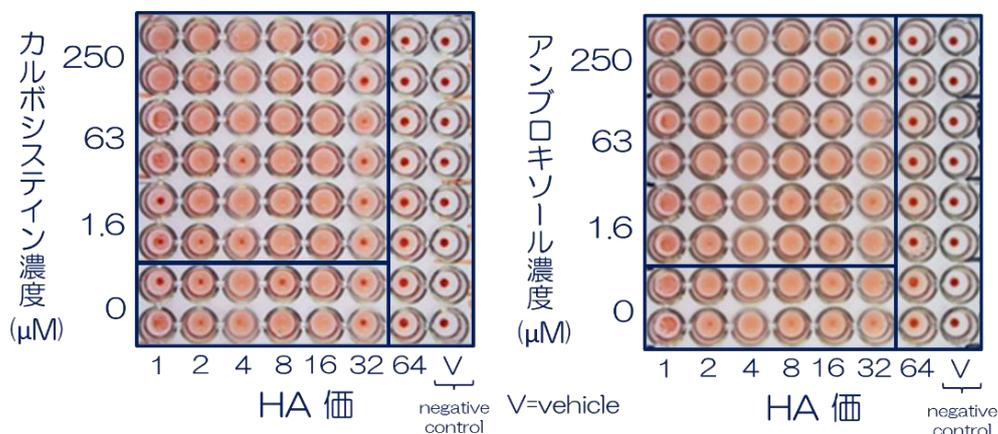


Fig. 10 アンブロキソール塩酸塩とL-カルボシステインの抗ウイルス効果検討試験

3) ウイルス感染価の測定

MDCK 細胞を予めアンブロキシール (125 μM) で処理すると、*Influenza A virus* (H1N1) 感染後 24 時間までに遊離されたウイルスの感染価は、コントロールに比べて有意に抑制され (7.5 \pm 1.3%, $p = 0.003$)、48~72 時間後も抑制傾向が示された (26.5 \pm 23.3%, $p > 0.1$)。一方、L-カルボシステイン (250 μM) は、24 時間後においてウイルス感染価を抑制する傾向が見られたものの、有意差は示さなかった (51.8 \pm 25.4%, $p > 0.1$) (Fig. 11)。陽性対象としたオセルタミビル (0.01mg/mL) は感染後 24 時間までに有意にウイルス感染価を抑制した (1.0 \pm 0.6%, $p = 0.002$)。

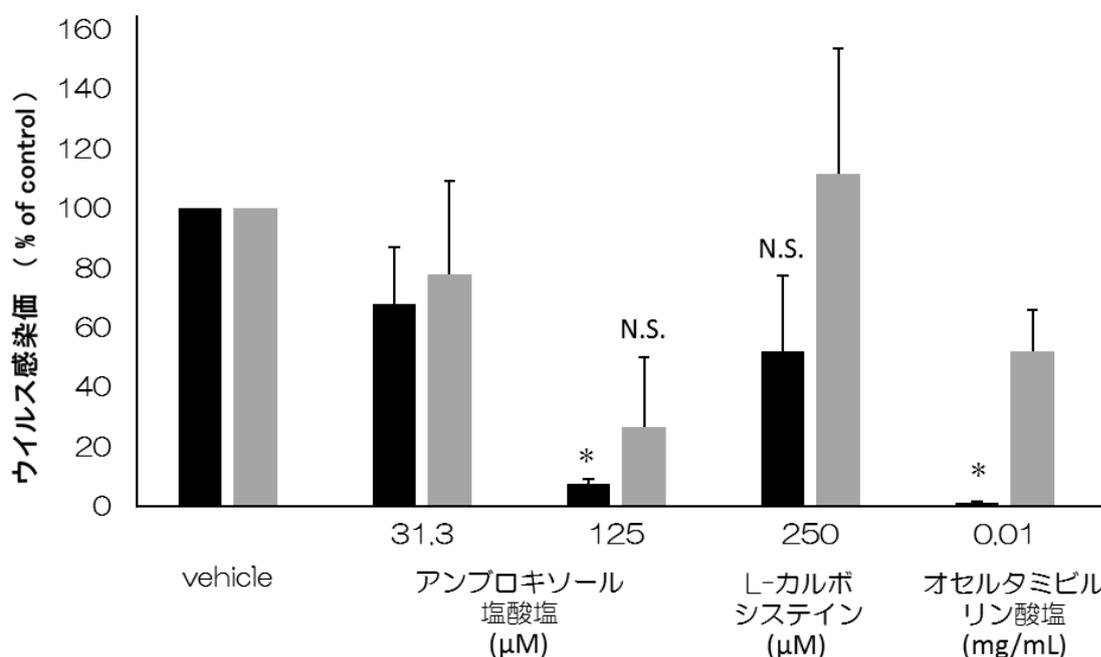


Fig. 11 各試験品で前処理を行ったMDCK細胞におけるH1N1感染後24時間(■), 48~72時間(■)に遊離されたウイルス感染価, mean \pm S.E.M. (n=3), N.S.=not significant, * $p < 0.01$ vs. vehicle-treated group, Tukey's test

【考察】

木戸らはマウスを用いた *in vivo* の実験系において、インフルエンザウイルス感染後のアンブロキシール投与により、内因性プロテアーゼ阻害物質や肺サーファクタント、IgA、IgG などの分泌が誘導され、インフルエンザウイルスの増殖が抑制されたことを報告し、アンブロキシールが宿主の先天性免疫機構や液性免疫機構を介して抗ウイルス作用を発現すると考察している²⁷⁾。しかしながら、これまでにアンブロキシールが直接宿主細胞に作用し、インフルエンザウイルスの増殖を抑制するかについての検討は行われていない。そこで本研究では、宿主細胞として MDCK 細胞を用い、*in vitro* の

実験系においてアンブロキシソールの抗インフルエンザウイルス効果を検討するとともに、これまで直接宿主への作用が報告されている L-カルボシステインの作用との比較も行った。

MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させる前に、予めアンブロキシソール (125 μ M) で処理すると、ウイルス感染時にアンブロキシソールが存在しなくてもウイルス増殖は 24 時間までは有意に抑制されたが、アンブロキシソールをウイルス感染後に処理するとウイルス増殖は抑制されなかった。この結果より、アンブロキシソールの抗インフルエンザ作用は、MDCK 細胞に対するものであることが予想された。MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの感染過程へのアンブルキシソールの直接の阻害作用のメカニズムとしては、アンブロキシソールによる MDCK 細胞表面に発現するウイルス受容体となるシアル酸含有複合糖質糖鎖の発現変化や MDCK 細胞で発現される内因性の抗ウイルス物質などが関与する可能性が想定される。これまでに木戸らは、*in vivo* での検討においてウイルス感染後のマウスにアンブロキシソールを投与後、肺サーファクタントの分泌の誘導が 24 時間以内で有意に増加し、濃度依存的に抗インフルエンザウイルス効果を示したことを報告している²⁷⁾。生体内において肺サーファクタント蛋白質は主に肺胞 II 型上皮細胞から分泌されるが、ヒトの遠位尿細管上皮においても肺サーファクタント蛋白質の SP-D の産生が報告されている³²⁾。今回用いた MDCK 細胞はイヌ腎臓尿細管上皮細胞株であることから MDCK 細胞も SP-D を産生する可能性が考えられ、本研究で観察されたアンブロキシソールによる MDCK 細胞へのインフルエンザウイルス感染の抑制作用の発現に、アンブロキシソールによる SP-D の発現増強が関与している可能性が考えられた。一方、L-カルボシステインはヒト気道上皮細胞を用いた *in vitro* での検討において抗インフルエンザウイルス効果を有することが報告されているが²⁸⁾、本研究では、MDCK 細胞へのインフルエンザウイルス感染モデルを用い、アンブロキシソールと L-カルボシステインの抗ウイルス作用の比較を行い、L-カルボシステインが 500 μ M の濃度においても 250 μ M の濃度と同様に抑制効果を示さないことを明らかにした (データ未掲載)。以上のことからアンブロキシソールと L-カルボシステインは異なるメカニズムで抗ウイルス作用を発現している可能性が考えられる。今後は、アンブロキシソールによる MDCK 細胞における SP-D などの肺サーファクタント蛋白質の発現変化の観点から検討を行い、L-カルボシステインとの作用と比較解析する必要があると考えられる。

ヒトのインフルエンザウイルスに対する感染防御は主に抗原特異的な抗体やエフェクターリンパ球を誘導することで行われている。その為、毎年認められるウイルスの抗原性の変異は、生体防御における抗原特異的免疫応答の効率性を低下させ、インフルエンザウイルス感染症が毎年流行する原因の一つとされている³³⁾。社会的に罹患頻度が高いかぜ症候群は、インフルエンザウイルスが原因の一つとされ、二次性の細菌感染がしばしば問題となる事もある³⁴⁾。通年的にインフルエンザウイルス感染症にさらされる機会が多い地域においては、度重なる流行は地域住民に大きな健康被害を及ぼすことから、感染の予防に重点を置く意義は大きく、薬剤耐性ウイルスの誘導を招かない機序を有するアムブロキソールのような薬剤の予防的使用法を提示することは極めて重要であると考えられる。今回、アムブロキソールが、宿主細胞における感染防御機構において抗インフルエンザウイルス効果を有する可能性が示された。本研究は、通年的にインフルエンザウイルス感染症にさらされる機会が多い地域住民に対して、感染予防としての臨床応用の実現に向け寄与するものとする。

総括

本研究では、沖縄県に特異的なインフルエンザウイルス感染症の発生動向に対する、二、三の医療問題の解決に向けた保険薬局の取り組みを例に、地域の保険薬局が担う役割について検討した。

第1章では、通年にわたってインフルエンザウイルス感染症にさらされる機会が全国に比べ相対的に多い沖縄県で、その環境にある保険薬局の医療従事者の保健衛生に関して取り上げた。保険薬局での病原体の伝播を防ぐ観点から、薬剤師および医療従事者による手指消毒または手洗いは適正な認識で実施されていたものの、手荒れが起きる医療従事者もいた。手指衛生ガイドラインを実践するうえで、石けん製剤の使用が手指の乾燥が問題となる医療従事者の手荒れを回避することに有用であることが示された。

第2章では、インフルエンザウイルス感染症に罹患することがハイリスクとなり、さらには薬物治療においても慎重な対応が求められる、いわゆるインフルエンザウイルス感染症にかかわる弱者といえる妊婦に対する保険薬局の対応を取り上げた。

今回の調査では、妊婦が処方医に妊娠を伝えている場合に処方薬の胎児に対する安全性確認を行っていない薬剤師が少なからず存在した。多くの薬剤師が妊婦に禁忌薬剤が処方された経験があり、さらに半数の薬剤師は妊婦が処方医に妊娠を伝えていなかった経験があった。通年にわたってインフルエンザウイルスにさらされる機会の多い地域において、医療機関におけるインフルエンザ感染症を含む感染症に対する禁忌薬物の投与を未然に防ぐためにも、保険薬局において薬剤師が妊娠の有無を直接患者に確認し疑義照会を行うことは必須であることが示された。

第3章では、通年にわたってインフルエンザウイルスにさらされる機会の多い地域において、アムプロキシールに、これまでに報告されている抗インフルエンザウイルス効果の機序とは異なる、宿主細胞の感染防御機構における抗インフルエンザウイルス効果を検討した。今回、アムプロキシールが、宿主細胞における感染防御機構において抗インフルエンザウイルス効果を有する可能性が示された。宿主細胞における抗インフルエンザウイルス効果が期待できる可能性を見出したことは、通年にわたってインフルエンザウイルスにさらされる機会の多い地域住民に対して、感染予防

としての臨床応用の実現に向け寄与することが期待できるものと考えられた。

それぞれの医療問題の解決に向けた保険薬局の取り組みを通して、インフルエンザウイルス感染症の発生動向が、全国と比べ沖縄県は特異的であることを地域住民に広く啓蒙する事も、地域における健康支援拠点として期待される保険薬局の重要な役割であると考ええる。

本研究はそれぞれの地域にある医療問題を解決するために、地域の保険薬局とその薬剤師が介入した一つの実践的研究の成果である。成果に基づき保険薬局の薬剤師が臨床で実践することで、地域の医療問題の解決に少なからず寄与できるモデルを提示でき、保険薬局が地域の医療問題に対して取り組む際には、地域によって異なる背景に応じた解決が重要であることが新たに示された。

謝辞

本研究および本論文をまとめるにあたり、多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター臨床薬学（保険薬局学）の吉山友二教授に深謝いたします。また、本論文のご指導のみならず、貴重なご助言を賜りました北里大学薬学部の厚田幸一郎教授、松原肇教授および北里大学北里生命科学研究所の清原寛章教授に心より感謝と敬意を申し上げます。

北里大学薬学部臨床薬学研究・教育センター臨床薬学（保険薬局学）の有海秀人講師、川上美好講師、および宮崎智子助教におかれましては、研究のご指導及びご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

さらに、研究活動に際し専門的立場からご助言いただきました、一般財団法人北里環境科学センターの野島康弘先生に心よりお礼申し上げます。

最後に、研究にご協力いただきました多くの薬剤師の先生方および薬局職員の皆様方に心から感謝いたします。

引用文献

1. 沖縄県感染症情報センター, <http://www.idsc-okinawa.jp/index.html>. (Accessed December 22, 2014)
2. Kramer A, Schwebke I, Kampf G, How Long do Nosocomial Pathogens Persist on Inanimate Surfaces? A systematic review, *BMC Infect Dis*, 2006, **6**, 130.
3. 大久保耕嗣, 保険薬局における感染対策の取り組み, 職員への手洗い実習とその評価; 環境感染, 2012, **27**, 113-118.
4. Jefferson T, Del Mar CB, Dooley L, Ferroni E, Al-Ansary LA, Bawazeer GA, van Driel ML, Nair S, Jones MA, Thorning S, Conly JM, Physical Interventions to Interrupt or Reduce the Spread of Respiratory Viruses, *Cochrane database Syst Rev*, 2011, **6**, 1-160.
5. 綱本千幸, 中谷智加子, 岩世真紀, CDC ガイドラインに基づく手指衛生の改善, *Infection Control*, 2004, **13**, 167-175.
6. Boyce JM, Pittet D, Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force, *MMWR Recomm Rep*, 2002, 1-45.
7. 久家智子, 高森スミ, 辻明良, 手指消毒剤による手荒れとその対策, *感染症*, 1992, **22**, 231-236.
8. Larson EL, Hughes CA, Pyrek JD, Sparks SM, Cagatay EU, Bartkus JM, Changes in Bacterial Flora Associated with Skin Damage on Hands of Health Care Personnel, *Am J Infect Control*. 1998, **26**, 513-521.
9. 白石正, 丘龍祥, 仲川義人, 長岡栄子, 石澤俊幸, 近藤慈夫, 宗正敏, 湯川進, 中村幹彦, 田村成, 日置祐一, 内科病棟および集中治療室における手洗い実態調査, *Infection Control*, 2000, **9**, 632-637.
10. 遠藤博久, 小林寛伊, 大久保憲, 手指衛生, アルコール擦式消毒薬の効果について, *医療関連感染*. 2008, **1**, 30-34.
11. 李宗子, 八幡真理子, 三根真, 山本将司, 小松香子, 吉田葉子, 吉田弘之, 荒川創一, ノンエンベロープウイルスに対する効果が改善されたアルコール手指消毒剤の手肌への影響, *日本環境感染学会誌*, 2014, **29**, 164-171.

12. 高森スミ, 手指消毒剤による手荒れと除菌効果の検討, 日本環境感染学会誌, 1992, **7**, 27-32.
13. 尾家重治, 神谷晃, 新しい湿潤剤を配合した速乾性手指消毒薬の抗菌効果ならびに保湿効果, 日本環境感染学会誌, 2009, **24**, 260-263.
14. Pratt RJ, Pellowe CM, Wilson JA, Loveday HP, Harper PJ, Jones SR, McDougall C, Wilcox M-H, epic2: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England, *J Hosp Infect*, 2007, **65**, Suppl 1, S1-S64.
15. 感染症対策研究センター, http://www.kansen-center.com/research_data/index.html. (Accessed December **22**, 2014)
16. 寺沢匡史, 吉村真弓, 上地隆史, 森本一平, 院外薬局における感染対策に関する意識調査, 日本環境感染学会誌, 2010, **25**, 167-171.
17. Boyce JM, Kelliher S, Vallande N, Skin Irritation and Dryness Associated with Two Hand-Hygiene Regimens: Soap-and-Water Hand Washing Versus Hand Antisepsis with an Alcoholic Hand Gel, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2000, **21**, 442-448.
18. “虎の門病院「妊娠と薬相談外来」の取り組み”, 第1回妊婦の服薬情報等の収集に関する検討会, 資料6, 東京都, 2005-01-18, 厚生労働省医薬食品局, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/01/s0118-6.html>. (Accessed December 22, 2014)
19. 山田智史, 伊差川サヤカ, 比嘉綾子, 玉城武範, 潮平英郎, 橋本孝夫, 外間惟夫, 植田真一郎, 九州山口地区における妊婦薬物療法のアンケート調査, 九州薬学会会報, 2014, **68**, 53-57.
20. Ingham B, Brentnall DW, Dale EA, McFadzean JA. Arthropathy Induced by Antibacterial Fused N-alkyl-4-pyridone-3-carboxylic Acids. *Toxicol. Lett*, 1977, **1**, 21-26.
21. Yefet E, Salim R, Chazan B, Akel H, Romano S, Nachum Z, The Safety of Quinolones in Pregnancy, *Obstet Gynecol Surv*, 2014, **69**, 681-94.
22. Schaefer C, Amour-Elefant E, Vial T, Ornoy A, Grabis H, Robert E, RodriguezPinilla E, Pexieder T, Prapas N, Merlob P, Pregnancy Outcome After Prenatal Quinolone Exposure, Evaluation of Case Registry of the European Network of Teratology Information Services(ENTIS), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996, **69**, 83-89.
23. 中川義浩, 鶴崎泰史, 浦本邦弘, 小園亜希, 花田聖典, 畑田万紀子, 山部美千子, 水町純一, 竹内小百合, 病棟薬剤業務による疑義照会件数と優良事例件数の増加, 日本病院薬剤師会雑誌, 2014, **50**, 71-74.

24. Yoshida M, Nakayama K, Yasuda H, Kubo H, Kuwano K, Arai H, Yamaya M, Carbocysteine Inhibits Oxidant-Induced Apoptosis in Cultured Human Airway Epithelial Cells, *Respirology*, 2009, **14**, 1027-1034.
25. Li F, Yu J, Yang H, Wan Z, Bai D, Effects of Ambroxol on Alginate of Mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, *Curr Microbiol*, 2008, **57**, 1-7.
26. Kido H, Sakai K, Kishino Y, Tashiro M, Pulmonary Surfactant is a Potential Endogenous Inhibitor of Proteolytic Activation of Sendai Virus and Influenza A Virus, *FEBS Lett*, 1993, **322**, 115-119.
27. Yang B, Yao DF, Ohuchi M, Ide M, Yano M, Okumura Y, Kido H, Ambroxol Suppresses Influenza-Virus Proliferation in the Mouse Airway by Increasing Antiviral Factor Levels, *Eur Respir J*, 2002, **19**, 952-958.
28. Yamaya M, Nishimura H, Shinya K, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Yoshida M, Asada M, Fujino N, Suzuki T, Deng X, Kubo H, Nagatomi R, Inhibitory Effects of Carbocysteine on Type A Seasonal Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelial Cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, **299**, L160-L168.
29. Al-Jabri AA, Wigg MD, Oxford JS, Initial in Vitro Screening of Drug Candidates for Their Potential Antiviral Activities. In *Virology Methods Manual*, Edited by Mahy BWJ, Kangro HO, London, Academic Press, 1996, 293-307.
30. Reed LJ, Muench H, A Simple Method for Estimating Fifty Percent Endpoints, *Am J Epidemiol*. 1938, **27**, 493-497.
31. Hirst GK, The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science*, 1941, **94**, 22-23.
32. 眞野訓, 大井洋之, 玉野まり子, 池上真知子, Whitsett Jeffrey A., 富野康日己, 腎における肺サーファクタント蛋白 D の局在, *順天堂医学*, 2006, **52**, 84-93.
33. Hampson AW, Mackenzie JS, The Influenza Viruses, *Med J Aust*, 2006, **185**, S39-S43.
34. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS, Predominant Role of Bacterial Pneumonia As a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness, *J Infect Dis*, 2008, **198**, 962-970.