

鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法の確立

分担研究者：影山 努国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター室長

研究協力者：高山郁代国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター研究員

研究要旨

A 型インフルエンザウイルスの亜型同定を迅速かつ確実にを行うため、シーケンス反応を利用して、1 日以内に HA 亜型および NA 亜型を同定できる方法を確立した。また、本方法を用いてあらたに分離された鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定を行ったところ、従来法よりも短時間かつ正確に亜型の同定を行う事が可能であった。本方法により、未知のインフルエンザウイルスに対しても、迅速に亜型同定を行う事が可能となり、ウイルス遺伝子の性状解析のみならず、わが国のインフルエンザウイルス株サーベイランスやパンデミック発生初期における診断にも役立ち、また、未知のインフルエンザウイルスに対する診断系を迅速に構築する上で必要な遺伝子配列情報をすぐに提供することができる強力なツールにもなり、わが国の感染症対策にも大きく貢献できると考えられた。

A. 研究目的

A 型インフルエンザウイルスの HA と NA には、その抗原性の違いにより少なくとも HA は、H1 から H16 までの亜型が、NA は N1 から N9 までの亜型が存在する。A 型インフルエンザウイルスはヒト以外にも、ブタ、馬、ミンク、アザラシ、鯨、コウモリなどのほ乳動物や鳥類に分布し、特に水禽類からはこれら全ての亜型が見つかっており、A 型インフルエンザウイルスの自然宿主と考えられている。

一方、ヒトに対しては、H1N1、H3N2 亜型の季節性インフルエンザウイルス以外に、H5N1 亜型を始め、H7N1、H7N3、H9N2 亜型等の鳥インフルエンザウイルスや H1N2 亜型等のブタインフルエンザウイルスの感染が世界各地で散発的に起きており、これ

らのウイルスを起源とする新型インフルエンザウイルスの出現およびパンデミックの発生が危惧されている。

仮にパンデミックが発生した場合、その直後は、新型インフルエンザウイルスの診断系が構築できていない可能性もあり、日常的に季節性インフルエンザウイルスの診断系を整備し、除外診断を行うことが可能な体制を整えておく事が重要である。また、新型インフルエンザウイルスが出現した際は、診断系を迅速に構築し、その診断系の検証と全国の検疫所および地方衛生研究所で診断検査を行うために必要な陽性コントロールの作製を速やかに行う事が重要であり、その事前準備として動物インフルエンザウイルス株の収集および迅速な亜型同定法が必要である。

A 型インフルエンザウイルスの亜型同定について、従来は HA の亜型は赤血球凝集抑制(HI)試験法、NA の亜型はノイラミニダーゼ反応抑制(NI)試験法により決定されてきた。それ以外に核酸同定法(RT-PCR 法やシーケンス法)による亜型同定も行われてきた。本研究では、季節性インフルエンザウイルス以外の場合に、まず確実に除外診断ができるように、季節性インフルエンザウイルスの型・亜型診断系を整備するとともに、亜型不明の動物インフルエンザウイルスに対して、迅速かつ確実に亜型同定を行う事を目的に、シーケンス法を用いて 1 日以内に亜型同定を行う事が可能な遺伝子解析法を確立した。

B. 研究方法

1. 鳥由来 A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法の構築

ウイルスRNAからのcDNA作製は、Uni12プライマーを利用し、SuperScript III逆転写酵素(Invitrogen)を用いた逆転写反応により行った。HA遺伝子ならびにNA遺伝子全長の増幅に使用するPCRプライマーについては、より確実に遺伝子増幅が行えるように、既存の配列 (E. Hoffmannら Arch Virol 146: 2275-89, 2001) の改変を試みた。遺伝子増幅反応は反応中により変異が入りにくい Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES)を用いた。

HA および NA 亜型の同定に必要なシーケンスプライマーは、全亜型の鳥由来分離株について、それぞれ最新のものから 10～350 株程度の HA 遺伝子および NA 遺伝子配列のアライメントを作成し、亜型間で比較的保存されている領域を見出だし、その領域内に遺伝子配列の解読に必要なシーケンスプライマーを設計した。

2. 構築した系を用いた亜型同定

当研究所のインフルエンザウイルスライブラリーに保管してあるインフルエンザウイルスを用いて、本亜型同定法の検証を行った。また、2012 年 11 月と 12 月に福岡県で新たに鳥から分離された計 5 株の A 型インフルエンザウイルスについて、本方法を用いた遺伝子解析および Blast 検索による亜型同定を迅速に行えるかどうかの評価を行った。

3. リアルタイム RT-PCR 法を用いた季節性インフルエンザウイルスの型・亜型同定法について

以前に構築したリアルタイム RT-PCR 法を用いた季節性インフルエンザウイルスの型・亜型同定法で用いるプライマーおよびプローブの塩基配列について(配列はインフルエンザ診断マニュアル(第 2 版)(国立感染症研究所)を参照)は、最近の流行株と塩基配列の相同性について検索し、検出系に問題があるかどうか確認を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. PCR プライマーおよびシーケンスプライマーの設計

HA 遺伝子全長増幅用には、全亜型に共通の PCR プライマーを 1 組、NA 遺伝子全長増幅用には、N1、N2、N4、N5、N8 亜型共通の PCR プライマー 1 組に加え、N3 用、N6 用、N7 用、N9 用の計 5 組の PCR プライマーを既存配列より改変し、以下のプライマー配列を新たに設計して各遺伝子増幅に使用した。

5+HA-1 : CAGGGAGCAAAAGCAGGGG、
11+NS-890R : CGTCTCGTATTAGTAGAAA
CAAGGGTGT TTT (HA 遺伝子用)、7+NA-1:
CTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT、

12+NA-1413R : TGGTCTCGTATTAGTAGA
AACAAAGGAGTTTTTT (N1、N2、N4、N5、
N8 用)、5+N3-1 : CAGGGAGCAAAGCAG
GTGC、11+N3-1420R : CGTCTCGTATTAGT
AGAAACAAGGTGCTTTTT (N3 用)、
N6-1 : AGCAAAGCAGGGTGAAAATG、
11+NS-890R : CGTCTCGTATTAGTAGAAA
CAAGGGTGTTTT (N6 用)、N7-1 : AGCAA
AAGCAGGGTGATTGAGAATG、
11+NS-890R (N7 用)、5+N9-1 : CAGGGAG
CAAAGCAGGGTC、12+N9-1473R : TCGT
CTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTCT (N9
用)

NA 遺伝子については、上記 5 組のプライ
マーによる PCR 産物のうち増幅が見られた
ものをシーケンス反応でのテンプレート
とする事とした。

シーケンス用プライマーは、HA 遺伝子
に対しては、各亜型 1 つ以上のプライマー
が反応するように以下の 10 種類を設計し、
シーケンス反応に用いた。NA 遺伝子に対
しては、全亜型間で共通の以下の 1 種類を
設計し、シーケンス反応に用いた。

(HA 遺伝子用) AHA-548F : GGRGKGAGC
KCTGCATGCM、AHA-652F : AASACYTAC
ARCAAYAC、AHA7-680F : CCAGCTYTKA
TAATWTGGGG、AHA-695F : TGGGGWR
TKCACCATCCT、AHA9-695F : GTGGGGY
ATAMAYCAYCC、AHA-701F : GTGCAYC
ACCCTYC RAC、AHA-1242R : CCGTACCA
ACCATYWAYCA、AHA7-1242R : CCRAC
CAYCCRTCAATYA、AHA9-1242R : CCRT
ACCARCCWGCRAHYTA、AHA-1480R : GAT
STATGGWCATAYAATGC、(NA 遺伝子用)
ANA943R-1 : CCIKCCARTTRTCYCTRCA

シーケンス反応には、上記のシーケ
ンスプライマー以外にも PCR プライマーを
使用し、AMpure XP (Beckman Coulter) に
より精製した PCR 産物をテンプレートに用
いて、定法によりシーケンス反応および

シーケンス反応産物の精製を行い、
Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer を用
いてシーケンス解析を行った。

2. 亜型の同定

インフルエンザウイルスライブラリーに
保管してあるインフルエンザウイルスを用
いて、本方法により HA および NA の各亜
型同定が行える事を確認した。また、新た
に鳥から分離された計 5 株の亜型不明の A
型インフルエンザウイルスについて、本方
法を用いた亜型同定を試みた。HA 遺伝子お
よび NA 遺伝子全長を増幅させるための
PCR 反応を行った結果、NA 遺伝子につい
ては、全ての株で N1、N2、N4、N5、N8
亜型共通の PCR プライマーで増幅が見られ
た。HA および NA の PCR 増幅産物をテン
プレートとしたシーケンス反応において
は、HA 遺伝子については、各株 2-4 種類
のプライマーが、NA 遺伝子については、全
ての株で 3 種類のプライマーが反応した。
得られた配列を元に Blast 解析を行い、一
両日以内に、2 株は H4NI 亜型、3 株は H1N1
亜型と同定する事ができた。

D.E. 考察ならびに結論

本研究で確立したシーケンス解析による
亜型同定法により、A 型インフルエンザ
ウイルスの亜型同定は 1 日以内で確実に
行うことが可能となった。従来から行って
きた HI および NI 試験法では、ウイルスの抗
原変異の影響を受け、非特異反応や反応性
低下などにより、亜型を正しく同定する事
ができない事もあった。また、コンベン
ショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR
法を用いた亜型同定法は、インフルエンザ
ウイルスのように非常に多くの亜型がある
上、同一亜型内でも多様性がある遺伝子配
列をターゲットとする場合は、亜型別の検
出系の維持ならびに同一亜型を幅広く検出

できる検査系を構築する事は難しい。また、インフルエンザウイルスは、遺伝子変異の頻度が高く、検査系の更新を頻繁に行わなければならない、RT-PCR 法による全亜型を対象とした亜型同定を行う事は難しいと考えられる。

一方、本研究のシーケンス法を用いた亜型同定法においては、HA および NA 遺伝子全長の増幅に用いる PCR プライマーは、全ての A 型インフルエンザウイルスの全遺伝子で共通に保存されている 5' および 3' 末端の塩基配列をターゲットとしているため、抗原変異に伴う遺伝子変異の影響を受けず、PCR プライマーの配列を更新する必要がほとんどない。また、シーケンスプライマーも相同性の高い領域に、PCR 産物に対して特異的に反応するように設計しており、また使用するプライマー数も最小限にとどめたため、従来よりも少ない反応数でシーケンス解析を行う事ができるようになり、より確実かつ短時間に A 型インフルエンザウイルスの亜型同定を行う事が可能になった。また、本方法では、亜型同定と同時に、HA 遺伝子の開裂部位の配列も解析するので、H5 亜型および H7 亜型ウイルスについては、高病原性鳥インフルエンザウイルスであるかどうかの判定も行うことが可能である。

本方法は、わが国のインフルエンザウイルス株サーベイランスやパンデミック発生初期における診断に役立つばかりでなく、未知のインフルエンザウイルスに対する診断系を迅速に構築する上で必要な遺伝子配列情報をすぐに提供する事ができる強力なツールであり、わが国の感染症対策にも大きく貢献する技術と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi,

Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Japanese Journal of Infectious Diseases 65(1):19-27, 2012.

2) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. Journal of Virological Methods 188(1-2):73-75, 2013.

3) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. Archives of Virology. (in press)

4) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版) 国立感

染 症 研 究 所 2012,
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf

- 5) 今井正樹、高下恵美、岸田典子、藤崎誠一郎、徐紅、中内美名、高山郁代、松井清彦、影山 努、小田切孝人、押部智宏、小淵正次、加瀬哲男、川上千春、高橋雅輝、平良勝也、安井善宏、皆川洋子、調恒明.インフルエンザ診断マニュアル(第2版) 国立感染症研究所 2012,
http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf

2. 学会発表

国内会議

- 1) 影山 努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第33回研究会. 2012年6月
- 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いたDirect RT-LAMP法によるインフルエンザ診断の臨床的検討.第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
- 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈したA/H3 亜型、B型インフルエンザウイルス重複感染の2例. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012年10月
- 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いたDirect RT-LAMP法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月
- 5) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代

真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いたDirect RT-LAMP法によるインフルエンザ診断法の開発. 第59回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

鳥型からヒト型への変異に関する分子基盤とその監視技術の開発

研究分担者 鈴木康夫 中部大学 教授

研究要旨 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合性獲得変異を高価な機器、複雑な操作無しで、迅速にかなり高感度(4HAU-128HAU)に検出するデバイス(キット)を開発した。また、新規な阻害機構を持つ、新たな、インフルエンザウイルス NA 阻害分子(2-deoxy-2,3 didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid)を合成、活性を明らかにした。これらの技術、新規分子は、高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び緊急対応に適用出来るものであり、展開が期待される。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒトへの伝播は、鳥ウイルスのヒト型レセプターへの結合性変異が第一義的に重要であるが、それを簡便に監視する技術は開発されていない。さらに、ウイルスの変異を克服した次世代の抗インフルエンザ薬も開発されていない。そこで、本研究では、(1)鳥インフルエンザウイルスのヒト型シアロ糖鎖レセプター結合変異を簡便且つ高感度に監視する技術を開発する、(2)ウイルスの宿主細胞レセプターへの結合を阻止する新しい機構を持つ抗インフルエンザ薬開発の基盤を創成することを目的とする。

B. 研究方法

合成シアロ糖鎖ポリマー、抗H5モノクローナル抗体、イムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖結合特異性監視法を様々な条件で構築した。さらに様々な天然および合成化合物に付き、ヘマグルチニンおよびシアリダーゼ活性阻

害評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

1. 高病原性鳥インフルエンザウイルス H5 モノクローナル抗体を用いるイムノクロマト技術による鳥インフルエンザウイルスの鳥およびヒト型レセプター結合特異性を簡便且つ迅速に測定するデバイス(キット)を開発した。本キットは重量5グラム以下で、反応は15分以内で完了する。さらに、高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1, エジプト分離株、鳥型レセプター結合性および鳥、ヒト型両レセプター結合性)について実用化を調べたところ、鳥型レセプターへのみ結合性を持つ株と同様に、ヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株に対してもかなり高感度(4HAU-128HAU)に検出可能であることが分かった(第60回日本ウイルス学会2012、大阪)。

2. ウシミルクホエイ(ミルクからチーズを沈

殿させた上清のタンパク質を多く含む画分)の *N*-グリカン糖鎖解析を行い、HPLC マッピング、MALDI-TOF-MS により、39 種類の *N*-結合型糖鎖の化学構造を決定した。そのうち、13 種類のシアル酸含有糖鎖 (mono-, di-sialosyl 構造含有) を同定した。これらは、いずれも Sia α 2-6Gal の末端構造を持ち、インフルエンザウイルスのヒト型レセプター構造と一致した (Open Glycoscience, 2012)。

3. インフルエンザウイルスおよび宿主細胞 (MDCK 細胞および発育鶏卵 CAM) の *N*-結合型糖鎖構造を HPLC マッピング、MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、インフルエンザウイルススパイクの *N*-グリカン糖鎖構造は宿主細胞膜が持つ糖鎖構造を反映していることを明らかにした (Open Glycoscience, 2012)。

4. インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) スパイクの機能 (シアリダーゼ活性) をこれまでと全く異なる機構 (NA 分子内アミノ酸と共有結合により強固に結合する。タミフル耐性の NA にも有効) で阻害する新しい分子 (2-deoxy-2,3 didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid) を合成し、その活性を見出した (Nature Communications, 2013)。

D. 考察

イムノクロマト技術による鳥インフルエンザウイルスの鳥およびヒト型レセプター結合特異性を簡便且つ迅速に測定するキットは、世界初であり、これまでの遺伝子、抗原性の監視に加えて本法の開発は高い意義を持つと考えられる。来年度には、このキットを海外 (H5N1 発生国でヒトへ伝播が起こっている国、エジプト、インドネシア、ベトナムなど) にも適用し、ヒト型レセプター結合性変異獲得を実際に監視する体制を構築する予定である。

また、今回、新たに発見したインフルエンザウイルス NA 阻害分子は、全く新しい機構によ

る NA 阻害剤で、タミフル耐性株にも有効であるため、次世代の抗インフルエンザ薬候補として有効であることが期待される。

E. 結論

高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合性獲得変異を高価な機器、複雑な操作無しで、迅速にかなり高感度 (4HAU-128HAU) に検出するデバイス (キット) を開発した。また、新規な阻害機構を持つ、新たな、インフルエンザウイルス NA 阻害分子を合成、活性を明らかにした。これらの技術、新規分子は、高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び緊急対応に適用出来るものであり、展開が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Vavricka, C.J., Liu, Y., Kiyota, H., Sriwilaijaroen, N., Qi, J., Tanaka, K., Wu, Y., Li, Q., Li, Y., Yan, J., Suzuki, Y., Gao, J.F.: Novel insight into the enzymatic mechanism of influenza virus neuraminidase for the development of covalently-bound inhibitors. *Nature Communications*, DOI: 10.1038/ncomms2487, (2013).
2. Sriwilaijaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Nakakita, S-I., Yamada, K., Ito, H., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Kato K., and Suzuki, Y.: Bovine milk whey for preparation of natural *N*-glycans: structural and quantitative analysis. *Open Glycoscience* 5, 41-50, (2012).
3. Yagi, H., Takahashi, N., Suzuki, T., Watanabe, S., Tanigawa, A., Suzuki, Y., Kato, K.: Comparative analyses of glycosylation profiles of influenza A viruses grown in different host cells. *Open Glycoscience* 5, 2-12 (2012).
4. Suzuki, K., Koyama, T., Yingsakmongkon, S., Suzuki, Y., Hatano, K., Matsuoka, K. : Synthesis and biological evaluation of sialic acid derivatives containing a long hydrophobic chain at the anomeric position and their C-5 linked polymers as potent influenza virus inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 446-454 (2012).

2. 学会発表

1. 山藤歩、酒井美帆、Sriwilajaroen, N., Sadagopan M., 安藤弘宗、石田秀治、木曾 真、鈴木康夫、常盤広明: インフルエンザウイルス NAの全亜型に有効な新規薬物に関する理論的解析. 第31回日本糖質学会年会 (鹿児島市民文化ホール) (2012年 9月).
2. 渡邊洋平、伊東哲男、Madiha, M.S., Ellakany, H.F., Sriwilajaroen, N., 平松宏明、林 司、高橋忠伸、鈴木 隆、生田和良、鈴木康夫: 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター結合性変異監視デバイス 第61回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) (2012年 11月).
3. Suzuki, Y., Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Hiramatsu, H., Sriwilajaroen, N., Takagi, T., Ikuta, K.: Possible molecular signals of avian influenza H5N1 virus for next pandemic. 4th Annual conference of Alexandria fever hospital. Infectious diseases from promise to practice. Mediterranean Azur Hotel Alexandria, Egypt. 15-16 Nov. 2012
4. Nakakita, S., Sriwilajaroen, N., Hiramatsu, H., Yamada, K., Ito, H., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Suzuki, Y.: Development of glycan microarray to survey the human type receptor adaptation of avian influenza viruses. Asian and African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - January, 23, 24, Tokyo, Japan (2013).

3. その他
なし。

G. 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。

ウイルスの伝播経路の解明、鳥インフルエンザの疫学と人への感染機構

研究分担者 西藤岳彦（独）農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

研究要旨

2010 年から 2011 年にかけて、国内で発生した HPAI の起因ウイルスの全ウイルスゲノムを解析することによって、本ウイルスの 7 つの遺伝子分節が 2008 年前後に韓国や日本の家禽、渡り鳥で分離された clade 2.3.2.1 のウイルスに由来し、PA 遺伝子はそれ以前に野鳥に侵入していた H5N1 亜型 HPAIV の PA 遺伝子に由来することを明らかにした。このことは、H5N1 亜型 HPAIV が野鳥の間で遺伝子再集合を起こしていることを示している。

同じくヒト新型インフルエンザの出現に関与する可能性が指摘されている豚インフルエンザに関して、国外から導入される豚から豚インフルエンザウイルスが分離されることを明らかにした。

A. 研究目的

H5N1 亜型の高病原鳥インフルエンザウイルス (Highly pathogenic avian influenza virus:HPAIV) は、2003 年以降アジアを中心に家禽での世界的な流行を引き起こすとともに、人への感染事例も多発している。このため、本ウイルス感染症は、家畜衛生上の問題にとどまらず、人獣共通感染症として注目されているとともに、インフルエンザパンデミックウイルス出現の観点からもその発生動向については監視が重要な病原体である。国内で家禽や野鳥で HPAI が発生した際には、発生の拡大を防止し、また人への感染リスクを検討するためにウイルス学的性状の解明は重要な課題である。

本年度は、2010 年 11 月から 2011 年 3 月にかけて国内で発生した HPAI の起因ウイルスについて、昨年度に解析した HA 遺伝子以外の 7 遺伝子分節について塩基配列を決定し

て、系統樹解析によりウイルスの起源の検討を行った。

また、豚インフルエンザウイルスの人への感染事例が米国で多発したことを受けて、ヒトでのインフルエンザパンデミック発生（2009 年）以降に国内で分離された豚インフルエンザウイルスの遺伝子解析を行なった。

B. 研究方法

- (1) 緊急病性鑑定として、（独）農研機構動物衛生研究所での亜型同定試験、病原性推定の依頼のあった 2010-2011 年に分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス計 27 株および 2009 年以降に分離された豚インフルエンザウイルス(SIV) 11 株を解析に供した。
- (2) それぞれのウイルスの各遺伝子分節を PCR によって増幅し、増幅産物をダイレクトシーケンスすることによって、塩

基配列を解読した。

- (3) 解読した塩基配列と公共のデータベース (NCBI, Influenza virus resource) に登録されている 遺伝子配列を用いて近隣接合法によって系統樹解析を行なった。

C. 研究結果

昨年度の解析で、2010 年 11 月から 2012 年 3 月までに国内で発生した高病原性鳥インフルエンザの起因株および同時期に飼育鳥、野鳥から分離されたウイルスの HA 遺伝子感の塩基配列の相同性は、99% 以上ときわめて高いことが明らかになり、これらのウイルス HA 遺伝子は、2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV と同じ WHO/FAO /OIE H5N1 Evolution working group の提唱する clade 2.3.2.1 に属することが明らかとなった。これらのウイルスについて、HA 遺伝子以外の他の 7 つの遺伝子分節の解析を行なった結果、PA 遺伝子をのぞく 6 つの遺伝子分節は、HA 遺伝子と

が示された。

一方、PA 遺伝子は 2007 年から 2009 年に韓国、中国、タイ等で野鳥から分離された鳥インフルエンザウイルスの PA 遺伝子と高い遺伝的相同性を示した (図 1)。2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV の PA 遺伝子との相同性は 97% と低い値であった。このことは、2010-2011 年に国内で分離されたクレード 2.3.2.1 に属するウイルスは、2007 年以前に存在していたクレード 2.3.2.1 ウイルスとこれまでに知られていない H5N1 亜型ウイルスのクレードのウイルスとの遺伝子再集合ウイルスであることが示唆された。

国内で分離された SIV の遺伝的由来に関する解析では、2009 年、2010 年に大阪、山形で分離された SIV(A/sw/Osaka/1/2009, A/sw/Yamagata/2010)、成田空港動物検疫所で海外からの輸入豚から検出された A/sw/Narita/aq21/2011 がヒトパンデミックウイルスであることが判明した (表 1)。

一方、栃木県、三重県で 2011、2012 年に病性鑑定に供された豚から分離されたウイルスは、表面抗原である HA, NA 遺伝子は従来から国内で循環していた H1N2 亜型ウイルス、その他 6 本の内部遺伝子はパンデミックウイルスに由来する遺伝子再集合ウイルスであった。

横浜動物検疫所で輸入豚から検出された A/sw/Yokohama/aq114/2011, A/sw/Yokohama/aq138/2011 は、北米で循環

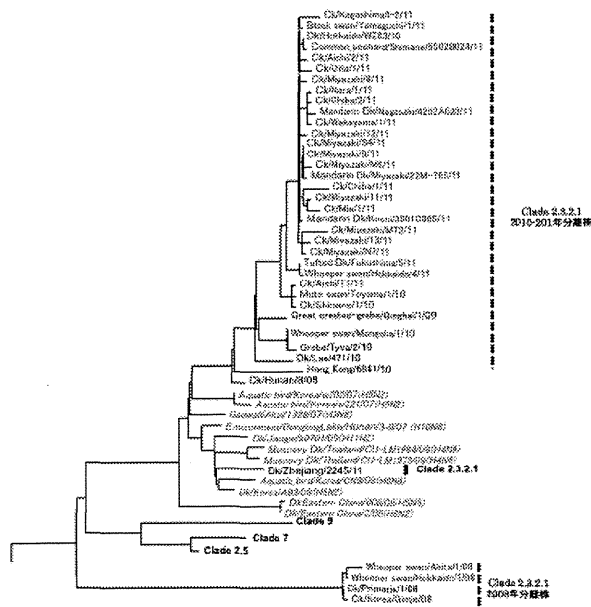


図1 H5N1亜型HPAIVのPA遺伝子系統樹

同様 2008 年に国内で白鳥から分離された HPAIV と同じグループに属していること

ウイルス名	各遺伝子分節の由来		
	HA 遺伝子	NA 遺伝子	内部遺伝子 (6 分節)
A/sw/Osaka/1/2009 (H1N1)	パンデミックウイルス		未特定
A/sw/Yamagata/11/2010 (H1N1)	パンデミックウイルス		
A/sw/Yamagata/14/2010 (H1N1)	パンデミックウイルス		
A/sw/Yamagata/19/2010 (H1N1)	パンデミックウイルス		
A/sw/Narita/aq21/2011 (H1N1)	パンデミックウイルス		
A/sw/Tochigi/2/2011 (H1N2)	古典的 ブタウイルス	ヒト型 ブタウイルス	パンデミックウイルス
A/sw/Mie/R01/2012 (H1N2)	古典的 ブタウイルス	ヒト型 ブタウイルス	パンデミックウイルス
A/sw/Yokohama/aq114/2011 (H3N2)	北米型トリフルリアソータントウイルス		
A/sw/Yokohama/aq138/2011 (H3N2)	北米型トリフルリアソータントウイルス		

表1 ブタインフルエンザウイルスの各遺伝子分節の由来

しているトリプルリアソータントであった。

D. 考察

2010-2011年に分離されたH5N1亜型HPAIVは、それまで知られていたクレード2.3.2.1のウイルスと未知のクレードのウイルスの遺伝子再集合ウイルスであった。これらのウイルスのPA遺伝子が、2007年以降に韓国やタイで分離されたH5亜型以外の鳥インフルエンザウイルスに見いだされていることから、H5N1亜型HPAIVの野鳥への侵入は今回の発生の何年も前に起こっていたことを示唆している。そのような過程を経て野鳥の中で広く拡散したPA遺伝子を遺伝子再集合によって取り込んだ今回のクレード2.3.2.1ウイルスは、野鳥への高い親和性を獲得したため、野鳥によって国内に大量に持ち込まれた可能性が考えられる。

国内のSIVの遺伝的解析によって、2009年のパンデミックウイルス出現以降、パンデミックウイルスの豚への侵入が既に起こっており、また既存のSIVとの遺伝子再集合によって人での高い増殖性を持つパンデミックウイルスに由来する内部遺伝子を持つSIVが豚の中で形成されていることが示された。これらのウイルスのHA遺伝子が人への親和性を持っているかどうかは重要な課題であろう。

動物検疫所での着地検疫によって、国外からのSIVの侵入が検知され、国内へのウイルスの導入が未然に防がれた。現在動物検疫所では、インフルエンザウイルスに関する輸入豚の全頭検査が行なわれており、国内への新たなSIVの侵入を防ぐ為に機能していることが示された。

E. 結論

2010-2011年の国内でのHPAI起因ウイルスの全遺伝子解析を通じて、これらのウイルスが遺伝子再集合体であることが明らかとなり、更にHPAIVの野鳥への侵入が発生の数年前に既に起こっていた可能性を示唆する知見を得た。H5N1亜型HPAIVの遺伝子解析では、HA遺伝子のみでは無く全ゲノムの迅速な解析が重要である。

国内分離SIVの遺伝子解析で、国内で既にパンデミックウイルスと国内既存のSIVの遺伝子再集合が起こっていることが明らかにされた。引き続き国内で分離されたSIVの性状解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Uchida et al., Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11 *Virus Research* 170:109-117(2012)

Matsuu et al., Genetic characterization of swine influenza viruses isolated in Japan between 2009 and 2012 *Microbiol Immunol* 56: 792-803 (2012)

2. 学会発表

Matsuu et al., Genetic characterization of swine influenza viruses isolated in Japan between 2009 and 2012 *Microbiol Immunol* 56: 792-803 (2012)

G. 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

「インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の分子進化および B 型インフルエンザウイルスの Restriction Fragment Length Polymorphism」

研究分担者：押谷 仁 東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授

協力研究者：鈴木陽、岡本道子、IronaKhandaker、岡田貴志（東北大学）

研究要旨

研究 1: 2009 から 2011 年に仙台市内で流行した A(H1N1)pdm09 の HA および NA 遺伝子の分子生物学的解析を行った。2009-2010 シーズンと比較し、2010-2011 シーズンの分離ウイルスにて遺伝子の多様性が観察された。

研究 2: 臨床検体から直接、山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した

研究 1: 「インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 の分子進化」

IronaKhandaker、鈴木陽、岡本道子、押谷仁

A. 研究目的

A(H1N1)pdm09 は、2009 年の世界的流行の後にも複数シーズンにわたり地域的流行を起こしている。大多数の人がこのウイルスに対して免疫を持たないため、このウイルスの経時的な変異を観察する事で、集団免疫に関連する抗原決定部位などの変異が観察できる可能性が高い。そこで、本研究では、2009 から 2011 年までに仙台市内で流行した同ウイルスの HA および NA 遺伝子の解析を行い、同ウイルスの遺伝子の進化について観察した。

B. 研究方法

2009 年の 9 月から 2011 年の 4 月までの期間、仙台市内の小児科外来施設においてインフルエンザ様疾患患者から咽頭拭い液を採取し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。赤血球凝集阻止試験にてインフルエンザウイルスの同定を行った後、HA および NA 遺伝子の塩基配列を確定し、HA1 (52-1029 nt)

および NA (1-1395nt) 遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

同研究期間中に分離同定された 75 の分離株を対象に遺伝子解析を行った。ウイルスの進化速度を比較すると、2009-2010 シーズン (1.5×10^3 /substitutions per site per year) より翌 2010-2011 シーズン (1.6×10^3 /substitutions per site per year) の方が変化に富んでいた。Neighbor-Joining 法により作成した HA1 (図 1) および NA の系統樹では、それら分離株は HA1 に S203T の変異を共有する Clade7 に分類された。しかし、2009 年の分離株の NA 遺伝子のみ、Clade6 に分類された。また、2009-2010 シーズンの株は系統樹上で分散している一方で、2010-2011 シーズンの分離株は、2 つのクラスターに分かれていた。

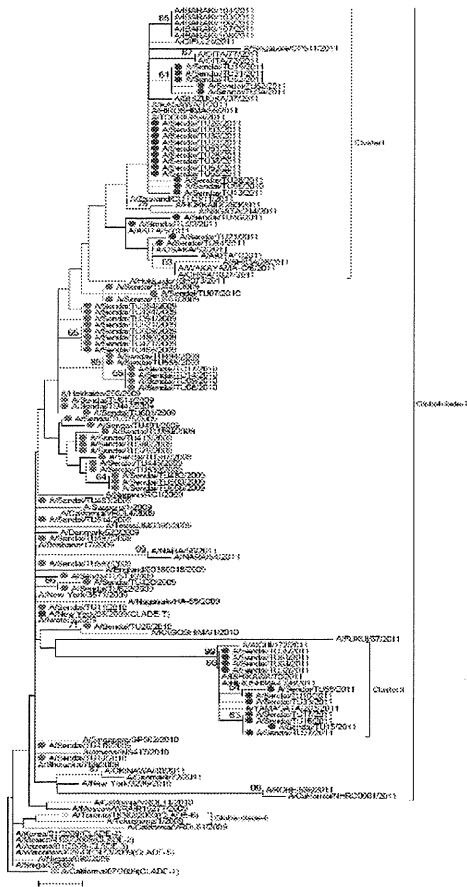


図1 HA1 遺伝子の系統樹(NJ 法)

HA1 遺伝子の解析では、A141V、S143G、S183P、S185T および S203T などの抗原決定部位およびレセプター結合部位に変異を認めた。いずれの分離株も NA 阻害剤の耐性に関わる変異は持っていなかった。HA1 の 197 番目および NA の 46 番目が正の選択圧を受けていた。

D. 考察

A (H1N1) pdm09 の変異を観察することは、ウイルスの進化を知る上で非常に重要である。2009 年の分離株が複数のクラスターに分かれていたのは、異なる経路を経て仙台市内に持ち込まれた事を示している。抗原決定部位の変異をみると、2009 年は少なかったものの、2011 後半にかけて増加していた。これは、ウイルスの流行に伴い集団免疫が生じたからと考えられる。正の選択圧を受けていた HA1 および NA の部位も、同様メカニズムによると考えられる。

E. 結論

今後も、ウイルスの変異を地域レベルで観察し、ウイルスの進化を追いつける必要が有る。

研究 2: 「B 型インフルエンザウイルスの Restriction Fragment Length Polymorphism」

岡田貴志、鈴木陽、岡本道子、押谷仁

A. 研究目的

B 型インフルエンザウイルスは抗原性の違いにより、山形系統とビクトリア系統に分類される。本研究では臨床検体から直接 B 型インフルエンザウイルスの同定が可能となる Restriction Fragment Length Polymorphism の確立を試みた。

B. 研究方法

山形系統およびビクトリア系統の HA 部分を特異的に切断する制限酵素が無かった為、PCR プライマーにミスマッチを入れ PCR 産物に制

限酵素認識部位を作成した。PCR 産物は、山形系統は Sma I、ビクトリア系統は ApaI で 170bp および 30bp に消化されるようにした。標準株として、2007-2008 シーズンに仙台市内の小児外来施設で採取した咽頭拭い液から分離した B 型インフルエンザウイルスを用いた。また、臨床検体として、2011-2012 シーズンに仙台市内で小児外来施設にて採取され、B 型インフルエンザウイルス分離同定された咽頭拭い液を使用した。それらの検体より RNA を抽出後、Uni11 (Dapat C et al, 2009) にて complementary DNA を作成した。アウター

プライマー(Tsai HP et al, 2006)で1st PCRを行った後、制限酵素認識部位を含む RFLP 専用プライマーでnested PCRを行った。PCR産物は4%アガロースで電気泳動を行い、制限酵素での処理を確認した。

C. 研究結果

山形系統およびビクトリア系統の臨床分離株を用いて各々の系統の RFLP 専用プライマーでPCRを行うと、両系統はともに増幅されるが、その産物は各々の制限酵素でのみ消化され、反応の特異性を確認した。また、これらのPCR産物に変異が挿入された事をシーケンスでも確認した。

RFLP専用プライマーのみのPCRと比較すると、アウタープライマーを使用したnested PCRでは検出感度が10倍増加し10²TCIDまで検出可能となった。

2011-2012シーズンのビクトリア系統46件および山形系統2件の臨床検体を対象にnested PCRをおこなったところ、前者で40件、後者で1件が陽性となった。全41検体において、臨床分離株と同様に各々の系統の RFLP 実験

系でのみPCR産物が消化された。

D. 考察

山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した。ウイルスの分離やシーケンスを行わずして、B型インフルエンザウイルスの系統の判別が可能となった。また、アウタープライマーを併用したnested PCRによって臨床検体の約85%で増幅が可能であった。しかし、一部検体においては、nested PCRより分離効率が勝っていた。この方法は塩基配列に特異的であるため、変異の挿入に注意が必要である。

E. 結論

臨床検体から直接、山形系統およびビクトリア系統を特異的に識別する RFLP の確立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tohma K, et al. Monitoring of Influenza Viruses in the Aftermath of the Great East Japan Earthquake. Jpn. J. Infect. Dis., 65, 542-544, 2012

2. 学会発表

なし

G. 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

動物インフルエンザウイルスがパンデミックウイルスに変異するメカニズムの解析

研究分担者 堀本泰介 東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授

研究要旨

過去のインフルエンザパンデミックウイルスは、豚を中間宿主として発生した。本研究では、豚以外の哺乳動物がパンデミックウイルス誕生の中間宿主となる可能性から野生動物および伴侶動物のインフルエンザウイルス感染を解析している。本年度は、実際に H5N1 高病原性鳥インフルエンザが侵入した養鶏場の周辺に生息する野生動物を調査した。その結果、H5N1 ウイルス特異抗体陽性のアライグマ個体を 2 頭検出した。交叉中和性試験により、この感染は養鶏場に侵入したのと同じ H5N1 ウイルスによることが強く示唆された。これらの成績は、野生アライグマがウイルス変異の場となる可能性を示しているとともに、養鶏場へのウイルス運び屋になる可能性も示唆している。一方、本年度は犬に加えペット猫の調査も実施した。その結果、2 匹で A 型ヒトインフルエンザウイルスの感染が認められた。これらの成績は、公衆衛生学的見地から豚以外の哺乳動物に対するサーベイランスの重要性を示すものである。

A. 研究目的

インフルエンザは人や鳥に限らず他の動物にも見られる感染症である。例えば、産業動物である豚や馬のインフルエンザは時に経済的被害を与え、犬や猫の伴侶動物にもウイルスは感染する。また、高病原性 H5N1 鳥ウイルスに感染した野生動物も数多く見つかっている。本年度は、豚以外の哺乳動物が新たなパンデミックウイルスを作り出す中間宿主になりうるかどうかを更に検証するため、2011 年初頭、実際に H5N1 高病原性鳥インフルエンザが発生した養鶏場の周辺に生息する野生動物、および猫を含めた伴侶動物のインフルエンザウイルス感染の調査を目的とした。

B. 研究方法

アライグマは、わが国で急速に野生化が進み、野鳥、畜産業、人と頻繁に接触する有害鳥獣であり、インフルエンザウイルスに感受性を持つ。今回、2011 年に実際に H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスが侵入した西日本の 1 養鶏場の周辺（半径 16km 以内）で捕獲した野生のアライグマ 38 頭から採取した血清サンプルについて、各 clade の H5N1 ウイルスあるいは他の HA 亜型ウイルスを抗原としたマイクロ中和試験法によりインフルエンザウイルス特異抗体を検索した。

わが国では、ペットの犬や猫にインフルエンザウイルスが感染し問題となったこと

はない。しかし、海外では高病原性 H5N1 鳥ウイルスが犬や猫に致死感染を引き起こした事例が報告されている。また、過去の報告では、犬および猫ともヒトインフルエンザウイルスに弱いながらも感受性をもつことが示されている。したがって、犬や猫に感染したウイルスが馴化し新型ウイルス出現の母体となる可能性、および場合によっては H5N1 ウイルスとヒトウイルスの遺伝子交雑体出現の場となる可能性も否定できない。今回、山口県および神奈川県下の動物医療センターに各種疾患のため来院した犬および猫から採取した合計 392 の血清検体を用い、マイクロ中和法によりインフルエンザウイルス抗体を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は、野生動物および伴侶動物の血清検体のみを対象にし、人血清検体を用いていないため倫理審査には該当しない。伴侶動物の検体に関しては飼い主の研究使用承諾を受けている。

C. 研究結果

野生アライグマ抗体検査

(1)38 検体中 2 検体から H5N1 特異中和抗体を検出した(陽性率 5.2%)。(2)各 clade の H5N1 ウイルスを用いた抗原交叉性試験により、陽性検体(それぞれ 2011 年 7, 8 月に捕獲、養鶏場からの距離ともに約 11km)はいずれも同時期に日本国内に広く侵入した clade 2.3.2.1 ウイルスの感染によることが強く示唆された。したがって、養鶏場に侵入したウイルスと同一であると判断できる。

ペット犬抗体調査

(1)2009 H1N1pdm ウイルスに対する中和抗体は計 366 検体中 14 検体で陽性であった(3.8%)。このうち 1 検体は季節性 H1N1 ウ

イルスに対しても同程度の中和活性を示した。(2)季節性 H3N2 ウイルスに対する中和抗体は 8 検体で陽性であった(2.2%)。(3)B 型ウイルスに対する中和抗体は 6 検体で陽性であった(1.6%)。(4)H5N1 ウイルスに対する抗体は全ての検体で陰性であった。

ペット猫抗体調査

(1)2009 H1N1pdm ウイルスに対する中和抗体は計 26 検体中 1 検体で陽性であった(3.8%)。(2)季節性 H3N2 ウイルスに対する中和抗体は 1 検体で陽性であった(3.8%)。(3)その他のヒトウイルス、H5N1 ウイルスに対する抗体は全ての検体で陰性であった。

D. 考察

昨年度および本年度の研究結果、ならびに海外での過去の報告を総合すると、アライグマ、犬、猫が H5N1 ウイルスに感染することは明らかである。したがって、これら動物の体内で人にパンデミックを引き起こす潜在性を持つ変異ウイルスが生み出される可能性は十分にあると推測する。特に、アライグマの H5N1 抗体陽性個体の場合、すでに H5N1 ウイルスの感染に耐過したことを意味しており、ウイルス排出による他の個体へのウイルス伝播の潜在性が高いと考えられる。そういった野生アライグマが近くの養鶏場への感染源になっている可能性は否定できない。野生のアライグマが森の中で斃死した渡り鳥(あるいは留鳥)を捕食することによりウイルスに感染し、ウイルス排出しながら養鶏場に近づいた結果、直接的あるいは間接的な感染源になった可能性はある。低い陽性検出率から、アライグマ間には H5N1 ウイルスの侵淫はないと考えられるが、養鶏場等における野生動物の侵入防止対策を再確認すべきである。

一方、犬、猫には A 型、B 型ともヒトイ

ンフルエンザウイルスが感染する。つまり、チャンスさえあれば、豚と同様これら伴侶動物が鳥インフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスの遺伝子交雑体の作製母体になる可能性はあると考えられる。

E. 結論

本研究結果から、わが国で野生化したアライグマは、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染すると結論できる。それを踏まえた対策をとるべきである。一方、家庭動物（ペット犬、猫）は A 型、B 型問わずヒトインフルエンザウイルスに感染すると結論できる。鳥との接触が生じるこれらペットの放し飼いには注意が必要である。総じて、インフルエンザパンデミック対策における野生動物、伴侶動物の公衆衛生学的重要性を考慮すべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda S, Watanabe S, Masangkay JS, Mizutani T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Kato K, Horimoto T, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H: Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. Arch Virol 157(17):2349-2355, 2012

Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura K, Shimojima M, Kawaoka Y: Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. J Virol 86(3):1405-1410, 2012.

2. 学会発表

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、前田健：わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第 154 回日本獣医

学会 2012. 9. (盛岡)

堀本泰介、玄文宏、岩附研子、木曾真紀、村上晋、加藤健太郎、久末正晴、阪口雅弘、明石博臣、伊藤壽啓、河岡義裕、前田健：わが国の哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染 第 60 回日本ウイルス学会総会 2012. 11. (大阪)

堀本泰介：インフルエンザの歴史 日本獣医史学会 2012. 10. (東京)

G. 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

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
WHO Writing Group, William K. Ampofo, W. K., Baylor, N., Cobey, S., Cox, N., Daves, S., Edwards, S., Ferguson, N., Grohmann, G., Hay, A., Katz, J., Kullabutr, K., Lambert, L., Lewandowski, R., Mishra, A. C., Monto, A., Sequeira, M., Tashiro, M., Waddell, A. L., Wairagkar, N., Wood, J., Zambon, M., Zhang, W.	Improving influenza vaccine virus selection. Report of a WHO informal consultation held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 14-16 June 2010.	Influenza and Other Resp. Virus.	6	142-152	2012
Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kuniyoshi, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro, M.,	Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave	Jpn. J. Infect. Dis.	65	363-367	2012
Obayashi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tsukagoshi, H., Saitoh, M., Ishio, T., Yokota, Y., Kimura, H., Tashiro, M., Kozawa, M.	A new reassortant swine influenza A (H1N2) virus derived from pandemic H1N1/2009 virus isolated from swine.	Emerg. Infect. Dis. (submitted)			2012
WHO Expert Working Group for Global Influenza Surveillance and Response System on Surveillance of Antiviral Susceptibility.	Surveillance of influenza antiviral susceptibility: Interpretation of laboratory data.	Lancet Infect. Dis. (submitted)			2012

<p>Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J.S. M., Perez, D. R., Richt, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P.G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G.</p>	<p>Pause on avian flu transmission research.</p>	<p>Science.</p>	<p>335</p>	<p>400-1</p>	<p>2012</p>
<p>WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M. Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. G.</p>	<p>Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. J. Influenza.</p>	<p>Other Resp. Virus.</p>	<p>6</p>	<p>1-5</p>	<p>2012</p>
<p>Ainai, A., Tamura, S., Suzuki, T., van Riet, E., Ito, R., Odagiri, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H.</p>	<p>Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults</p>	<p>ProS One. (submitted)</p>			<p>2012</p>

Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T	Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs.	Clin Vaccine Immunol.	19(6)	897-908	2012
S.Fujisaki, E.Takashita, M.Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri.	A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs Biochem.	Biophys. Res. Commun.	429	51-56	2012
Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N	Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011	Vaccine	30(45)	6461-71	2012
K.Ohnishi, Y.Takahashi, N.Kono, N.Nakajima, F.Mizukoshi, S.Misawa, T.Yamamoto, Y.Mitsuki, S.Fu, N.Hirayama, M.Ohshima, M.Ato, T. Kageyama, T.Odagiri, M.Tashiro, K.Kobayashi, S.Itamura, and Y.Tsunetsugu-Yokot.	Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus.	Jpn.J.Infect.Dis.	65(1)	19-27	2012