

クチン Bio Clinica, in press

山本典生 細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティとGMPクリーンテクノロジー, 22(7):1-5, 2012

2. 学会発表

Itsuki Hamamoto, Hiroshi Takaku, Masato Tashiro, Norio Yamamoto: High Yield Production of Influenza A Virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Cells with Stable Knockdown of IRF7. 4th Influenza Vaccines for the World - IVW 2012, Valencia, 9 Oct. 2012 - 12 Oct. 2012

高橋 仁、原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、板村 繁之、田代 真人、山本 典生 インフルエンザワクチンシードウイルスに求められる遺伝的安定性の検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

原田 勇一、高橋 仁、中村 一哉、浜本 いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐 奈美、浅沼 秀樹、板村 繁之、田代 真人、山本 典生 インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

浜本 いつき、原田 勇一、中村 一哉、高橋 仁、許斐 奈美、浅沼 秀樹、田代 真人、山本 典生 無血清培地に馴化させたMDCK細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月

山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋 仁、許斐奈美、相内 章、長谷川秀樹、田代 真人 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫

応答への影響 第60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

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願2012-093016号

「細胞培養組成物、インフルエンザウイルスの生産方法、及び、インフルエンザウイルス」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 MDCK細胞 (MCB, EOPC) に対する試験結果

Cell	Test	Results
MCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes	Canine-equivalent to MDCK cell line
MCB	Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)	Negative
EOPC	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK standard
EOPC	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
EOPC	In vitro assay for the detection of canine viruses	Negative
EOPC	Test for the presence of inapparent viruses including guinea pigs (CBER Guidance 2006)	Negative
EOPC	Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPERT End-point)	Negative
EOPC	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of Canine origin
EOPC	Detection of Viral Contaminants in Bovine Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.	Negative
EOPC	MAP Test with LCMV Challenge	Negative
EOPC	Oncogenicity in newborn nude mice	Negative (This test is still in progress.)

細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

研究分担者 中村一哉

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・主任研究官

研究要旨 ヒト胎児網膜芽細胞由来の細胞株 Per. C6 を用いて、臨床検体からのウイルス分離効率を検討した。A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの分離率が顕著に低い一方で、A/H3N2 亜型と B/Victoria 系統のウイルスについては高い分離率と増殖性を認めた。昨年度までの MDCK 系統細胞株を対象に行った検討結果と併せて、シードウイルス分離に用いる細胞株によるそれぞれの利点、潜在的問題点を明らかにした。

A. 研究目的

従来鶏卵を用いたインフルエンザウイルス分離法は、最近の野外株の分離効率低下や分離株の性状変化など懸念すべき点が多い。インフルエンザウイルス野外株をその性状を保たせながら、効率よく分離する手法の確立は、流行株の正確な性状把握や流行株に即したワクチン製造に必須であり、培養細胞を用いたウイルス分離法が、鶏卵分離法で生じる問題点の克服において有望視されている。

本研究では、インフルエンザウイルス野外株を効率よく分離出来る培養細胞株を探索し、将来のサーベイランス業務、ワクチンシード調製に資することを目的とし、本年度はヒト胎児網膜芽細胞由来の細胞株 Per. C6 を用いて、A/H3N2 亜型株 (H3)、B/Victoria 系統株 (B/Vic) および近年出現した A/H1N1pdm09 亜型株 (H1pdm) について、患者臨床検体からのウイルス分離効率を検討し、野外株分離

における有用性を評価した。

B. 研究方法

1) 細胞株

Crucell 社（オランダ）で樹立された浮遊培養系 Per. C6 細胞株 (Per. C6) を本実験に使用した。分離効率の比較評価用に当研究所でインフルエンザウイルス分離に用いられている付着培養系 MDCK 細胞 (MDCK_Conv) を用いた。Per. C6 の維持は、4mM L-Glutamine 添加 AEM 培地 (GIBCO 社) を用いた震盪培養にて、MDCK_Conv の維持には 10%FCS 添加 MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

2) 臨床検体

2010/2011 シーズンに医療機関を受診したインフルエンザ患者から採取した鼻腔ないし咽頭拭い検体のうち、特異的プローブ・プライマーセットを用いたリアルタイム RT-PCR

法にて H1pdm、H3、B/Vic のそれぞれが陽性と判定された検体をウイルス分離用試料に供した。

3) ウイルス分離・継代

125ml 規格の細胞培養用三角フラスコに 1.0×10^7 個/5ml の PerC6 を分注調製し、供試検体 50 μ l を接種した。A 型インフルエンザウイルス分離の際は 34 $^{\circ}$ C、B 型ウイルス分離においては 35 $^{\circ}$ C の恒温条件、8%CO₂ 存在下で 72 時間震盪培養した。MDCK_Conv は ϕ 60mm デイッシュに 1.5×10^6 個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体 50 μ l と OPTI-PRO SFM 培地 (GIBCO 社) 150 μ l を混合したものを接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含の OPTI-PRO SFM 培地を使用し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の恒温条件下で 72 時間静置培養した。

接種 72 時間後に培養液を回収遠心し、得られた上清中の赤血球凝集 (HA) 活性の有無によりウイルス分離の成否を判定した。HA 活性が確認されなかった場合には、1 回盲継代を行った後の成績をもって、分離成否の判定とした。

分離されたウイルス株について、同様の継代操作を 10 代まで繰り返し、ウイルスの増殖性の変遷を観察した。継代用接種には分離ウイルスの HA 価に基づき、1 HA 価分のウイルス液に希釈調製したものをを用いた。

4) HA 試験

HA 試験は定法に従い行った。検体ウイルスの 2 倍階段希釈列を作製し、これにウイルス液と等量の 0.75%モルモット赤血球液を加え、90 分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものを HA 陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検

体を用いるに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。

C. 研究結果

Per.C6 および比較対照としての MDCK_Conv を用いた臨床検体からのウイルス分離結果を表 1 に示した。H1pdm 患者臨床検体の Per.C6 への接種においては、供試検体のいずれからもウイルスの分離を確認出来なかった。MDCK_Conv を用いた場合は、6 検体がウイルス分離に盲継代を必要としたものの、全ての検体からウイルスを分離できた。

H3 分離については、Per.C6 への接種により 12 検体から 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからの分離を確認できた。Per.C6 接種においては 6 検体が盲継代を経ずともウイルス分離を確認でき、その後のウイルス継代で観察される HA 価は 64-256HAU と比較的高い値を示していた。MDCK_Conv を用いた場合、分離総数は多かったものの、分離ウイルスの HA 価は継代初期 (~4 継代) で 16HAU 程度、さらに継代を重ねた場合でも、32-64HAU と低値を推移する傾向があった。

B/Vic は Per.C6 への接種により 12 検体から 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからウイルスを分離でき、Per.C6 への接種で分離されたうちの 1 株を除き、分離確認に盲継代を要しなかった。分離株の HA 価は継代を通じて 256HAU 以上の高値を示し、用いた細胞による差異は認められなかった。

表1 臨床検体接種によるウイルス分離効率

H1pdm (2010/11 期)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後 ¹⁾		
Per.C6	10	0	0	0	0%
MDCK_Conv		4	6	10	100%
H3 (2010/11 期)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後		
Per.C6	12	6	3	9	75%
MDCK_Conv		2	10	12	100%
B/Vic (2010/11 期)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後		
Per.C6	12	8	1	9	75%
MDCK_Conv		12	–	12	100%

¹⁾ 初回接種で分離確認出来た株を含めない。

D. 考察

今回、臨床検体から直接のウイルス分離において、Per.C6 を分離用基材として用いた場合に観察される特徴が明らかにされた。

H1pdm では、供試検体のいずれからもウイルス分離を確認することが出来なかったため、Per.C6 は H1pdm に対する感受性が極めて低いものと考えられた。同じ亜型である A ソ連型 H1N1 の陽性検体を用いて予備的に実施した試験においても MDCK_Conv に比べ大きく劣る分離成績であった（本報告書未記載）。

これらのことから、Per.C6 は A/H1N1 亜型のウイルス分離における有用性は低いものと考えられた。一方、H3 分離に際しては、実用に値する分離率を示し、上清中の HA 価は MDCK_Conv を用いた場合よりも高い値が安定して観察され、Per.C6 の H3 ウイルスの分離、増殖用基材としての有用性が示唆された。最近の H3 分離株は MDCK で分離継代した場合に低い HA 価を示す傾向もあり、MDCK 細胞での H3 分離に困難が生じた場合の代替基材候補になり得るものである。

B/Vic 分離については、Per. C6 を用いての分離率は MDCK_Conv を用いた場合よりも低かったが、実用には能うものと考えられた。分離株継代によって得られる HA 価も MDCK_Conv を用いた試験で観察された HA 価に比肩するものであったため、B/Vic 分離増殖用基材としての有用性も期待される。

Per. C6 分離株のサーベイランス用途での適性を明らかにするためには、Per. C6 で分離されたウイルス株について、遺伝子解析、抗原性解析を実施し、MDCK_Conv 分離株との差異や野外株の性状からの乖離を検討していく必要がある。

今回の試験成績では、H3 の増殖性においては Per. C6 が MDCK_Conv に比べ優位であったが、汎用性という点も併せて考慮した場合、インフルエンザワクチンシードの分離調製に際しては、MDCK_Conv あるいは他の MDCK 系統の細胞株が Per. C6 よりも有用であると考えられた。しかし、近年の H1pdm や H3 を MDCK_Conv や他の MDCK 系統の細胞で増殖させた場合に、HA 価が低値を示す傾向も認められている。不十分な HA 価はサーベイランス業務における抗原性解析やワクチン製造に際し不利益となり得るものであることから、低 HA 価を示す要因を細胞、ウイルスの両面から探索、解明していくことで、高い HA 価を得るための培養手法を確立することが求められる。

E. 結論

Per. C6 は H3 ウイルスの増殖性において、MDCK_Conv よりも良好な成績を示したが、H1pdm の分離効率が著しく低く、ワクチンシード分離調製用基材として汎用的に使用す

るには大きく課題を残している。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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
3. その他
特になし

ウイルスの増殖性に関与する因子の解析とウイルス増殖性が向上した新規 MDCK 細胞の開発に関する研究

研究分担者 浜本 いつき

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 第 5 室・研究員

研究要旨 従来の孵化鶏卵培養法に代わり、細胞培養法を用いた新型インフルエンザワクチンの開発が進められている。MDCK 細胞はインフルエンザウイルスの分離効率及び増殖性が良いため、細胞培養インフルエンザワクチン製造に用いられる候補細胞の一つである。しかし、パンデミックワクチンを短期間大量に必要とする際には、よりウイルス増殖効率の高い細胞を開発する必要がある。前年度は、I 型インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子である IRF7 をノックダウンすると PR8 ウイルス産生量が有意に増加することを明らかにした。本年度は、IRF7 に対する shRNA を安定発現させた新規 MDCK 細胞において実験室株である PR8 と野外株のウイルス産生量を調べた。その結果、新規 MDCK 細胞では、コントロール MDCK 細胞と比較して HA 価が 2～8 倍の上昇が認められた。また、新規 MDCK 細胞における PR8 ウイルス増殖性改善による I 型 IFN 産生量への影響を調べた。その結果、I 型 IFN 産生経路と別の経路を介してウイルス産生量が有意に増大した。さらにウイルスの増殖性を向上させるメカニズムを解明することにより、より効率的なワクチンシードウイルスの分離及び増殖が可能となり、より短期間に大量のワクチンを供給できる体制の確立に繋がると考えられる。

A. 研究目的

新型インフルエンザの大流行に対応するには、安全性や有効性とともにより迅速に大量生産することが要求される。

欧州では細胞培養法によるパンデミックインフルエンザワクチンの承認を取得しており、日本国内においても細胞培養由来のワクチン製造へと移行を進めているが、より短期間に十分量のワクチンを生産するためには分離効率、増殖性が高いと言われる MDCK 細胞よりも、さらにウイルスの増殖性が高まった細胞を使用することが望ましい。そこで本研究では、ウイルスの増殖性に関与する遺伝子を同定し、同定した遺伝子に対する

shRNA 安定発現 MDCK 細胞を樹立した。また、新規 MDCK 細胞において PR8 や野外株のウイルス産生量の評価を行った。さらに、PR8 ウイルスの増殖性を改善させるメカニズムを調べるために、I 型 IFN 産生量との関連性を調べた。最終目標は、ウイルス高増殖性細胞株をシードウイルス分離・増殖に応用することである。

B. 研究方法

前年度は、I 型 IFN 誘導性遺伝子である IRF7 をノックダウンすると PR8 ウイルス産生量が有意に増加したため、IRF7 に対する shRNA 安定発現 MDCK 細胞を樹立し、PR8 ウイルス産生

量を比較検討した。本年度は、他の型、亜型のウイルスを新規 MDCK 細胞に感染させてウイルス増殖性への影響を調べた。また、PR8 ウイルス増殖性改善のメカニズムを調べるために、I 型 IFN 産生量への影響を調べた。コントロール MDCK 細胞と新規 MDCK 細胞に PR8 (A/H1N1) 、 A/Narita/01/09pdm (A/H1N1pdm09) 、 B/Florida/04/2006 (山形系統) 、 A/Victoria/361/2010 (A/H3N2) を感染させて 48~96 時間後に培養上清中に放出されるウイルス液の HA 価を測定した。また、PR8 感染後 24 時間の培養上清中に放出されるウイルス RNA 及び細胞内の RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にてウイルス産生量及び IFN- α / β 産生量を定量し、比較検討を行った。

C. 研究結果

IRF7 の発現を恒常的に抑制する MDCK 細胞にウイルスを感染させて、48~96 時間後の培養上清中に放出されるウイルス液の HA 価を調べた結果、コントロール細胞と比較して 2~8 倍の上昇が認められた (Table 1)。さらに、ウイルス増殖性改善のメカニズムを調べるために PR8 を両細胞に感染させて 24 時間後に培養上清中に放出されるウイルス RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した結果、IRF7 をノックダウンした細胞ではコントロールと比較してウイルス産生量が有意に増加した (Fig. 1A)。一方、ウイルス増殖による細胞内の IFN- α / β 産生量への影響は認められなかった (Fig. 1B)。

Table1. Effects of viral production in MDCK cells with stable knockdown of IRF7.

Influenza virus	HA titer	
	Ctrl.	IRF7
A PR8 34 (A/H1N1)	8	16
A Narita 1 2009 (A/H1N1)pdm 09)	8	32
A Victoria 361 2011 (A H3N2)	4	16
B Florida 04 2006 (B Yam)	2	16

Influenza virus	HA titer	
	Ctrl.	IRF7
A PR8 34 (A/H1N1)	8	16
A Narita 1 2009 (A/H1N1)pdm 09)	4	16
A Victoria 361 2011 (A H3N2)	4	32
B Florida 04 2006 (B Yam)	8	32

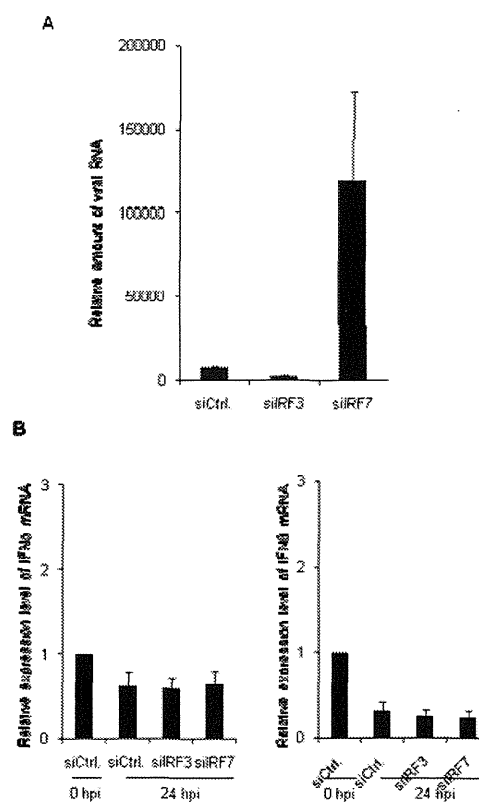


Fig.1 Enhancement of viral propagation in siIRF7 knockdown MDCK cells is not caused by an inhibitory effect on type I IFN induction

D. 考察

本研究では、新型インフルエンザの大流行に備え、より高い効率でのシードウイルスの分離・増殖とワクチン製造を行うことを可能とする細胞の樹立を目的として、MDCK 細胞の改変によるウイルス高増殖性細胞の取得を試みた。その結果、IRF7 をノックダウンすると PR8 ではウイルス RNA 量は有意に増加し、HA 蛋白量も増加傾向にあったが有意差は認められなかった。一方、野外株では HA 蛋白量に有意な増加が認められた。従来の MDCK 細胞に比べて、新規 MDCK 細胞ではウイルス産生量が改善されるが、株間によって差があると考えられる。また、ウイルス増殖性の向上には I 型 IFN 産生量には影響しなかったことからインフルエンザウイルスの増殖性改善には I 型 IFN 産生誘導経路と別の経路が関与していることが示唆された。今後は IRF7 によるウイルス産生の制御機構及び IRF7 をノックダウンした MDCK 細胞においてウイルス産生量を増加させるメカニズムの解析を進めていきたい。従来の細胞に比べてウイルスの増殖性が高まった細胞は、低増殖性ウイルスの分離・増殖に有用と思われる。また、期間を短縮してワクチンの製造を行うことにも応用が可能であろう。

E. 結論

本年度の研究では、IRF7 の発現を恒常的に抑制する MDCK 細胞にウイルスを感染するとウイルス産生量は増加したが、株間におけるウイルス産生効率に差異が認められた。PR8 ウイルス増殖性改善のメカニズムは I 型 IFN 産生経路と別の経路を介してウイルス産生量が増加することが示唆された。今後、IRF7 をノックダウンした MDCK 細胞においてウイルス増殖性を高めるメカニズムの解析を進めていくことによりウイルス増殖効率が向上

する新規ワクチンシード作製用候補細胞株の探索及び開発に繋がる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. I Hamamoto, H Takaku, M Tashiro, N Yamamoto. High yield production of influenza virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. PLoS One, in press (2013)

2. 学会発表

1. I Hamamoto, H Takaku, M Tashiro, N Yamamoto. High yield production of influenza A virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. 4th Influenza Vaccines for the World, Valencia, Spain, October 2012
2. 浜本いつき、原田勇一、中村一哉、高橋仁、許斐奈美、浅沼秀樹、田代真人、山本典生 「無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
3. 原田勇一、高橋 仁、中村一哉、浜本いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐奈美、浅沼秀樹、板村繁之、田代真人、山本典生 「インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価」第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

4. 高橋 仁、原田勇一、中村一哉、浜本
いつき、Bernhard Roth、Heidi
Trusheim、板村繁之、田代真人、山本
典生 「インフルエンザワクチンシー
ドウイルスに求められる遺伝的安定
性の検討」第 60 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

細胞培養組成物、インフルエンザ
ウイルスの生産方法、インフルエ
ンザウイルスにつき特許出願
特願 2012-93016
(出願日 2012 年 4 月 16 日)

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., Baylork, N., Cobey, S., Cox, N., Daves, S., Edwards, S., Ferguson, N., Grollmann, G., Hay, A., Katz, J., Kulkarni, 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., Akabiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Noda, K., Kimura, M., 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.	J. 65	363-367	2012
Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T.	Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A/H1N1pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay.	J. Virol. Methods	12	DOI:10.1016/j.jviromet.2012.12.005	2012
Obayashi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tsukagoshi, H., Saitoh, M., Ishioka, 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>Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kajii, T., Yamamoto, K., Itamura, S., Horiiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T.</p>	<p>Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon-α-dependent apoptosis.</p>	<p>Vaccine (submitted)</p>			<p>2012</p>
<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., Feldman, 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., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swaine, D. E., Takimoto, 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>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>

<p>Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastr e, 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., Feldman, 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., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swaine, D. E., Takimoto, 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 studies</p>	<p>Nature</p>	<p>481</p>	<p>443, doi:10.1038/481443a</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>

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, Hiro nori 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	19-27	2012
Sriwilaijaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y.	Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition.	Antiviral Res.	94(2)	139-46	2012
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.	Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function.	ACS Chem Biol.	7(3)	552-62	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Virol.	84(2)	336-44	2012
Asanuma, H., Zamri, N. B., Sekine, S., Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Gilbert, R. S., Fukuiwa, T., Sata, T., Tashiro, M., Fujihashi, K.	A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging.	Vaccine	30	803-812,	2012

Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y. Fu, S., Hirayama, N., Ohshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y.	Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies Jpn.	J. Infect. Dis.	65	19-27	2012
Eri Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima.	Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A.	Microbiolo gy and Immunology	56	99-106	2012
Chang MO, Suzuki T, Yamamoto N, Watanabe M, Takaku H.	HIV-1 Gag-virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells through IFN- α -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F.	J Innate Immun.	4(5-6)	579-90	2012
Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T.	Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11.	Virus Res.	170	109-117	2012

<p>Li, C., Hatta, H., Burke, D. F., Ozawa, M., Taft, A. S., Das, S. C., Hanson, A. P., Song, J., Imai, M., Wilker, P. R., Ping, J., Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, M., Iwatsuki-Horimoto , K., Russell, C. A., James, S. L., Skepner, E., Maher, E. A., Neumann, G., Klimov, A. I., Kelso, A., McCauley, J., Wang, D., Shu, Y., Tashiro, M., Cox, N. C., Smith, D. J., Kawaoka Y.</p>	<p>Prediction of antigenic drift of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses</p>	<p>Nature (submitted)</p>			<p>2012</p>
<p>Shindo, N., Brown, C., Ciancio, B., Cox, N., Daniel., R., Fasce, R., Fukuda, K., Hay, A., Hayden, F., Hungnes, O., Kelso, A., Klimov, A., Kramarz, P., Lina, B., Meijer, A., Nicoll, A., Phin, N., Opp, M., Schmaltz, C., Schweiger, B., Tashiro, M., Van der Sande, M., Van der Velden, K., Weber, T., Zambon, M., Public health implications of oseltamivir resistance:</p>	<p>Emergence in pre-pandemic influenza A(H1N1) viruses during the 2007-2009 seasons.</p>	<p>Influenza and other respirator y viruses (in press)</p>			<p>2012</p>
<p>Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H.</p>	<p>HIV-1 Suppressive Sequences Are Modulated by Rev Transport of Unspliced RNA and Are Required for Efficient HIV-1 Production.</p>	<p>PLoS One.</p>	<p>7 (12)</p>	<p>e51393</p>	<p>2012</p>

<p>Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System Cook, A. R., Barr, I., Hurt, E., Kelso, A., Reading, R., Ly, S., Seng, H., Buchy, p., Ung, S. A., Shu, Y., Xu, C., Xu, Z., Wang, D., Kama, M., Singh, P., Fujisaki, F., Odagiri, T., Tashiro, M., Archkhawongs, S., Khamphaphongphanh, B., Vongphrachanh, P., Kheong, C. C., Ismail, N., Burmaa, A., Darmaa B., Nymadawa, P., Grangeon, J.-P., Gourinat, A.-C., Huang, Q. S., Lopez, L. D., Juan M Lopez, J. M., Olveda, R. M., Roque, V., Jennings, L., Kang C., Lin, C., Lin, R., and Tee, W. S. N., Balish, A., Corwin, A., Kapella, B. K., Kitsutani, P., McFarland, J., Moen, A., Xu, X., Hoang, V.M.P., Long, N. L., Mai, L. Q., Hang, L. K. N., Nguyen, H. A., Nguyen, T. L., Nguyen, T. N., Asgari, N., Dawainavesi, A., Denehy, E. J., Dominguez, M. N., Jamsran, M., Kasai, T., Kool, J., Lewis, H., Luo, D., Olowokure, B., Partridge, J., Pavlin, B., Samaan, G., Singh, H., Tsuyuoka, R., Vakacegu A., Zhang, Z.</p>	<p>Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organisation, 2006-2010.</p>	<p>PLoS One.</p>	<p>7(5)</p>	<p>e37568</p>	<p>2012</p>
--	--	------------------	-------------	---------------	-------------

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania DallaPozza, Othmer G. Engelhardt	Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards	Biological Sciences	40(1)	96-99	2012
T. Date, T. Kato, J. Kato, H. Takahashi, K. Morikawa, D. Akazawa, A. Murayama, K. Tanaka-Kaneko, T. Satae, Y. Tanaka, M. Mizokami, T. Wakita.	Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.	J Virol,	86(19)	10805-20	2012
Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H.	Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.	J Med Microbiol.	61(Pt 6)	820-9	2012
都築智之, 岩瀬弘明, 島田昌明, 平嶋昇, 日比野祐介, 龍華庸光, 齋藤雅之, 玉置大, 神谷麻子, 横井美咲, 横幕能行, 藤崎誠一郎, 杉浦互, 後藤秀実	当院における HIV, HCV 重複感染症例に対するペグインターフェロン, リバビリン併用療法の治療成績	日本消化器病学会雑誌	109	1186 -1196	2012
山本典生	細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティと GMP	クリーンテクノロジー	22(7)	1-5	2012
山本典生、田代真人	細胞培養インフルエンザワクチン	Bio Clinica, (in press)			2013

Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E.	Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses.	JJID.	66	65-68	2013
Hamamoto, I., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N.	High yield production of influenza viruses in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7.	PLoS One (in press)			2013
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., O. Kiselev, 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., Richit, 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.	H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu.	Nature	493	460 doi:10.1038/nature11858	2013