

杉村 哲、高橋 仁、城内 健太、大塩 木乃  
実、

金山 雅也、田墨 恭子、谷畑 葉子、三浦 裕、  
藤原 大介、山本 典生

L. lactis JCM5805株摂取によるプラズマサ  
イトイド樹状細胞活性化を介したウイルス  
性呼吸器感染症抑制効果の検証

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、  
2013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

なし

##### 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	Quantitative Transmission Electron Microscopy of Sections for the Detection of Viruses, Fungi, Yeasts, Bacteria and Mycoplasmas (200 cell profiles)	No viruses, virus-like particles, mycoplasmas, fungi, yeast, or bacteria
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Bovine polyomavirus (BPyV) in Biological Samples	Negative
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) in Biological Samples	Negative
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Canine Papillomaviruses (COPV, CPV2 and CPV3) and Feline Papillomavirus (FPV) in Biological Samples	No COPV, CPV2, CPV3 or FPV
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Hepatitis type E virus genotypes 3 and 4 in Biological Samples	Negative
EOPC	Oncogenicity in newborn nude mice	Negative

## 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

GMP 準拠使用を目的に品質検証を行った MDCK 細胞株 (MDCK\_NIID) を用いて、臨床検体からのウイルス分離効率を検討した。比較対照に供した従来の MDCK (MDCK\_Conv) とともに、臨床検体接種により高確率でのウイルス分離を確認でき、ウイルス分離用基材としての有用性を示した。しかし、含有ウイルスが微量と推定される臨床検体からの分離効率については、MDCK\_Conv に比して分離率の低下が観察された。本細胞株を用いてのウイルス分離には供試する臨床検体の選定も重要であることも示唆された。

### A. 研究目的

従来の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 GMP 準拠での使用に向けて品質保証された MDCK 細胞株「MDCK\_NIID」を用いて、A/H1N1pdm09 亜型株 (H1pdm)、A/H3N2 亜型株 (H3)、B/Victoria 系統株 (B/Vic)、B/Yamagata 系統株 (B/Yam) 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、当該細胞株のウイルス分離用基材としての有用性を評価した。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞株

ATCC から購入した細胞株 (CCL-34) を無血清培地に馴化させた後、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを作製した (本報告書別項参照)。このセルバンクについて、細胞特性評価、迷入病原体否定試験を実施し、GMP 準拠使用に能う品質が保証されたもの (MDCK\_NIID) 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従来用いられている MDCK 細胞 (MDCK\_Conv) を用いた。MDCK\_NIID の維持は、4mM L-Glutamine 添加 OPTI-Pro SFM 培地 (GIBCO 社) を、MDCK\_Conv の維持には 10%FCS 添加 MEM 培地をそれぞれ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

2011/2012 および 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、B/Yam 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

MDCK\_NIID、MDCK\_Conv それぞれを  $\phi$  60mm ディッシュに  $1.5 \times 10^6$  個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体 50 $\mu$ l と OPTI-PRO SFM 培地 (GIBCO 社) 150 $\mu$ 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°C、5%CO<sub>2</sub> 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、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、およそ 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

MDCK\_NIID および比較対照として 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 患者臨床検体からのウイルス分離においては、どちらの細胞への接種においても、接種後培養上精中の HA 活性確認には盲継代を要した。MDCK\_NIID を用いた場合は、5 検体中 3 検体が 1 回の盲継代で分離を確認できたが、MDCK\_Conv を用いての分離には 5 検体中 4 検体が複数回の盲継代を必要とした。分離後のウイルス HA 価は継代を通じて 32-64 であり両細胞での差異は認められなかった。

H3 分離については、MDCK\_NIID への接種では全ての検体からの分離に盲継代を要した。MDCK\_Conv を用いた場合には分離に盲継代を必要とした検体は 5 株中 3 株であった。分離したウイルスの HA 価は 32-64 を推移し細胞間での差は認められなかった。

B/Vic と B/Yam 系統株は両細胞への初回接種でウイルス分離を確認でき、分離ウイルスの HA 価は 256 以上と比較的高値を示した。

上記で供試した検体に加えて H1pdm 陽性検体からの分離率の追加検討を別途行ったところ、MDCK\_NIID への検体接種ではウイルス分離が確認できたのは 5 検体中 2 検体のみであり、いずれも複数回の盲継代を要した (表 2)。リアルタイム PCR 法でのウイルスゲノム定量の結果から分離できなかった

た検体中のウイルス含量が微量であることとして低い分離率が示された。  
 が原因と推定されたが、同一供試検体全てからウイルス分離ができた MDCK\_Conv に比

表1 臨床検体接種によるウイルス分離効率

A/H1N1pdm (2011/2012)						
細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後 <sup>注1)</sup>	盲継代 2回以上 <sup>注2)</sup>		
MDCK_NIID	5	0	3	2	5	100
MDCK_Conv		0	1	4	5	100

  

A/H3N2 (2011/2012)						
細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	0	4	1	5	100
MDCK_Conv		2	3	---	5	100

  

B/Victoria (2011/2012)						
細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	5	---	---	5	100
MDCK_Conv		5	---	---	5	100

  

B/Yamagata (2011/2012)						
細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	5	---	---	5	100
MDCK_Conv		5	---	---	5	100

注1) 初回接種で分離できた数を含めない。

注2) 1回の盲継代で分離できた数を含めない。

表2 A/H1N1pdm ウイルス分離効率についての追試験

A/H1N1pdm (2010/2011)

細胞株	検体数	分離数			総分離数	分離率
		初回接種	盲継代後 <sup>注1)</sup>	盲継代 2回以上 <sup>注2)</sup>		
MDCK_NIID	5	0	0	2	2	40
MDCK_Conv		3	1	1	5	100

<sup>注1)</sup> 初回接種で分離できた数を含めない。

<sup>注2)</sup> 1回の盲継代で分離できた数を含めない。

#### D. 考察

今回、臨床検体から直接のウイルス分離において、MDCK\_NIID 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。急性期患者から採取される検体のように相応量のウイルス量を含む臨床検体からの分離効率については、従来ウイルス分離に使用されてきた MDCK\_Conv に比較して同等の効率が確認できた。一方でウイルス含量の乏しい検体からのウイルス分離に際しては分離率の顕著な低下が観察され、ウイルス分離に供する検体の選定の必要性が示唆された。

H1pdm と H3 両亜型の分離に際しては、ウイルスの分離確認に至るまでに盲継代を必要とする例が多く存在した。また分離ウイルスの HA 価が 32 程度と低めであり、分離後に追継代を実施した場合でも上昇は認められなかった。この傾向は MDCK\_NIID と MDCK\_Conv でほぼ同様であることからこれから亜型の分離に際し留意すべき事項としてあげられる。

B/Vic と B/Yam 系統については、MDCK\_NIID への臨床検体接種により盲継代を要すことなく高い効率で分離でき、分離ウイルスの HA 価も高値を示していた。MDCK\_Conv を用いた場合に比べ遜色ない結果であり、B 型ウイルスの分離用基材と

しての有用性が確認された。

近年認められている H1pdm や H3 を 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はワクチン製造に際し不利益となり得ることも想定される。高い HA 価を得るための培養条件の検討、改善は今後の課題である。低 HA 価を示す要因を細胞、ウイルスの両面から探索、解明していくことが将来のワクチンシード調製に求められる。

#### E. 結論

GMP 準拠使用に向けて品質検証された MDCK\_NIID について、ウイルス分離用基材として実用可能性が示された。一方でウイルス増殖の確認に盲継代を要す場合があることや相応量のウイルス量を含む検体を選定して分離に供する必要性などは留意すべき事項である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Ainai, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H.

Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda.

“The host protease TMPRSS2 plays a major role for *in vivo* replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.”

Journal of Virology, in press, 2014

## 2. 学会発表

1) Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Akiko Muto, Tadasuke Naito, Seiichiro Fujisaki, Masato Tashiro, Eri Nobusawa

“Development of candidate vaccine virus derived from A/Anhui/1/2013(H7N9) strain.”

Options for the Control of Influenza VIII (Cape Town, South Africa), Sep/2013

2) 中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里

「鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発」

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸

## 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

研究協力者 山本典生

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 室長

**研究要旨** 従来の鶏卵培養法に代わる新しいインフルエンザワクチン製造法として、細胞培養法の開発と実用化が進められている。細胞培養ワクチンの持つ製造コストがかかるという短所を克服し、より迅速なワクチン製造を可能とするためには、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、ウイルスの増殖性に関与する遺伝子を同定し、それを制御または改変することによって、ウイルスの増殖性が高まった新規細胞を開発することを目的として研究を行った。本研究によって、シクロフィリンや P 糖タンパク質がウイルスの増殖を負に制御する因子であり、これらをノックダウンすることによってウイルスの増殖効率が向上することが明らかとなった。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、シクロフィリンや P 糖タンパク質を制御または改変することにより、ウイルスの増殖性が向上した新規の細胞を開発できる可能性がある。このような細胞は、細胞培養ワクチン製造の期間短縮とコスト低減に貢献できると思われる。

### A. 研究目的

新型インフルエンザの大流行に対応するためには、ワクチンを迅速に大量生産することが要求される。鶏卵培養法では、全国民分のワクチンを製造するために 1 年半を要するため、新型インフルエンザへの迅速対応は不可能である。

そこで、時期によらず短期間に大量（半年間で全国民分）の製造が可能な細胞培養ワクチンの開発が進められているが、製造コストがかかるという短所を克服し、より迅速なワクチン製造を可能とするためには、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、それを強制発現、ノックダウン、ゲノム上から削除する等の改変を加えることによって、ウイルスの増殖性が高まった新規細胞を開発することを目的とする。

今年度は、ウイルスの増殖性を変化させる化合物を手がかりに、ウイルスの増殖性に関与する宿主因子を同定し、それに改変を加えることによってウイルスの増殖性を向上させることを試みた。

### B. 研究方法

小規模な化合物ライブラリーをスクリーニングし、PR8 ウイルスの増殖を変化させる化合物を同定した。次に、同定した化合物の標的となる宿主因子が明らかである場



合には、その宿主因子を siRNA でノックダウンしてウイルスの増殖に与える影響を調べた。siRNA のトランスフェクションは 10 nM で行い、siRNA 導入後 48 時間の時点で PR8 ウイルスを MOI=0.01 で感染させた。感染後 24 時間の時点でサンプルを回収し、ウイルス量の定量、遺伝子発現の解析等を行った。

### C. 研究結果

小規模な化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、PR8 ウイルスの増殖を抑制する化合物として、シクロスポリン A (CsA) を同定した。CsA の 50% 抑制濃度は、ヒト由来 A549 細胞においても、イヌ由来 MDCK 細胞においても、ほぼ同程度であった (1~2  $\mu$ M)。一方、CsA と同じく免疫抑制活性と NFAT 阻害活性を持つ FK506 では、PR8 ウイルスの増殖は抑制されなかった。CsA の主要な分子標的として、シクロフィリン A (CypA)、シクロフィリン B (CypB)、P-糖タンパク質 (P-gp) が知られているので、それらに対する siRNA を細胞に導入し、ウイルスの増殖に与える影響を調べた。siRNA を導入した A549 細胞に PR8 を MOI=0.01 で感染させ、24 時間後に培養上清中のウイルス量を測定したところ、ウイルスの増殖効率が增大する傾向が見られた。詳しいメカニズムは不明であるが、これらの結果から、CypA、CypB、P-gp の制御または改変により、ウイルス増殖効率が向上した新規細胞を開発できる可能性が示唆された。

### D. 考察

本研究は、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を開発するために、細胞の改変によるウイルス高増殖性細胞の開発を目的としている。

本研究において、PR8 ウイルスの増殖を抑制する化合物として CsA を同定し、CsA の分子標的をノックダウンすることによりウイルス増殖効率が增大することが明らかとなったが、この結果は意外なものであった。CsA は CypA・CypB のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を阻害する活性を持ち、また P-gp のトランスポーター活性を阻害することが知られており、siRNA を用いて標的蛋白発現量を減少させることによってもウイルス増殖抑制活性が見られると予測していたが、結果は反対であった。以上のことから、(1) CypA、CypB、P-gp はインフルエンザウイルス増殖における負の制御因子であり、(2) CsA によるウイルス増殖抑制は、CypA、CypB、P-gp の機能阻害とは別のメカニズムを含んでいることが推測される。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、CypA、CypB、P-gp を制御または改変することにより、ウイルスの増殖性が高まった新規細胞を開発できる可能性がある。このような細胞は、低増殖性ウイルスの分離・増殖に有用と思われる、また、ワクチン製造の期間短縮とコスト低減にも貢献できると思われる。

### E. 結論

PR8 ウイルスの増殖を変化させる化合物として CsA を同定し、それを手がかりとして、CypA、CypB、P-gp をノックダウンすることによりウイルスの増殖性が高まることが明らかとなった。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、CypA、CypB、P-gp を制御または改変することにより、ウイル

スの増殖性が向上した新規の細胞を開発できる可能性がある。このような細胞は、細胞培養ワクチン製造の期間短縮とコスト低減に貢献できると思われる。

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N.

Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle.

Jpn J Infect Dis. 66(4):276-83, 2013

### 2. 学会発表

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典生

マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生

マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第17回日本ワクチン学会学術集会、三重、2013年11-12月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

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
Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T.	Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population.	Jpn J Infect Dis.	66(6)	549-551	2013
Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan.	Influenza and other respiratory viruses	7(6)	1390-1399	2013
Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y.	Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans.	Nature	26;501(7468)	551-555	2013
Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M.	Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013.	Euro Surveillance	18(15)	20453-20468	2013

K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Ainai, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda.	The host protease TMPRSS2 plays a major role for <i>in vivo</i> replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	Journal of Virology	in press		2014
Ainai A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H.	Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults	Hum Vaccin Immunother.	9(9)	1962-1970	2013
E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro	A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in japan, november to december 2013	Euro surveillance	19(1)	20666	2014
Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N.	Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle.	Jpn J Infect Dis.	66(4)	276-283	2013
Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H.	Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011.	Infect Genet Evol.	18	168-173	2013
Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H.	Genetic analysis of attachment glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan.	Microbiol Immunol.	57(9)	655-659	2013
山本典生、田代真人	新型インフルエンザ	予防接種 Q&A, 小児内科	45増刊号	549-551	2013
Shirakura, M., Kawaguchi, A., Tashiro, M., Nobusawa, E.	The composition of hemagglutinin and neuraminidase affects antigen yield of A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses.	Jpn. J. Infect. Dis.	66	65-68	2013

Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance Response System, Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Yu H, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood P, Lucero M, Roque V Jr, Lee Suy L, Cardon P, Tandoc A 3rd, Olveda RM, Kang C, Young-Joon P, Cutter J, Lin R, Low C, Mai le TQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xiyan X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J.	Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region.	Western Pac Surveill Response J	4(3)	51-59	2013
Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S.	NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL.	Biochem Biophys Res Commun	441(4)	953-957	2013
Kobayashi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tsukagoshi, H., Saitoh, M., Ishioka, T., Yokota, Y., Kimura, H., Tashiro, M., Kozawa, M.	Novel reassortant influenza A (H1N2) virus derived from A(H1N1)pdm09 virus isolated from swine, Japan, 2012.	Emerg. Infect. Dis.	19	1972-1974	2013
Shaw, I., Ciblak, M., Gabriel, G., Guthmann, J.-P., Heinz, F., Kunze, M., Kunze, U., Kyncl, J., Lina, B., Monto, A., Openshaw, P., Osterhaus, A., Prymula, R., Tashiro, M., Essen, T.V., Vanlangendonck, C., Ranst, M.V., Van-Tam, J.N., Wagner, R.	Pandemic Influenza Preparedness: Key findings from a European survey.	Health Policy	submitted		2014

World Health Organization /World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group:Bahl, J., Besselaar, T., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Cox, N., Claes, F., Davis, C.T., Donis, R.O., Fouchier, R.A.M., Guan, Y., Hamilton, K., Jang, Y., Kawaoka, Y., Kelso, A., McCauley, J., Mumford, E., Prajitno, T., Russell, C.A., Smith, D., Smith, G.J.D., Shu, Y., Tashiro, M., Shepard, S., Vijaykrishna, D., Webby, R., Webster, R., Wong, F.	Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses.	Influenza and other respiratory viruses	doi: 10.1111/irv.12230		2014
McKimm-Breschkin, J.L., Williams, J., Barrett, S., Jachno, K., McDonald, M., Mohr, P., Saiito, T., Tashiro, M.	Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase	J. Antimicrobial Chemotherapy.	68(10)	2210-2221	2013
Tsunetsugu-Yokota, Y., KengoNishimura, K., Misawa, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H.L.K., MaiT.Q.Le, Dang, G.T., LongT.Nguyen, Tashiro, M., Kageyama, T.	Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.	J. Clin. Microbiol.	submitted		2014
Fujisaki, S., Imai, M., Takashita, E., Taniwaki, T., Xu, H., Kishida, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tashiro, M., Odagiri, T.	Mutations at the monomer-monomer interface far from the active site of influenza B virus neuraminidase cause reduced susceptibilities to neuraminidase-inhibitor drugs	J. Infect. Chemother	19(5)	891-895	2013
Kuroda M., Niwa, S., Sekizuka, T., Tsukagoshi, H., Yokoyama, M., Ryo, A., Sato, H., Kiyota, N., Noda, M., Kozawa, K., Shirabe, K., Kusaka, T., Shimojo, N., Hasegawa, S., Sugai, K., Tashiro, M., Oishi, M., Ishii, H., Kimura, H.,	Molecular evolution of the VP1 and VP3 genes in human rhinovirus species C	J. Virol.	submitted		2013

Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzaki, Y., Ainai, A., Nakatsu, Y., Nagata, N., Kanou, K., Komase, K., Nobusawa, E., Maenaka, K., Kuroda, M., Hasegawa, H., Kawaokaj, Y., Tashiro, M., Takeda, M.	The host serine protease TMPRSS2 is essential for pathogenicity of influenza A virus	J. Virol.	doi:10.1128/jvi.03677-13			2014
Kageyama, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Tashiro, M.	Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.	J. Virol. Methods	submitted			2013
Sriwilajaroen, N., Magesh, S., Ando, H., Ishida, H., Sakai, M., Ishitsubo, E., Hori, T., Moriya, S., Ishikawa, T., Kuwata, K., Odagiri, T., Tashiro, M., Hiramatsu, H., Tsukamoto, K., Miyagi, T., Tokiwa, H., Kiso, M., Suzuki, Y.	A novel potent and highly specific inhibitor against influenza viral N1-N9 neuraminidases.	Nature Chem. Biol.	submitted			2013
Hamamoto, I., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N.	High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7-like gene.	PLoS ONE	10	1371		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., Kiselev, O., 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.	Avian flu transmission research resumes.	Science	339(6119)	520-521		2013

Barr, I.G., Besselaar, T.G., Cox, N.J., Daniels, R.S., Donis, R., Engelhardt, O.G., Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A., McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C., Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D., Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X., Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013–4)	WHO recommendations for the viruses to be used in the 2013–14 Northern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013.	Vaccine	in press		2014
WHO writing group of consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10–12 July 2013	Consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10–12 July 2013	WER	89	29–34	2014
WHO writing group of WHO external quality assessment programme (EQAP) for influenza viruses by polymerase chain reaction (PCR)	Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013	WER	89	37–44	2014
Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie Yu H, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, McFarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J	Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region.	Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System	4(3)	doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009	2013



Information for WHO Annual Consultation on  
the Composition of Influenza Vaccine  
in the Southern Hemisphere

September 23-25, 2013, Geneva, Switzerland



WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza at Laboratory of  
Influenza Virus Surveillance, Center for Influenza Virus Research,  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

<b>1</b>	<b>Epidemiology</b>	-----	page	3 - 4
<b>2</b>	<b>Influenza A(H1N1)pdm09</b>	-----	page	5 - 14
<b>3</b>	<b>Influenza A(H3N2)</b>	-----	page	15 - 27
<b>4</b>	<b>Influenza B</b>	-----	page	28 - 46
<b>5</b>	<b>Antiviral resistance surveillance</b>	-----	page	47 - 48
<b>6</b>	<b>Serology</b>	-----	page	49 - 66

**Dr Masato Tashiro (Director)**

WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza  
at Influenza Virus Research Center, NIID, Tokyo Japan

**Dr Takato Odagiri (Chief)**

Laboratory of Influenza Virus Surveillance  
Influenza Virus Research Center, NIID

**Dr Noriko Kishida**

**Dr Hong Xu**

**Aya Sato**

**Teruko Doi**

**Hiromi Sugawara**

**Dr Emi Takashita**

**Miho Ejima**

**Dr Seichiro Fujisaki**

**Reiko Ito**

**Mai Miura**

**Dr Masaki Imai**

**Acknowledgement**

Genetic analyses were supported by collaboration with National Institute of Technology and Evaluation, Tokyo, Japan (Dr A. Oguchi, Dr R. Ohshita and Dr N. Fujita). Epidemiological data were provided from Infectious Diseases Surveillance Center at NIID.

We acknowledge NICs in China, Taiwan CDC, Laos Nepal, Myanmar, Mongolia and Viet Nam (HCM), and 76 Local Public Health Laboratories in Japan for sharing clinical specimens and virus isolates.

Nucleotide sequence data of viruses for phylogenetic analyses of HA and NA genes are used from GISAID.

Statistical analyses of HI test results for human serology study were kindly performed by Dr Paul Gargiullo and his team, US-CDC.

## **Epidemiology of the 2012/13 season (until September, 2013)**

### ***Influenza activity from September 2012 to September 2013 in Japan***

- Influenza activity based on the weekly case number per sentinel hospital in the 2012/13 season substantially started since the first week in 2013. The peak of the activity was found at week 4-6 2013 and thereafter declined gradually. The activity at the moment (September 14, 2013) ceased completely and no new case was reported after 1<sup>st</sup> teleconference (Aug 13, 2013) when a few sporadic cases were reported with A(H3N2) virus. Cumulative total case number was estimated 10 million in this season.
- As reported at the time of February VCM, the age distribution of patients was: 5-9 years old (13.8%), 30-39 years old (13.8%), 20-29 years old (11.8%) and 40-49 years old (11.8%).
- As of August 5, 2013, total 6493 influenza A and B viruses were isolated and/or detected by PCR. Of those viruses, the majority was A(H3N2) (76.3%) and B (21.4%) was the second predominant. Only a small number of A(H1N1)pdm09 (2.3%) was detected.
- Of B virus, both B/Victoria- and B/Yamagata-lineage viruses cocirculated and B/Yamagata-lineage viruses (69.8%) predominated over B/Victoria- lineage viruses (30.2%).

### ***Viruses provided by NICs***

- A(H1N1)pdm09 viruses isolated after September 2012 were provided by China (2), Laos (1), Mongolia (4), Nepal (31), Taiwan (1) and VietNam (1).
- A(H3N2) viruses were provided by China (7), Laos (8), Mongolia (4), Myanmar (10), Nepal (5), Taiwan (11) and VietNam (1).
- B viruses were provided by China (1), Laos (31), Nepal (7) and Taiwan (3).
- Antigenic and genetic characterizations of the viruses provided by NICs were performed by WHO CC Tokyo and the data were included in either data package distributed for 1<sup>st</sup> teleconference (Aug 13, 2013), 2<sup>nd</sup> teleconference (Aug 29, 2013) and vaccine composition meeting held in WHO-HQ (Sept 23-25, 2013).

## Countries of Origin of Isolates Collected by NIID

Month of Collection	A(H1N1)pdm09		A(H3N2)		B/Victoria		B/Yamagata	
2011/2012 season viruses (HI-test after Sept.2012)	Laos	1	Laos	6	China	1	Myanmar	1
	Myanmar	7	Myanmar	2	Laos	6	Nepal	3
	Nepal	4	Taiwan	9	Taiwan	1		
	Taiwan	2	Vietnam	1	Vietnam	1		
September, 2012	Japan	1	Japan	18			China	1
	Nepal	12	China	3			Laos	1
			Laos	2			Nepal	7
October, 2012	Japan	1	Japan	15	Laos	3	Japan	1
	Nepal	4	China	4			Laos	1
			Laos	3			Vietnam	1
November, 2012	Japan	5	Japan	30	Japan	11		
	China	2	Laos	1	Laos	2		
Decemder, 2012	Japan	10	Japan	48	Japan	12	Japan	12
					Laos	2	Laos	3
January, 2013	Japan	36	Japan	72	Japan	34	Japan	60
	Laos	1	Laos	1	Laos	4	Laos	2
	Mongolia	3	Mongolia	1				
	Nepal	2	Nepal	2				
February, 2013	Japan	15	Japan	52	Japan	40	Japan	64
	Mongolia	1	Mongolia	3	Laos	4	Laos	2
	Nepal	4	Nepal	2				
March, 2013	Japan	13	Japan	18	Japan	12	Japan	17
	Nepal	9					Laos	1
	Taiwan	1						
	Vietnam	1						
April, 2013	Japan	8	Japan	24	Japan	13	Japan	12
	Vietnam	1	Taiwan	1	Laos	2	Laos	1
					Taiwan	1		
May, 2013	Japan	10	Japan	10	Japan	12	Japan	20
	Taiwan	1	Laos	1	Taiwan	2	Laos	3
			Taiwan	6				
			Vietnam	1				
June, 2013	Japan	3	Japan	5	Japan	3	Japan	8
			Nepal	1				
			Taiwan	4				
July, 2013	Japan	1	Japan	1				
August, 2013								
September, 2013*			Myanmar	10				
<b>Total</b>		<b>159</b>		<b>347</b>		<b>166</b>		<b>221</b>

\* Received 2013.Sept.11, but not available for collection date .