

また、Per.C6 および比較対照としての MDCK\_C を用いて臨床検体からのウイルス分離を行った。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でもウイルスの分離を確認出来なかった。MDCK\_C 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 1 2 検体から 9 株、MDCK\_C への接種により 1 2 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 64-256 と比較的高い値を示していた。MDCK\_C を用いた場合、分離総数は多かったものの、分離ウイルスの継代時に観察される HA 価は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 1 2 検体から 9 株、MDCK\_C への接種により 1 2 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 価は継代を通じて高値を示し、用いた細胞による差異は認められなかった。

また、MDCK-NIID および比較対照としての MDCK\_C を用いて臨床検体からのウイルス分離を行った。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\_C 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 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\_C 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 と細胞間での差は認められなかった。

B/Vic と B/Yam 系統株は両細胞から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。リアルタイム PCR 法でのウイルスゲノム定量の結果から、分離できなかった検体中のウイルス含量が微量であること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\_C に比べて低い分離率が示された。

#### 10)細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

MDCK\_N 、 MDCK-NIID および MDCK\_C 細胞を用いての分離後、10 代目まで継代を行ったウイルスの遺伝子解析を行い、臨床検体中のウイルスの遺伝子配列と比較した。その結果、各細胞で分離・継代されたウイルス株は 10 継代を経ても変異導入が確認されないものがあったが、多くのウイルス株には継代中に HA 遺伝子への変異導入が確認された。同一検体の分離・継代にも関わらず、使用した細胞により変異導入箇所に相違がみられた。また、この変異導入が確認された部位の多くは抗原性やレセプター結合、糖鎖付加に影響するとされる部位であった。一方、NA 遺伝子への変異導入は HA 遺伝子と比較して低頻度

であり、変異導入が確認された部位の一つは糖鎖付加に影響するとされる部位であった。

## 11)細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

### 1. B型インフルエンザウイルスの解析

MDCK\_N、MDCK\_C 両細胞から分離された B/Victoria 系統株の抗細胞由来ウイルス抗血清への反応性を解析したところ、継代 2 代目のウイルスの HI 価は両細胞分離株とも基準ウイルスの反応性と比較して 1/4 程度低い値であった。この HI 価は、両細胞分離株とも継代 10 代目においてもほとんど変化しなかった。

MDCK\_N、MDCK\_C 両細胞より分離された B/Yamagata 系統株を用いた解析では、抗細胞由来ウイルス抗血清に対する反応性は基準ウイルスのそれと同等であり、継代 2 代目と 10 代目のウイルス間の HI 価にも大きな変化は観察されなかった。

### 2. B/Victoria 系統ウイルス HA 遺伝子変異株の解析

HA 遺伝子上の 214T に変異を生じたウイルスに対するフェレット感染抗血清を用い、ホモウイルス抗原の HI 価を基準として解析検体の HI 価を比較したところ、フェレット感染抗血清作製に使用したウイルス株で、HA 遺伝子の 214T に変異が生じる前の継代歴の株の HI 価は 1/2 であった。

同じ MDCK\_N 細胞を用いて基準ウイルスと同時期に臨床検体から分離・継代したその他の B/Victoria 系統株は、いずれも HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、その HI 価の差異は 1/2~1/4 の範囲内であった。他方、MDCK\_N 細胞に用いたものと同一の臨床検体から MDCK\_C 細胞を用

いて分離・継代した B/Victoria 系統のウイルス株は、すべてのウイルスが HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、HI 価の差異は 1/2~1/4 の範囲内であった。

### 3. A(H1N1)pdm09 型インフルエンザウイルスの解析

MDCK\_N 細胞から分離したウイルス株は継代 3~4 代目においては、抗細胞由来ウイルス抗血清に対して基準ウイルスと同等の反応性を示した。これら MDCK\_N 細胞分離株は、その後の継代過程においても多くの場合抗血清に対する反応性に変化は観察されなかったが、いくつかの株では継代 10 代目に抗血清への反応性が基準ウイルスの 1/4~1/16 となった。反応性の低下は用いる抗血清の種類には依存しなかったが、継代 3~4 代目における各ウイルスの反応性と比較した場合、1/8 以下となるものも存在した。

MDCK\_C 細胞分離ウイルスの抗細胞由来ウイルス抗血清に対する反応性は MDCK\_N 細胞分離ウイルス同様、基準ウイルス株の反応性と類似していたが、継代 2~3 代目においても基準ウイルスの反応性と比較した場合、1/8 以下となる株が存在した。また、MDCK\_C 細胞分離ウイルスは継代 10 代目になると、ほとんど全ての株で抗細胞由来ウイルス抗血清に対して、基準ウイルスに対する反応性と比較すると、1/8 以下となる著しい反応性の低下が観察された。

## 12)細胞培養法により分離されたウイルスの増殖能、免疫原性の解析と品質管理試験への影響

### 1. ウイルスの分離効率および増殖能の検

討

簡易診断キットでインフルエンザ陽性が認められ、かつ定量 PCR によって H1N1pdm、H3 型ないしは B 型陽性が認められた鼻腔スワブについて、MDCK 細胞および発育鶏卵を用いてウイルス分離を行った。その結果、H1N1pdm 株では MDCK 細胞では 25/33 例、分離率 76%であったが、発育鶏卵では 13/33 例、分離率 39%であった。H3 型では MDCK 細胞では 16/16 例、分離率 100%であったが、発育鶏卵では 1 例も分離ができなかった。B 型では MDCK 細胞では 16/16 例、分離率 100%であったが、発育鶏卵では 4/16 例、分離率 25%であった。続いて分離株を継代し、増殖能の変化を検討した。その結果、H1N1pdm を 10 代継代した場合に HA 価 512 以上を示した株は、細胞分離株では 17/25 株 (68%) だったのに対し、鶏卵分離株では 5/13 株、38%であった。H3 型では鶏卵で分離できなかったため、細胞培養でのみ継代を行った結果、全ての株で顕著な HA の増加は認められなかった。また B 型では、全ての検体で発育鶏卵の 1 代目には HA 価が認められず、継続的な継代が必要であったのに対し、細胞培養では 1 代目から全ての検体で高い HA 価 (128 以上) が認められた。

## 2. 分離・継代株の性状解析

分離継代した H1N1pdm 株で、高い HA 価を示した延べ 11 検体について、抗原性試験を行った。その結果、試験に用いた抗血清 (X-179A: A/California/07/2009 株由来) に対し、3 検体については 4 環以上の顕著な抗原性の変異が認められた。その一方では、発育鶏卵による繰り返しの継代に関わらず、抗原性の変異を示さなかった株も数株認められた。H3N2 株では細胞で 8 代継代

に成功した 13 株について抗原性を検討したところ、2 環以上の抗原性の変異が認められた株はなく、継代による抗原性への影響が乏しいことが示唆される。なお B 型株の継代による抗原性の変化に関しては、現在検討中である。続いてそれぞれの型・亜型の 2 株ずつピックアップし、細胞培養系での継代による蛋白収量の変化について検討した。その結果、H1N1pdm では継代によっておよそ 1.5 倍程度の蛋白収量の増加が認められたが、H3 株ではほとんど蛋白収量に変化は認められず、B 型に至ってはおよそ 1/2 に減少した。また鶏卵と細胞培養の両方で分離・継代に成功した H1N1pdm および B 型から 1 株ずつ選択し、SRD 試験を行った。その結果、H1N1pdm、B 型ともに、鶏卵で増殖させた抗原に対しては良好な反応性が認められたが、細胞培養系で増殖させた抗原に対しては、顕著な反応性の低下が認められた。このことから細胞培養系で増殖させて製造したワクチンの HA 含有量を SRD 法で測定する場合には、各細胞株および各ワクチン株毎に SRD 抗体を作製する必要があることが示唆される。

## 3. 細胞培養法で製造されたワクチンの免疫原性

### a) H1N1pdm 亜型

細胞培養ワクチンと鶏卵で製造されたワクチンの免疫誘導効果について、マウスを用いて検討した。マウスに細胞もしくは鶏卵で分離・増殖させたワクチンに 2 回接種後、分離株と同じ A/H1N1pdm 株である A/Narita/1/2009(A/N)株とチャレンジし、防御効果ならびに免疫誘導能を検討した。その結果、細胞分離・増殖株と鶏卵分離・増殖株で接種用量依存的な抗体応答が認められた。またここで誘導された抗体応答と

相関して、防御効果が認められた。

#### b) H3N2 亜型

細胞培養ワクチンの免疫誘導能を、マウスを用いて検討した。マウスに細胞培養系で分離・増殖させたワクチンを皮下接種し4週後、血中の抗体応答を検討した。その結果、株の違いおよび継代の違いによる応答性に有意な差は認められなかった。

#### c) B 型

細胞培養ワクチンと鶏卵で製造されたワクチンの免疫誘導効果を、マウスを用いて検討した。マウスに細胞もしくは鶏卵で分離・増殖させたワクチン (BTK179 株) を2回接種後、分離株と同じ BTK179 株をチャレンジし、防御効果ならびに免疫誘導能を検討した。その結果、細胞分離・増殖株と鶏卵分離・増殖株で同等の防御効果が認められた。また接種用量依存的な抗体応答が認められた。

以上の結果は、細胞培養で作製されたワクチンも現行の鶏卵培養ワクチンと同等の効果が得られることを示唆している。

### 13) シードウイルス製造用セルバンクの評価と迷入ウイルス検出系の構築

#### 1) セルバンクの評価について

GMP 基準に準拠した方法で構築した MCB, EOPC について特性試験および安全性試験を行ったところ、実施した全ての試験について特に問題となる点は認めなかった。

#### [MCB]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method

THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

- Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma

Agar Isolation assay と Indicator Cell assay を用いてマイコプラズマ (Agar-cultivable と Non Agar-cultivable の両タイプ) の存在を確認したところ、陰性であった。

- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

結核菌培養用の培地にて 56 日間培養を行ったが、菌の増殖を認めなかった。結核菌は陰性であった。

- Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikit を用いて Isoenzyme の電気泳動における移動度を解析したところ、イヌ由来細胞と同様のパターンを示した。従って、MCB が由来する動物種はイヌと確認できた。

- DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞 DNA を電気泳動し、フィルターに転写してプローブをハイブリダイゼーションした。その後バンドパターンを比較したところ、MCB は標準となる MDCK と同様のパターンを示した。

- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、これまでに報告されている MDCK のパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ

以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

・ Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikitを用いて isoenzyme の電気泳動における移動度の解析を行った。昨年度にも Isoenzyme 試験は行っており、MCB はイヌ由来の細胞からなることが確認されていたが、その時の試験にはコントロールとしての標準 MDCK 細胞が加えられていなかったため、今回これを加えて再試験を行った。4 つの isoenzyme のうち 3 つについてはイヌ由来細胞のパターンを示し、NP については標準 MDCK 細胞と同等の移動度を示した。従って、MCB はイヌ由来の細胞であり、標準 MDCK 細胞と同等であることが確認できた。

・ Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)

細胞培養試料を用いて、マイコプラズマの増殖を抑制する活性があるかについて試験を行ったところ、増殖抑制活性は陰性であった。

・ Quantitative Transmission Electron Microscopy of Sections for the Detection of Viruses, Fungi, Yeasts, Bacteria and Mycoplasmas (200 cell profiles)

透過型電子顕微鏡によって 200 細胞分の解析を行った。その結果、ウイルス、ウイルス様粒子、マイコプラズマ等の細菌、酵母等の真菌類のいずれも認められな

かった。

・ Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Bovine polyomavirus(BPyV) in Biological Samples

MCB から DNA を抽出し、BPyV に対する定量 PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は BPyV 陰性（検出感度 100 copies/reaction）であった。

・ Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) in Biological Samples

MCB から RNA を抽出し、SVDV に対する定量 RT-PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は SVDV 陰性（検出感度 100 copies/reaction）であった。

・ Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Canine Papillomaviruses (COPV, CPV2 and CPV3) and Feline Papillomavirus (FPV) in Biological Samples

MCB から DNA を抽出し、COPV、CPV2、CPV3、FPV に対する定量 PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は COPV、CPV2、CPV3、FPV の全てについて陰性（検出感度は COPV、CPV2、CPV3、FPV のいずれも 100 copies/reaction）であった。

・ Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Hepatitis

## type E virus genotypes 3 and 4 in Biological Samples

MCB から RNA を抽出し、Hepatitis type E virus (genotypes 3 and 4) に対する定量 RT-PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は Hepatitis type E virus (genotypes 3 and 4) 陰性 (検出感度 500 copies/reaction) であった。

## [WCB]

### • Sterility Testing by Direct Inoculation Method

MCB と同様、THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

### • Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma

Agar Isolation assay と Indicator Cell assay を用いてマイコプラズマ (Agar-cultivable と Non Agar-cultivable の両タイプ) の存在を確認したところ、MCB と同様陰性であった。

### • Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

MCB と同様、結核菌は陰性であった。

### • In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

WCB から調製した cell lysate を 3 種類の indicator cell line (MRC-5, Vero, MDCK) の培養系に加え、28 日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

### • Identification & Characterisation of

## Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikit を用いて isoenzyme の電気泳動における移動度を解析したところ、4 つの isoenzyme のうち 3 つについてはイヌ由来細胞のパターンを示したが、NP についてはその範囲から外れるという結果を得た。このアッセイ系においてイヌ由来と判定する基準を精査したところ、2 つのイヌ由来細胞の電気泳動移動度の平均値が使用されていた。そこで再試験において標準となる MDCK の移動度と WCB の移動度を比較したところ、両者は同等の移動度を示した。従って、WCB は MDCK と同等であると確認できた。

### • DNA fingerprinting of cell lines

MCB と同様、WCB も標準となる MDCK と同様のパターンを示した。

### • Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、MCB と同様、これまでに報告されている MDCK のパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

## [EOPC]

### • Sterility Testing by Direct Inoculation Method

THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

### • In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

EOPC から調製した cell lysate を 3 種類の indicator cell line (MRC-5, Vero,

MDCK)の培養系に加え、28日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

- Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures (200 Cell profiles)

電子顕微鏡で観察したところ、ウイルス、ウイルス様粒子、マイコプラズマ、真菌、酵母、細菌は検出されなかった。

- Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay

EOPC 由来の検体からは、逆転写酵素活性は検出されなかった。

- In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using PPK indicator Cells According to 9CFR

EOPC 由来の検体を PPK indicator cell の培養系に加え、少なくとも 21 日間培養した後に、CPE の有無、封入体形成等の異常所見の有無、赤血球吸着活性の有無、抗 Porcine parvovirus 抗体に対する反応性の有無を確認したところ、全て陰性であった。

- Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)

リアルタイム PCR 法 (検出感度 20 copies/reaction) で PCV 由来核酸の有無を調べたところ、陰性であった。

- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Human viruses (FDA PTC and CPMP), Hepatitis A and B19 in biological

samples

リアルタイム PCR 法によって、HAV, HBV, HCV, HIV-1(provirus), HIV-2(provirus), HTLV-I/II(provirus), EBV, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HHV-9, SV40, Parvovirus B19 に由来する核酸の有無を調べた。その結果、全て陰性 (検出限界以下) であった。

- DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞由来 DNA を電気泳動し、フィルターに転写してプローブをハイブリダイゼーションした。その後バンドパターンを比較したところ、MCB は標準となる MDCK と同様のパターンを示した。

- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

結核菌培養用の培地にて 56 日間培養を行ったが、菌の増殖を認めなかった。結核菌は陰性であった。

- In vitro assay for the detection of canine viruses

MDCK 細胞培養試料を、ウイルス感受性細胞 (Primary Canine kidney cells, MDCK cells, BT cells, Crandell Ferine Kidney cells, A72 cells および Vero cells) の培養系に加えた。4 週間培養を行い、CPE 等について観察したところ、試料を加えた群では陰性であった。本試験においては、イヌウイルスの混入を示す所見は認められなかった。

- Test for the presence of inapparent viruses including guinea pigs (CBER Guidance 2006)

細胞培養試料を adult mice, suckling mice, guinea pigs, embryonated eggs に接種し、生存率の比較を行ったところ、陰性コントロールと比べて有意な違いを認めなかった。また、adult mice, suckling mice, guinea pigs については試料接種後に解剖を行い、臓器の状態も含めて確認したが、試料接種群と陰性コントロール群のいずれにも異常は見られなかった。embryonated eggs については、試料接種後に allantoic fluid を回収し、赤血球凝集活性を調べたが、全て陰性であった。以上より、本試験で使用した動物モデルで検出可能な範囲のウイルスについては、MDCK 細胞には混入していないと考えられた。

• Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPRT End-point)

MDCK 細胞(EOPC)を 293 細胞と共培養し 2 代以上継代した後、培養上清を 293 細胞培養系に加えて 3 代継代を行った。培養上清を回収し、RT 活性の有無を FRERT 法によって調べた。その結果、MDCK 細胞(EOPC)と 293 細胞の共培養を行ったものについては、RT 活性は陰性であった。本試験からは、MDCK 細胞(EOPC)から感染性のレトロウイルスが産生されているという所見は認められなかった。

• Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、これまでに報告されている MDCK のパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

• Detection of Viral Contaminants in Bovine Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.

試験細胞の培養液と細胞破砕物を混合し、これを試験試料として BT cell および Vero cell 培養系に加えた。その後、CPE の有無、封入体等の有無、赤血球(chicken, guinea pig, human)吸着の有無、代表的なウシ血清混入ウイルス (bovine adenovirus, bovine parvovirus, bovine respiratory syncytial virus, bluetongue virus, bovine diarrhoea virus, reovirus, rabies virus) に対する抗血清への反応性の有無について調べたところ、いずれも陰性であった。本試験で検出できる範囲においては、ウシ血清に由来する迷入ウイルスの存在は認めなかった。

• MAP Test with LCMV Challenge

MDCK 細胞溶解物をマウスに接種し、その後 16 種類の murine viruses に対する抗体が産生されているかを ELISA 法によって解析した。その結果、いずれのウイルスに対する抗体も産生されていなかった。この結果は、EOPC には 16 種類の murine viruses のいずれもが含まれていないことを示唆している。

• Oncogenicity in newborn nude mice

生後 4 日以内のヌードマウスに EOPC の細胞融解物または DNA を接種し、これらにマウス細胞を腫瘍化させる活性があるかについて解析を行った。

その結果、EOPC の細胞融解物にも DNA にも、細胞を腫瘍化させる活性は認められなかった。炎症等の異常を示した個



体もわずかに存在したが、バックグラウンドとして自然に発生する異常の範囲に収まるものと考えられた。

## 2) 迷入ウイルス検出系の構築について

Primerdesign 社の pathogen detection kit を用いてまずパラインフルエンザウイルス 1 型の検出を行い、感度についての検討を行った。そのためにパラインフルエンザウイルス 1 型を LLC-MK2 細胞にて増殖させ、感染力価を測定し、力価既知のウイルスストックを調製した。検出感度を確認したところ、本キットは 0.1 TCID50/reaction のウイルスを検出することが出来たことから、十分高い感度を持っていると考えられた。同様にパラインフルエンザウイルス 2 型についてもウイルスストックを調製し、検出感度を確認したところ、1 型のキットに比べると低い検出感度であった (10 TCID50/reaction)。スタンダードの核酸は十分に高い感度で検出できていたことから、試験に使用したウイルスの配列とプライマー・プローブの配列にミスマッチがあり、それによって検出感度が低下していると考えられた。

ウイルスの配列は多様性に富むため、ウイルスの配列とプライマー・プローブの配列にミスマッチが生じることは十分あり得ることである。感度の低下をさけるために、このようなミスマッチは極力避けなくてはならない。そこでウイルス遺伝子の中で保存性の高い部分を特定し、そこにプライマー・プローブを設定することとした。

対象とする 22 種類のウイルスのうち 17 種類のウイルス (Parainfluenza viruses, Herpes simplex viruses, Human adenoviruses, Polyomaviruses, Human enteroviruses,

metapneumoviruses, Human rhinoviruses, Respiratory syncytial viruses, Human coronaviruses, Varicella zoster virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Measles virus, Rubella virus, Human hepatitis B virus, Human hepatitis C virus) について、出来るだけ多数の配列情報 (総計 3200 以上の配列) をデータベースから取得し、アライメントを取って保存性の高い領域の絞り込みを行った。次いでその領域に対してプライマー・プローブのデザインを行ったところ、混合塩基での対応が必要な部分もあったが、設定が可能であった。これらについて今後、評価試験を進めていく必要がある。

## 14) 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

1) ノックダウンによってウイルス産生量が増加する I 型 IFN 関連遺伝子群のスクリーニングと同定

A549 細胞において I 型 IFN 誘導性遺伝子群を標的とする 78 種類の siRNA ライブラリー作製し、網羅的にスクリーニングした結果、ノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量が 2 倍以上増加した遺伝子は 23 種類であった。さらに、IPA を用いてパスウェイ解析した結果、23 種類の遺伝子のうち半数以上の遺伝子が RIG-I/IPS-1 経路に関連する遺伝子であることが示唆された。IRF7 をノックダウンするとコントロールに比べて再現性よくウイルス産生量が 2~4 倍増加した。一方、IRF3 をノックダウンしてもウイルス産生量への影響は認められなかった。

2) 同定されたヒト遺伝子に相当するイヌ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定及び siRNA の設計合成

ヒト由来細胞株 A549 を用いた siRNA ライブラリーのスクリーニングから、ノックダウンによってインフルエンザウイルスの増殖効率が向上する遺伝子として IRF7 を同定した。そこでイヌ由来細胞株 MDCK 細胞における IRF7 のクローニングを行った。クローニングした遺伝子の N 末端(〜70 塩基)の塩基配列は難読領域であったため解析不可能であったが、その他の領域はデータベース配列と一致していた。この配列解析結果に基づいて、siRNA の設計と合成を行った。

3) MDCK 細胞への siRNA 導入及びウイルス産生量への影響

イヌ IRF7 に対する 3 種類の siRNA を MDCK 細胞に導入し、PR8 感染後の培養上清中に放出されるウイルス量を定量した結果、A549 細胞と同様に IRF7 をノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量は約 4 倍まで増加した。一方、IRF3 をノックダウンしても A549 細胞と同様にウイルス産生量への影響はなかった。

4) shRNA 安定発現 MDCK 細胞株の樹立

レンチウイルスベクターを用いてコントロール shRNA を発現する MDCK 細胞と、IRF7 に対する shRNA を発現する MDCK 細胞を樹立した。従来の MDCK 細胞、shRNA コントロール細胞、および shRNA\_IRF7 発現細胞に A/Narita/1/2009(H1N1)pdm09 を感染させて、24 時間後の培養上清中に放出されるウイルス RNA 量をリアルタイム PCR 法にて定量した結果、ウイルス産生量がコントロ

ールと比較して約 4 倍増加した。

5) 細胞間におけるウイルス産生量の比較検討

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。

6) 標的遺伝子ノックダウン細胞とコントロール細胞における IFN- $\alpha/\beta$  発現量の解析

ウイルス増殖性改善のメカニズムを調べるため、PR8 を shRNA コントロール細胞および shRNA\_IRF7 発現細胞に感染させ、24 時間後に培養上清中に放出されるウイルス RNA 量と細胞内の IFN- $\alpha/\beta$  発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した。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が、細胞内の IFN- $\alpha/\beta$  産生量は IRF7 をノックダウンした細胞とコントロールで有意な差は認められなかった。

7) ウイルス増殖効率を変化させる化合物の同定と、その標的分子のウイルス増殖機構における機能の解析

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  $\mu\text{M}$ )。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。

15)細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスの開発

[1] RG ウイルスを MDCK 細胞で継代することで、細胞での増殖性が増加した。また継代によりウイルスの HA、NA、PB1、NS1 遺伝子変異が生じた。HA 遺伝子に観察された変異は、MDCK 細胞で継代することによって特異的に発生することが知られている変異であり、アミノ酸配列上宿主受容体との親和性に関与しない部分であった。PB1 と NS1 遺伝子上の変異は継代 10 代目においても 2 種類の塩基の混合状態であった。

[2] Udorn-Ts と 2 種の PR8 株における MDCK-NIID 細胞での増殖性は継代に関わらず高く、継代を繰り返して行ってもその増殖性が安定して高い値を示した。Udorn-Ts に関しては 19 代の継代を行ったが、安定して  $10^8$  pfu/ml 程度の感染価が得られた。2 種の PR8 株については、どちらも 3 代の継代での感染価は  $10^9$  pfu/ml 以上を示した。

Udorn-Ts と 2 種の PR8 株は MDCK-NIID 細胞で 10 代継代したことで遺伝子変異が生じた。Udorn-Ts は 10 継代

の前後で PB1、PA、NP、M1、NS1 に計 5 カ所、HA に 1 カ所の計 6 カ所のアミノ酸置換が認められた。HA 遺伝子に観察された変異はアミノ酸配列上宿主受容体との親和性に関与しない変異であった。PR8-N は PB2、PB1、PA に計 4 カ所と NA に 1 カ所、PR8-41 は PB1、PA、NS1 に計 4 カ所、NA に 1 カ所アミノ酸置換が認められた。

#### D. 考察

(サーベイランス関連の研究)

インフルエンザの流行の動向を把握し適切なワクチン株を選定するには、全世界規模でのインフルエンザ監視体制が不可欠である。そこで、WHO 世界インフルエンザ監視対応システム (GISRS) で世界中から収集した流行株について、WHO インフルエンザ協力センター (感染研インフルエンザウイルス研究センター、米国 CDC、英国立医学研究センター、メルボルンセンター、中国 CDC) が役割分担して抗原性解析、遺伝子解析、薬剤耐性株の検出などを行い、次シーズンの流行予測とそれに基づいた適切なワクチン株の選定を行っている。

感染研は 2010/11、2011/12、2012/13 シーズンにわたって、国内および海外 (中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー、ネパール、ベトナム) からウイルスを収集し、抗原性解析および遺伝子解析を行った。解析結果から、3 シーズンの間に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2) には大きな抗原性の変化は認められなかった。B 型については、2010/11 シーズンは Victoria 系統が流行の主流であったが、2011/12 と 2012/13 シーズンの流行の主流は Yamagata 系統であった。各系統の中では大きな抗原性の変化は認められなかった。

ワクチンの効果について 2010/11、

2011/12、2012/13、2013/14 シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種前後のペア血清を用いて評価を行なったところ、A(H1N1)pdm09については2010/11から3シーズンにわたってワクチン効果を期待できたが、2013/14 シーズンについてはワクチン効果の減弱が懸念されるという結果であった。A(H3N2)ワクチンについては、2010/11 シーズンワクチンについては比較的效果を期待できたが、2011/12、2012/13、2013/14 シーズンワクチンについてはワクチン効果の減弱が懸念され、またB型については、2012/13 シーズンについては比較的ワクチン効果を期待できたが、2010/11、2011/12、2013/14 シーズンはワクチン効果の減弱が懸念されるという結果であった。

どのワクチンにおいても有効性の低下という問題が見られるが、特に深刻なのはH3N2とB型であり、その原因として鶏卵馴化による抗原性の変化が考えられる。H3N2およびB型ワクチンの製造過程におけるHA蛋白の抗原性変化は、孵化鶏卵を使用する限り必ず生じる問題点であり、これを解決するには細胞培養ワクチンの早期導入が必要と思われる。

また、2011/12、2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株についてHAおよびNA遺伝子解析を行った。NA阻害薬感受性試験により薬剤耐性を示すB型インフルエンザウイルス分離株から、NA遺伝子解析により特徴的なアミノ酸置換E105K, Q138R, P139S, G140Rを検出した。NA遺伝子解析により特徴的なアミノ酸置換E105K, Q138R, P139S, G140Rを検出した。plaque-purification法、reverse genetics法により作製したウイルスを用いてNA阻害薬感受性試験を行い、これらのアミノ酸置換が薬剤に対する感受性を低下させるこ

とを確認した。今までに報告されているNA阻害薬耐性アミノ酸置換は全てNAタンパク質の薬剤結合部位およびその近傍に集中している。しかし105, 133, 139, 140番アミノ酸は薬剤結合部位とは大きく離れており、NA分子の隣接部位に位置していた。このことから、これらのアミノ酸置換がNAの四量体構造を不安定にさせ、その結果として薬剤耐性能を獲得させた可能性、また、アミノ酸置換が間接的にNA活性部位の構造を変化させ薬剤耐性能を獲得させた可能性が考えられる。また、臨床検体からは耐性アミノ酸置換を有するウイルスが検出されなかったことから、培養細胞を用いた分離過程で薬剤耐性ウイルスを増幅、あるいは出現させた可能性がある。このことから、薬剤耐性ウイルスを分離株中に検出した場合には、臨床検体中に存在しているのかどうか解析すべきと考える。

また緊急対応として、中国で発生したA(H7N9)ウイルスのリスクを評価するための研究を行った。

A(H7N9)ウイルスの遺伝子解析を行った結果、ヒトに感染および増殖する能力を与えるアミノ酸置換をHA、PB2タンパクに有することが明らかになった。NA遺伝子については、分離されたほとんどのA(H7N9)ウイルスはノイラミニダーゼ阻害薬に対し感受性型のアミノ酸を保持していた。また、HA遺伝子の解析結果からは、鳥に対しては低病原性である可能性が示唆された。

日本人のH7N9ウイルスに対するHI抗体保有状況について赤血球凝集抑制(HI)試験により調査した結果、調べた300人全てのヒトでHI抗体が陰性であった。HI抗体を持たないのは日本人がH7ウイルスに暴露されたことがないためと考えられる。

現時点では、効率的なヒト-ヒト感染は確認されていないが、H7N9 インフルエンザウイルスがヒトへの感染能を高めた場合、H7N9 インフルエンザウイルスに対して、日本人は H7N9 インフルエンザウイルスに対する HI 抗体を持たないことから、全ての年齢層で高い感染リスクがあると考えられる。

また H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析を行ったところ、H7N9 ウイルスを感染させたニワトリは明瞭な臨床症状を示さないことがわかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からはウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。以上の成績は、H7N9 ウイルスがニワトリに対して低病原性であることを示し、感染鶏からのウイルス排泄量も多くないことがわかった。感染鶏からのウイルス排泄量が多くないため、ヒトが H7N9 ウイルスに感染する際の感染源がニワトリである可能性が低いことが示唆された。

#### (細胞培養ワクチン開発に関する研究)

細胞培養ワクチンは、製造に培養細胞を用い発育鶏卵に依存しないことから、(1)何時でも、短期間に大量のワクチン株を増殖させることができる (2)ヒト分離株に由来するワクチン株は、鶏卵に比べて哺乳類細胞で効率よく増殖しやすい (3)発育鶏卵への馴化に伴う遺伝子変異が起こらず、ヒト流行株の抗原性が維持されて有効性が高いことが期待できる (4)閉鎖密閉系での細胞培養系により、ワクチン製剤への細菌汚染のリスクと作業員への感染リスクを最小に出来る等の利点がある。したがって細胞培養ワクチンは、新型インフルエンザに対応するためのワクチンとして非常に有用と

考えられている。

これまでに、ワクチンメーカーによる細胞培養ワクチンの実用化を促進することを目的として「新型インフルエンザワクチン開発・生産体制整備臨時特例交付金」の第2次交付事業が実施されているが、こうした動きに連動し、実用化へのプロセスをさらに加速させるため、本研究では、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集、試験実施における問題点の整理、および解決策の検討を行った。ワクチンメーカーに質問表を送付して承認申請への進捗状況について情報提供を頂き、評価委員によるヒアリングと研究班員・ワクチンメーカーによる WG 会議を厚労省結核感染症課の担当者の同席の下に行った。平成 23 年度には細胞培養ワクチン実用化において各班員に共通する一般的問題点を抽出・整理し、最新情報を元にしてさらに議論を深め、「細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011」としてまとめた。このように各班員共通の問題について班全体で議論し情報を共有することは、プロジェクト全体を推進する上で大きな意味があった。

平成 24~25 年度には、細胞培養 H5N1 インフルエンザワクチンの承認申請に必要な H5N1 野生株を用いた攻撃試験を感染研が実施し、またプロトタイプ申請に必要な異なる亜型のウイルスによる攻撃試験についても、亜型の選定 (H9N2 または H7N9 を選定) とメーカーのワクチン株入手の支援、H9N2 ウイルスおよび H7N9 ウイルスを用いた攻撃試験の基礎検討を行った。

現時点では H7N9 ワクチンの結果は得ら

れていないが、H7N9 ワクチンについてはヒト HLA 分子に対する helper T 細胞エピソードのシグナルが欠如しており、動物実験では免疫原性が認められても、ヒトにおける免疫原性が極めて低いことが示された。従って H5N1 のワクチンに基づく H7N9 ワクチンの剤型、容量についてはプロトタイプの考え方では対処できない可能性がある。また、バイオセーフティーと GMP を両立する施設の立案に資するため、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行い、検討結果を「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対策」としてまとめた。

これまで行ってきた本研究による開発方向への助言、技術指導、攻撃試験実施等の総合的な支援により、実用化に必要なプロセスを効率よく進めることが出来、その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るといふ本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。

また、細胞培養ワクチンの実用化には、ワクチンメーカー側の体制を整備するだけでなく、国立感染症研究所における細胞培養ワクチンシードウイルス製造・供給体制の構築が不可欠である。

海外に依存せず国内だけで細胞培養ワクチン用のシードウイルス製造を行うための基盤を構築するため、GMP 基準に適合した MDCK セルバンクの構築 (MDCK-NIID) を行った。MDCK-NIID についてがん原性試験、迷入ウイルス否定試験、特性試験等を含む 36 の試験を行ったところ、全ての試験で特に問題となる点を認めなかった。従って、MDCK-NIID は、細胞培養ワクチン用シードウイルスの作製に使用可能な品質を備えていると判断された。また、

MDCK-NIID、ノバルティス社浮遊系培養細胞 MDCK\_N、クルーセル社 Per.C6、従来の付着系 MDCK 細胞である MDCK\_C について、ウイルス分離試験と分離ウイルスの性状解析を行った。ウイルス分離効率については、全体的に MDCK 系統の細胞が優れており、Per.C6 は A(H3N2)や B/Vic では成績が良かったものの、A(H1N1)pdm09 で極端に成績が悪かった点が大きな課題と思われた。遺伝的安定性については、細胞ごとに異なるパターンが見られた。これらの変異が観察される時期は株によって異なるが、変異が導入される前のウイルスをシードウイルスとして使用することも可能と思われる。これらの変異が抗原性の変化につながるかについては、今後さらに詳細に解析する必要がある。

これまでに実施した全ての安全性試験・特性試験において特に問題となる点を認めなかったこと、および実用レベルで使用可能なウイルス分離効率を持つことから、MDCK-NIID は臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーシジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのリファレンス株の増殖などに使用することが出来ると考えられた。

安全性とウイルス増殖性を兼ね備えた GMP グレードの MDCK セルバンクは、鶏卵培養によらない細胞培養ワクチンシードウイルス製造の基盤確立へ大きく貢献するものになると言える。鶏卵培養を経ずにシードウイルスを製造することによって、鶏卵馴化に伴う抗原性変異を持たない、より有効性の高いワクチンをより速やかに製造することが可能になると期待される。

## E. 結論

(サーベイランスに関する研究)

・2010/11、2011/12、2012/13 シーズンの間に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2) には大きな抗原性の変化は認められなかった。B 型については、2010/11 シーズンは Victoria 系統が流行の主流であったが、2011/12 と 2012/13 シーズンの流行の主流は Yamagata 系統であった。各系統の中では大きな抗原性の変化は認められなかった。

・ A(H1N1)pdm09 については 2010/11 から 3 シーズンにわたってワクチン効果が期待できていたが、2013/14 シーズンワクチンについてはワクチン効果の減弱が懸念された。A(H3N2)については、2010/11 シーズンワクチンについては比較的効果を期待できたが、2011/12、2012/13、2013/14 シーズンワクチンについては効果の減弱が懸念された。B 型については、2012/13 シーズンについては比較的ワクチン効果を期待できたが、2010/11、2011/12、2013/14 シーズンのワクチンについては効果の減弱が懸念された。

・ B 型インフルエンザウイルスから新規の薬剤耐性アミノ酸置換 E105K, Q138R, P139S, G140R を同定した。薬剤耐性株サーベイランスにおいて留意すべき新たな耐性マーカーを国内外へ発信できた。また、薬剤耐性ウイルスを検出した際には臨床検体についても薬剤耐性ウイルスの有無を解析する必要性を示すことができた。

・新たに発生した A(H7N9)ウイルスは、HA、PB2 タンパク質にヒトへの感染および増殖に関与するアミノ酸置換を持つことが明らかになった。一方、ニワトリにおいてはウイルス排泄量は多くなく、病原性も低かった。日本人は A(H7N9)ウイルスに対する

HI 抗体を持たないこと、および A(H7N9)ウイルスがヒトへの感染能力を獲得していると考えられることから、高いリスクがあると言える。今後も A(H7N9)ウイルスの動向を監視していく必要がある。

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

・本研究によって、ワクチンメーカーによる細胞培養ワクチン実用化を強力に支援し、その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るという本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。

・本研究によって、国際的なハーモナイゼーションの下に国立感染症研究所におけるシードウイルス製造体制の構築、細胞培養ワクチンの品質管理体制の構築を進めることができた。

・シードウイルス製造用細胞としては、国立感染症研究所が独自に構築した GMP グレードの MDCK 細胞 (MDCK-NIID)、ノバルティス社の浮遊系 MDCK 細胞、IRF7 をノックダウンした MDCK 細胞などの有用性が示された。

・細胞馴化に必要な遺伝子変異を解析し導入することで、細胞で高増殖性を示す細胞培養ワクチン用の母体ウイルスベクター開発に応用できる可能性が示唆された。

・ウイルス株・ウイルス亜型によってヒトに対する免疫原性が異なることが示された。従って、プロトタイプワクチンの考え方については、当初の目的通りのモックアップ対応が必ずしも適当でないことが懸念される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(サーベイランスに関する研究)

Nakauchi, M., Ujike, M., Obuchi, M., Takashita, E., Takayama, I., Ohba, K., Konomi, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T., and the working group for influenza virus surveillance in Japan  
Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -sensitive 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay.

J. Med. Virol. 83(7) 1121-1127 2011

Ujike, M., Ejima, M., Anraku, A., Shimabukuro, K., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Oguchi, A., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group for influenza virus surveillance in Japan.

Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010.

Emerg. Infect. Dis. 17 470-479 2011

Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T.

Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice.

Vaccine. 29(46) 8330-8337 2011

藤崎誠一郎、田代真人

インフルエンザの歴史と疫学

呼吸と循環 59(10) 961-971 2011

Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y.

Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. Vaccine 29 4156-4161 2011

Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kunihiisa, 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

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.

Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. J. Influenza.



Other Resp. Virus. 6 1-5 2012

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, Lin JH, Odagiri T, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M,

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

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) 6461-6471 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  
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

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) 336-344 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

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.

Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organisation, 2006-2010.

PLoS One. 7(5) e37568 2012

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T.

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

Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010.

Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System.

PLoS One 7(5) e37568 2012

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

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 away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs.

- J Infect Chemother. 19(5) 891-895 2013
- 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
- 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. EuroSurveill. 18(15) 20453 2013
- Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. J Virol Methods. 188(1-2) 73-75 2013
- 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) 2013
- Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH, 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
- 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, Maille 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

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

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

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

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

Sriwilaijaroen, 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

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.,