

## B. 研究方法

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

最初に、ヒト I 型 IFN 関連遺伝子群 (主に RIG-I/IPS-1 経路、TLR7 経路及び TLR3 経路) を標的とする siRNA ライブラリーを作成し、1 遺伝子に対して標的部位の異なる 3 種類の siRNA を設計合成した。A549 細胞に siRNA を導入し、48 時間後にインフルエンザウイルス PR8 [A/PR/8/34 (H1N1) 株] を MOI=0.01 で感染させた。感染後 24 時間の培養上清中に放出されるウイルス RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にてウイルス量を定量した。標的遺伝子を siRNA でノックダウンした結果、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に関して Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行い、ウイルス産生に重要なシグナル経路を明らかにした。さらに高感度で再現性よくウイルス産生量を有意に増加させる遺伝子を同定した。

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

MDCK 細胞においても再現性を確認するために、同定した遺伝子を ATCC 社由来の MDCK 細胞から RT-PCR 法でクローニングし、翻訳領域の塩基配列を解析し、データベースの塩基配列と比較した。今回決定した塩基配列を基に各遺伝子につき 3 種類の siRNA を設計合成した。

3) MDCK 細胞への siRNA 導入及びウイルス産生量への影響

MDCK 細胞に siRNA を導入し、48 時間後に MOI=0.01 で PR8 を感染させた。感染後 24 時間の培養上清中のウイルス RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にてウイルス産生量を定量し、比較検討した。

4) shRNA 安定発現 MDCK 細胞株の樹立

今回同定した遺伝子のノックダウンによってウイルス産生量が増加することを再確認するために、レンチウイルスベースの shRNA 発現ベクター (U6 promoter により shRNA を発現し、EF1 $\alpha$  promoter によって blasticidin S 耐性遺伝子を発現する) を MDCK 細胞に導入し、shRNA を恒常的に発現する細胞を樹立した。

5) 細胞間におけるウイルス産生量の比較検討

コントロールの MDCK 細胞と標的遺伝子を安定的にノックダウンした細胞株に PR8 (A/H1N1)、A/Narita/01/2009 (H1N1) pdm09、B/Florida/04/2006 (山形系統)、A/Victoria/361/2010 (H3N2) を感染させて、培養上清中に放出されるウイルス産生量を HA アッセイおよびリアルタイム RT-PCR 法によって定量し、比較検討した。

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

標的遺伝子ノックダウン細胞とコントロール細胞に PR8 を感染させ、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 を抽出した。リアルタイム

RT-PCR 法にてウイルス産生量及び IFN- $\alpha$ / $\beta$  産生量を定量し、比較検討を行った。

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、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

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 (Fig. 1)。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 (Fig. 2)。

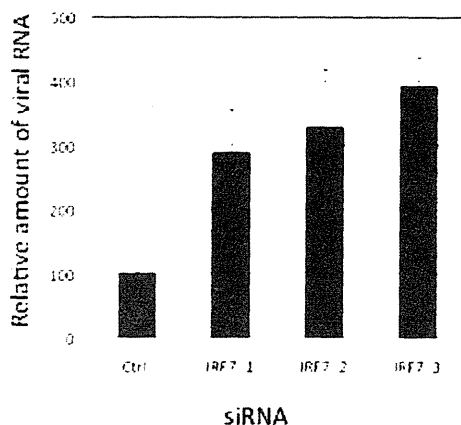


Fig.1 Knockdown of IRF7 increases the production of PR8 virus in MDCK cells.

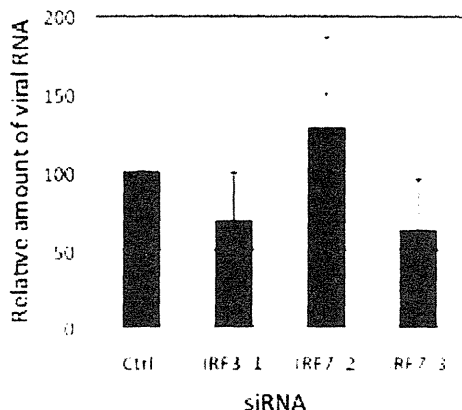


Fig.2 Knockdown of IRF3 does not affect the production of PR8 virus in MDCK cells.

#### 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 (Fig. 3)。

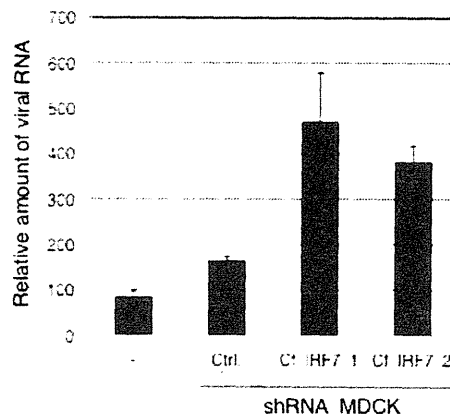


Fig.3 The amount of A/Narita/1/2009 in MDCK cells expressing shRNA IRF7.

#### 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 (Table 1)。

Table 1. Effects of viral production in MDCK cells with stable knockdown of IRF7.

Exp. 1	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

Exp 2	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

#### 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 (Fig. 4A) 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 (Fig. 4B)。

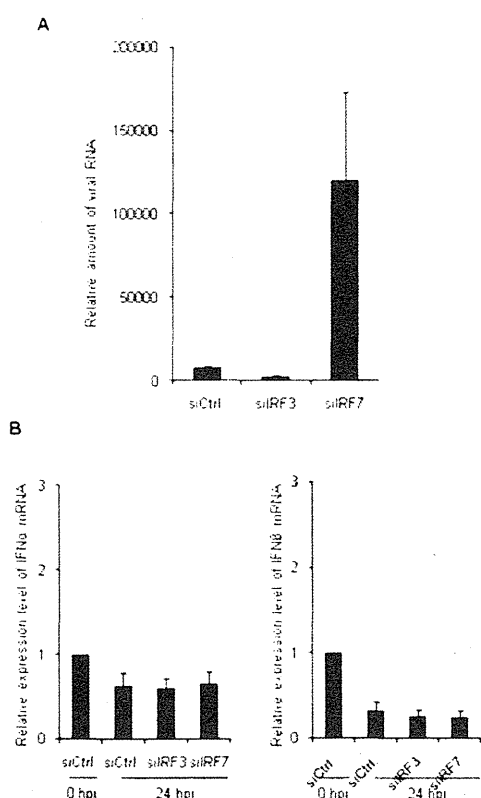


Fig.4 Enhancement of viral propagation in siIRF7 knockdown MDCK cells is not caused by an inhibitory effect on type I IFN induction

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  $\mu$ 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。

まずヒト由来 A549 細胞とヒト IFN 関連遺伝子に対する siRNA ライブラリーを用いて、ノックダウンによりウイルスの増殖効率が

増大する遺伝子を探査し、IRF7 を同定した。次に MDCK 細胞において同じ結果が得られるか検証したところ、MDCK 細胞においても IRF7 をノックダウンするとウイルス量の増加が認められた。しかし PR8 およびその他の野外株を比較すると、HA 蛋白量増加の程度が異なっており、株間で差があると考えられる。また、IRF7 ノックダウンによりウイルスの増殖性が向上したが、I 型 IFN 産生量は影響を受けなかったことから、IRF7 ノックダウンによるインフルエンザウイルスの増殖性向上には I 型 IFN 産生誘導経路とは別の経路が関与していることが示唆された。今後、さらに詳細な解析が必要である。

また、化合物ライブラリーからウイルスの増殖効率を変化させる物質を探査したところ、CsA を同定した。CsA の主要な分子標的として CypA、CypB、P-gp が知られているので、siRNA でそれらをノックダウンしたところ、意外なことにウイルスの増殖効率が増大する傾向が見られた。CsA がウイルスの増殖を抑制する活性を持っていること、および CsA が CypA・CypB のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性と P-gp のトランスポーター活性を阻害することから、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の

細胞を開発できる可能性がある。

本研究により、ウイルスの増殖性を高めるための標的遺伝子として、IRF7、CypA、CypB、P-gp を同定した。これらの遺伝子を制御または改変した細胞は、低増殖性ウイルスの分離・増殖に有用と思われ、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

インフルエンザウイルスの増殖性を高めるための標的遺伝子として、IFN 関連遺伝子の siRNA ライブラリーから IRF7 を同定し、化合物ライブラリーのスクリーニングと結合分子の解析から CypA、CypB、P-gp を同定した。これらの遺伝子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。これらの細胞は、細胞培養ワクチン製造の期間短縮とコスト低減に貢献するものとなるであろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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. PLoS One. 8(3):e59892, 2013

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

Hamamoto I, Yamaguchi N, Ogishima S, Miyaguchi K, Harada Y, Takahashi H, Tashiro M, Yamamoto N. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells. The Fourth ESWI Influenza Conference. 11 September 2011, Malta

Hamamoto I, Yamaguchi N, Ogishima S, Miyaguchi K, Harada Y, Takahashi H, Tashiro M, Yamamoto N. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells. 第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月

Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. 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

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

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、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

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、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

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

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

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
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, A., 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
Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H.	Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010.	Jpn J Infect Dis.	64(3)	237-41	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
山本典生	細胞培養インフルエンザワクチンの開発	化学療法の領域	27(12)	78-84	2011
山本典生	新型インフルエンザ	クリンネス	313	8-9	2011



原田勇一、板村繁之	インフルエンザワクチン	日本臨床	69 (9)	1567-1570	2011
Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W.	Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan.	J Clin Microbiol.	49(3)	1017-24	2011
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
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
Sriwilajaroen 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
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
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.Bio phys. 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

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., 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.	Pause on avian flu transmission research.	Science.	335	400-401	2012
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., 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.	Pause on avian flu transmission studies	Nature	481	443, doi:10.1038/481443a	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- $\alpha$ -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F.	J Innate Immun.	4(5-6)	579-590	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
Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H.	HIV-1 Suppressive Sequences Are Modulated by Rev Transport of Unspliced RNA and Are Required for Efficient HIV-1 Production.	PLoS One.	7(12)	e51393	2012

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. Engelhard	Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards	Biologicals	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)	10805-10820	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)	820-829	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
Y.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)	552-562	2012
Eri Nobusawa,K. Omagari,S. Nakajima,K. Nakajima.	Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A.	Microbiology and Immunology.	56	99-106	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, 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
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., Saito, 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

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
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
Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Yamamoto, K., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T.	Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- $\alpha$ -dependent apoptosis.	Vaccine	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



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
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	細胞培養インフルエンザワクチン	Bio Clinica	28(4)	41-45	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
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

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
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	Eurosurveillance	19(1)		2014
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
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

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 chainreaction(PCR)	Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013	WER	89	37-44	2014
K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzuki, 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
Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzuki, 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

# 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

## 1) ウイルス増殖に使用する細胞株の造腫瘍性とがん原性について

安全性の観点から、ワクチン製造に用いる細胞の造腫瘍性試験は必要であると考えられる。ただし造腫瘍性が明らかになっている細胞については、さらに造腫瘍性試験を行う必要はない。造腫瘍性試験が陽性である場合はがん原性試験も必要である。造腫瘍性試験はワクチン製造使用に許容される最大継代数の細胞 (End-of-production cell, EOPC) に対して行い、がん原性試験は EOPC のライセートと DNA に対して行う。製剤中の残存 DNA 量は 10 ng/dose 以下が必要条件で、できるだけ低いレベルであることが望ましい。ただし 10ng/dose までという上限は、微生物や二倍体又は初代培養細胞からの産物には適用されない。DNA は鎖長が短いほど機能性を失うと考えられるため、残存 DNA の長さについては 200bp よりも短い方がよく、可能であればさらに短い方が望ましい。

## 2) 細胞溶解物 (ライセート・DNA) の安全性について

ワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応 (例えばアレルギー反応等) が生じる可能性があることから、細胞由来成分については可能な限り混入しないよう管理することが必要であろう。細胞由来 DNA の量については、10 ng/dose 以下が必要条件である。他の細胞由来成分については、非臨床試験 (反復投与毒性試験等) や臨床試験を通じて個別のワクチンごとに設定されるべきであろう。

## 3) ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺伝学的・抗原的变化へ与える影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について

ワクチンの有効性及び安全性を確保するという観点から、ワクチン株が細胞での継代で安定であることを確認する必要があると考えられる。具体的には、特異的