九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

2013/14年流行期に患者より分離されたインフルエンザA/H1N1pdm09, A/H3N2, Bウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子と薬剤感受性との関連についての検討

池松, 秀之
久留米臨床薬理クリニック

鄭, 湧
九州大学大学院医学研究院病態修復内科（第一内科）

白根, 健次郎
九州大学生体防御医学研究所ゲノム機能制御学部門エピゲノム制御学分野

藤, 英博
九州大学生体防御医学研究所ゲノム機能制御学部門エピゲノム制御学分野

他

https://doi.org/10.15017/1543581

出版情報：福岡醫學雜誌. 106 (8), pp.231-239, 2015-08-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

原　　著

2013/14 年流行期に患者より分離されたインフルエンザ A/H1N1pdm09, A/H3N2，B ウイルスのノイラミニダーゼ遺伝子と薬剤感受性との関連についての検討

[1)]久留米臨床薬理クリニック
[2)]九州大学大学院医学研究院 病態修復内科（第一内科）
[3)]九州大学生体防御医学研究所 ゲノム機能制御学部門 エピゲノム制御学分野
[4)]九州大学病院 検査部
[5)]九州大学大学院医学研究院 臨床検査医学

池松秀之[1)]，鄭　湧[2)]，白根健次郎[3)]，藤　英博[3)]，佐々木裕之[3)]，古賀　結[4)]，松本信也[4)]，堀田多恵子[4)]，内海　健[4)5)]，康　東天[4)5)]

Analysis of the Neuraminidase Amino Acid Sequences of Influenza A/H1N1pdm09, A/H3N2, and B Viruses Isolated from Influenza Patients in the 2013/14 Japanese Influenza Season

Hideyuki Ikematsu[1)], Yong Chong[2)], Kenjiro Shirane[3)], Hidehiro Toh[3)], Hiroyuki Sasaki[3)], Yui Koga[4)], Shinya Matsumoto[4)], Taeko Hotta[4)], Takeshi Uchiumi[4)5)] and Donchon Kang[4)5)]

[1)]Kurume Clinical Pharmacology Clinic, Kurume, Japan
[2)]Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan
[3)]Division of Epigenomics and Development, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan
[4)]Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan
[5)]Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Abstract

Background : Neuraminidase (NA) is an essential surface protein for influenza virus replication. NA inhibitors are commonly used for the treatment of influenza patients in Japan. Several mutations that reduce the effect of NA inhibitors have been reported. We sequenced the whole NA segment of isolated virus from influenza patients and investigated the relation between the NA amino acid sequence and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of four NA inhibitors.

Materials and Methods : A total of 20 viruses that showed high or low IC_{50} of NA inhibitors were selected from A/H1N1pdm09, A/H3N2, and B isolates from the viruses isolated from patients in the 2013-14 influenza season.

Viral RNA was extracted and RT-PCR was done. The amplified genome was sequenced using a "next generation sequencer", and the deduced amino acid sequences were analyzed.

Address correspondence : Hideyuki Ikematsu
Kurume Clinical Pharmacology Clinic
Kurume University School of Medicine, Building B67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka, 830-0011, JAPAN
Tel : + 81-92-435-1150　Fax : + 81-92-435-1151　E-mail : ikematsu@gray.plala.or.jp

Results : Two A/H1N1pdm09 viruses that showed very high IC_{50} for oseltamivir (150 nM and 130 nM) contained the H275Y mutation. Otherwise, no significant relation was found between the NA amino acids and the IC_{50} of the four NA inhibitors. There was no significant relation between the NA amino acids and the IC_{50} of the four NA inhibitors for A/H3N2 viruses. The B viruses that showed a high IC_{50} for oseltamivir and laninamivir shared some amino acids. The B viruses that showed a high IC_{50} of zanamivir and peramivir also shared some amino acids. They were different from the shared amino acids found for oseltamivir and laninamivir.
Conclusion : The previously reported H275Y mutation that causes oseltamivir resistance was found in the two A/H1N1pdm09 viruses that showed a very high IC_{50} for oseltamivir. No additional NA amino acid sequences related to the IC_{50} of the four NA inhibitors was found. The meaning of the shared amino acids among B viruses that showed a high IC_{50} would be an interesting target for further investigation.

Key words : Influenza, Neuraminidase, Sequence, IC_{50}

はじめに

インフルエンザウイルスの流行は毎年繰り返されており，その流行は社会に大きな影響を与えるだけでなく，時に重症化や脳症あるいは肺炎の合併により死亡例もみられる．日本では，インフルエンザの治療にノイラミニダーゼ（neuraminidase，NA）のシアル酸への結合部位を阻害するNA 阻害薬が臨床で一般的に使用されている．NA 阻害薬として，ザナミビル水和物（商品名：リレンザ，以下ザナミビル），オセルタミビルリン酸塩（商品名：タミフル，以下オセルタミビル），ペラミビル水和物（商品名：ラピアクタ，以下ペラミビル），ラニナミビルオクタン酸エステル水和物（商品名：イナビル，以下ラニナミビル）の4剤が，世界で唯一使用されている．

NA 阻害薬耐性が最初に問題になったのは，2007年より出現した，NA にオセルタミビル耐性となる H275Y 変異を持つ A/H1N1（ソ連型）で，2008/09 年流行期に日本で分離された A/H1N1 も H275Y 変異があり，A/H1N1 の感染者ではオセルタミビルの臨床効果が低下していたことが確認されている[1)2)]．

A/H1N1pdm09 においても NA の H275Y 変異によりオセルタミビル耐性となることが報告されており，2013/14 年流行期には A/H1N1pdm09 においてオセルタミビルへの感受性を低下させる変異をもつウイルスが日本でも検出され，注目を集めた[3)]．また，A/H3N2 や B でも，*in vitro* で NA 阻害薬への感受性低下を示す NA の変異が知られており，NA 阻害薬耐性についてのサーベイランスが世界で行われている[4)5)]．しかし，感受性試験にオセルタミビルとザナミビルを用いた報告が多いが，現在日本でしか臨床で一般的に用いられていないラニナミビルについて，その感受性と NA 遺伝子との関連についての検討は少ない．

著者らは，既に 2011/12 年度と 2012/13 年度に分離されたそれぞれ 48 株の A/H3N2 について，NA の全領域の遺伝子を解析し，NA のアミノ酸（Amino Acid, AA）変異と薬剤の感受性との関連について報告した[6)]．その成績では NA の活性部位にみられた変異は1つのみで，活性部位以外の部位に NA 阻害薬の感受性の指標である IC_{50} 値に大きな影響を与えていると推定される変異はみられなかった．また，NA の B 細胞および T 細胞エピトープには変異がみられ，ワクチン株のアミノ酸配列との比較から，それらの変異が宿主の免疫から逃れるために有用である可能性が考えられた．今回，2013/14 年流行期に分離された A/H1N1pdm09，A/H3N2，B の NA 全領域の遺伝子を解析し，各株にみられる変異の有無を観察し，NA 阻害薬の感受性と関連するアミノ酸変異がないかについて検討した成績を報告する．

対象と方法

対象株

NA 阻害薬のひとつであるラニナミビルの市販後調査として厚生労働省に届けられた計画に従い，患者からのウイルス分離を行い，ウイルスの薬剤感受性についての検討を継続している[7)~10)]．その調査において 2013/14 年流行期に全国 23 の参加医療機関から送られた臨床検体より MDCK 細

胞を用いてインフルエンザウイルスを分離した．薬剤感受性の指標として，各臨床分離株の NA 阻害薬 4 剤（オセルタミビル，ザナミビル，ペラミビル，ラニナミビル）の NA 活性 50% 阻害濃度（50% inhibitory concentration, IC_{50}）を fluorescence-based neuraminidase inhibition assay により測定した[7]．2013/14 年の分離株より，A/H1N1pdm09，A/H3N2，B それぞれについて，4 剤の IC_{50}が高いほうから 10 株，低い方から 10 株を選び，解析の対象とした．

NA 遺伝子

A/H1N1pdm09 および A/H3N2 ウイルスでは，RNA 抽出後，Zhou らの報告した 8 分節共通の Universal primer を用いて RT-PCR を施行した[11]．B ウイルスでは，Zhou らの報告した primer set を用いて RT-PCR を施行した[12]．

PCR 産物を材料として，シーケンサー MiSeq（Illumina, San Diego, CA）を使用し，Illumina の提供する手順に従い塩基配列を決定した．概略は，アンプリコンの濃度調整後，トランスポゾンによる断片化，タグメンテーションにより，DNA 断片ライブラリーを作成，MiSeq によるシークエンス，出力データの解析により塩基配列を決定し，AA 配列を推定した．

得られた AA 配列の alignment とコンセンサス配列（consensus sequence）の作成を web 上に公開されているソフトウェア MEGA6.0 を用いて行った．AA 配列にみられた変異については，catalytic site（catalytic residue と framework residue）だけでなく[13]，B 細胞および T 細胞エピトープ[14)15)] を含め，全 NA 配列について行った．

結　　果

A/H1N1pdm09 の NA と IC_{50}

A/H1N1pdm09 20 株の AA 配列のコンセンサス配列と比較して変異が認められた各株の部位を Table1 にオセルタミビルの IC_{50}が高い株より示した．469 の AA 中 22ヶ所に差異がみられた．NA の catalytic site（catalytic residue と framework residue）では，H275 の部位に 2 株で変異が認められたが，それ以外に変異はみられなかった．オセルタミビルの IC_{50}が 150nM および 130nM と著しく高い 2 株は，H275 が Y275 となっていた．H275Y 変異をもつ 2 株のペラミビルの IC_{50}は他の株より 10 倍以上高かった．この H275Y 以外には，この 2 株に共通で他の株と異なるアミノ酸はみられなかった．catalytic site 以外に株間で複数の変異がみられたが，4 つの NA 阻害薬の IC_{50}の高低に強く関与すると推定される AA 配列をみいだすことは出来なかった（Table 1）．

A/H3N2 の NA と IC_{50}

A/H3N2 20 株の AA 配列のコンセンサス配列と比較して差異が認められた部位における AA を Table 2 にラニナミビルの IC_{50}が高い株より示した．468 AA 中 22ヶ所に差異がみられた．NA の catalytic site では 1 株に 151 番目が N となる変異がみられた以外に変異はみられなかった．catalytic site 以外に株間で複数の変異がみられたが，4 つの NA 阻害薬の IC_{50}の高低に強く関与すると推定される AA 配列をみいだすことは出来なかった．B 細胞のエピトープとされる 369 番目の AA は 1 株が T で，他の 19 株は全て K であった．

B の NA と IC_{50}

B 20 株の AA 配列のコンセンサス配列と比較して変異が認められた部位の AA を，オセルタミビルの IC_{50}が高い株より Table 3 に示した．また，ラニナミビル，ザナミビル，ペラミビルの IC_{50}が高い株より，コンセンサス配列と比較して変異が認められた部位の AA をそれぞれ Table 4，Table 5，Table 6 に示した．

466 の AA 中 22ヶ所にコンセンサス配列からの変異が認められたが，これらは全て NA の catalytic site 以外で，catalytic site には変異はみられなかった．22 のコンセンサス配列からの変異の中で，4 つの変異（K125N，K219N，N329D，E404K）がオセルタミビルの IC_{50}が高い方から 4 株に（Table 3），ラニナミビルの IC_{50}が高い方から 3 株にみられた（Table 4）．

別の 3 つのコンセンサス配列からの変異（P42Q，R186K，D392E）が，ザナミビルの IC_{50}が高い方から 4 株に（Table 5），ペラミビルの IC_{50}が高い方から 3 株にみられた（Table 6）．

Table 1 Comparison of amino acid sequences of A/H1N1pdm09 viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	40	41	80	82	86	95	105	117	141	201	253	263	269	275	286	339	364	386	397	419	430	451	IC_{50}, nM			
Consensus	I	G	V	S	A	S	S	I	N	G	Y	I	M	H	S	S	S	K	N	R	R	D	Laninamivir	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
DS4-549	L	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	–	2.2	150	1.0	19
DS4-371	L	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Y	N	P	–	N	–	–	–	G	2.3	130	0.77	12
DS4-463	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	2.5	1.0	1.8	0.52
DS4-482	–	–	–	–	–	–	–	M	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.8	0.99	1.9	0.66
DS4-117	–	–	–	–	–	N	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	2.3	0.97	1.3	0.45
DS4-349	L	V	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	–	P	–	N	–	–	Q	G	2.7	0.95	1.8	0.44
DS4-216	–	–	–	–	–	N	–	–	–	R	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	2.0	0.87	1.4	0.39
DS4-50	L	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	P	–	N	–	–	–	G	2.3	0.83	1.0	0.52
DS4-135	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.3	0.68	0.86	0.30
DS4-66	L	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	2.1	0.65	0.92	0.38
DS4-321	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.4	0.64	0.97	0.29
DS4-257	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	0.63	0.94	0.29
DS4-324	L	–	–	P	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	K	–	–	–	1.3	0.61	0.94	0.29
DS4-334	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.3	0.60	1.4	0.30
DS4-134	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	0.60	0.81	0.29
DS4-138	–	–	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.0	0.57	0.80	0.29
DS4-245	L	–	–	P	–	–	–	–	–	–	–	V	V	–	–	–	–	N	K	–	–	–	1.3	0.57	0.78	0.23
DS4-336	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	0.54	1.1	0.30
DS4-337	L	–	–	P	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	K	–	–	–	1.3	0.53	1.2	0.29
DS4-212	–	–	M	–	–	–	–	–	–	–	H	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.83	0.29	0.91	0.45

Table 2 Comparison of amino acid sequences of A/H3N2 viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	27	30	44	57	81	126	147	148	151	155	221	251	267	309	315	338	369	370	372	387	412	434	IC_{50}, nM			
Consensus	A	I	S	I	P	P	N	T	D	Y	D	D	T	D	S	L	K	S	S	N	V	T	Laninamivir	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
DS4-182	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	I	–	5.9	0.7	1.6	0.6
DS4-35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	L	–	I	–	5.7	1.5	2.6	0.9
DS4-218	–	–	–	–	–	–	D	–	–	F	E	V	–	–	G	–	–	–	–	–	–	–	5.3	0.6	2.2	0.5
DS4-14	T	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.9	1.5	2.5	1.1
DS4-187	–	–	T	–	–	–	–	–	–	F	E	V	–	–	G	–	T	–	L	K	–	–	4.9	0.6	2.5	0.7
DS4-524	–	–	T	–	–	–	D	–	–	F	E	V	–	–	G	–	–	–	–	K	–	–	4.8	0.8	2.8	0.7
DS4-33	–	–	T	–	–	–	–	–	–	F	E	V	–	–	G	–	–	–	L	K	–	–	3.9	0.8	3.0	0.8
DS4-359	–	–	T	–	–	–	–	–	–	F	E	V	–	–	G	–	–	F	–	K	–	–	3.9	0.9	2.7	0.7
DS4-427	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	W	–	–	–	–	–	–	3.8	0.8	2.6	0.8
DS4-503	–	–	–	–	–	–	D	–	–	F	E	V	–	–	G	–	–	–	–	–	–	–	3.8	0.7	3.5	0.9
DS4-189	–	L	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	2.8	0.9	1.9	0.7
DS4-475	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	K	–	–	W	–	–	–	–	–	–	2.7	0.8	2.6	0.8
DS4-244	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	K	–	–	W	–	–	–	–	–	–	2.6	0.6	1.6	0.5
DS4-136	–	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	A	2.5	0.6	1.1	0.5
DS4-145	–	L	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	2.5	0.7	1.3	0.6
DS4-354	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	N	–	–	–	–	L	K	I	–	2.4	0.8	2.4	0.8
DS4-9	T	–	–	–	I	–	D	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.2	0.7	1.9	0.6
DS4-181	–	L	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	2.2	0.5	1.9	0.6
DS4-261	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	I	–	2.2	0.9	1.6	0.7
DS4-497	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	2.2	0.7	2.4	0.7

Table 3 Comparison of amino acid sequences of B viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	27	42	57	60	65	106	107	125	186	219	272	320	329	339	340	358	392	404	463	464	465	466	IC_{50}, nM
consensus	L	P	A	V	R	T	K	K	R	K	K	E	N	S	N	A	D	E	D	M	V	L	Oseltamivir
DS4-538	–	–	T	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	43
DS4-41	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	–	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	34
DS4-42	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	34
DS4-146	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	28
DS4-110	–	–	–	–	–	–	N	N	–	N	E	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	24
DS4-30	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	A	–	22
DS4-31	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	21
DS4-508	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	21
DS4-239	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	19
DS4-147	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	I	–	–	18
DS4-465	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	Q	18
DS4-188	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	18
DS4-124	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	F	D	–	–	–	–	–	–	–	18
DS4-318	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	N	–	–	–	16
DS4-529	S	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	15
DS4-322	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	14
DS4-515	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	13
DS4-243	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	11
DS4-246	S	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	10
DS4-118	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	9.8

Table 4 Comparison of amino acid sequences of B viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	27	42	57	60	65	106	107	125	186	219	272	320	329	339	340	358	392	404	463	464	465	466	IC_{50}, nM
consensus	L	P	A	V	R	T	K	K	R	K	K	E	N	S	N	A	D	E	D	M	V	L	Laninamivir
DS4-41	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	–	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	26
DS4-42	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	26
DS4-538	–	–	T	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	23
DS4-30	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	A	–	22
DS4-465	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	Q	21
DS4-31	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	21
DS4-188	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	20
DS4-508	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	20
DS4-239	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	19
DS4-124	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	F	D	–	–	–	–	–	–	–	19
DS4-146	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	11
DS4-110	–	–	–	–	–	–	N	N	–	N	E	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	11
DS4-529	S	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	10
DS4-515	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	10
DS4-322	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	9.9
DS4-318	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	N	–	–	–	9.7
DS4-118	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	9.7
DS4-243	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	9.5
DS4-246	S	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	9.1
DS4-147	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	I	–	–	7.8

Table 5 Comparison of amino acid sequences of B viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	27	42	57	60	65	106	107	125	186	219	272	320	329	339	340	358	392	404	463	464	465	466	IC_{50}, nM
consensus	L	P	A	V	R	T	K	K	R	K	K	E	N	S	N	A	D	E	D	M	V	L	Zanamivir
DS4-31	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	17
DS4-508	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	15
DS4-239	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	13
DS4-30	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	A	–	12
DS4-465	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	Q	12
DS4-188	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	10
DS4-515	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	9.3
DS4-529	S	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	8.5
DS4-322	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	8.5
DS4-124	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	F	D	–	–	–	–	–	–	–	8.3
DS4-42	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	8.1
DS4-41	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	–	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	7.4
DS4-318	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	N	–	–	–	7.4
DS4-243	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	7.1
DS4-246	S	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	6.9
DS4-118	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	6.2
DS4-538	–	–	T	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	6.0
DS4-147	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	I	–	–	5.7
DS4-110	–	–	–	–	–	–	N	N	–	N	E	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	5.6
DS4-146	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	4.6

Table 6 Comparison of amino acid sequences of B viruses in the 2013/14 influenza season.

AA position	27	42	57	60	65	106	107	125	186	219	272	320	329	339	340	358	392	404	463	464	465	466	IC_{50}, nM
consensus	L	P	A	V	R	T	K	K	R	K	K	E	N	S	N	A	D	E	D	M	V	L	Peramivir
DS4-31	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	4.5
DS4-30	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	A	–	4.5
DS4-508	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	4.4
DS4-42	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	4.2
DS4-188	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	4.0
DS4-538	–	–	T	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	T	–	K	–	–	–	–	3.3
DS4-465	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	Q	3.2
DS4-515	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	3.0
DS4-41	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	–	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	2.9
DS4-124	–	Q	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	F	D	–	–	–	–	–	–	–	2.7
DS4-110	–	–	–	–	–	–	N	N	–	N	E	–	–	–	–	–	–	K	–	–	–	–	2.7
DS4-529	S	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	2.6
DS4-246	S	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	2.6
DS4-118	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	2.5
DS4-146	–	–	–	–	–	–	–	N	–	N	E	–	D	–	–	–	–	K	–	–	–	–	2.5
DS4-322	–	Q	–	–	H	–	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	2.4
DS4-318	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	N	–	–	–	2.4
DS4-243	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	2.4
DS4-147	–	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	K	–	–	D	–	–	–	–	I	–	–	2.4
DS4-239	–	Q	–	–	–	I	–	–	K	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	–	–	–	2.4

さらに別の 3 つのコンセンサス配列からの変異（V60A，E320K，N340D）が，ラニナミビルの IC_{50}が低い方から 5 株に多くみられ（Table 4），オセルタミビルの IC_{50}が低い 4 株にも多くみられた（Table 3）．一方，これら 3 つの変異は，ザナミビルの IC_{50}が低い株やペラミビルの IC_{50}値が低い株に集中する現象はみられず，ザナミビルの IC_{50}が低い株やペラミビルの IC_{50}値が低い株に集中する AA 変異もみられなかった（Table 5, 6）．

考　　察

インフルエンザの治療に NA 阻害薬が日常的に使用されている日本では，耐性ウイルスの出現は治療薬の選択に重要な問題となる．2013/14 年流行期に日本では，A/H1N1pdm09 の中にオセルタミビル耐性となるウイルスが出現し注目を集めた．分離された A/H1N1pdm09 の 4% 程度に H275Y 変異がみられたと国立感染症研究所から報告されている[3]．著者らが実施しているサーベイランスでは，2013/14 年流行期に A/H1N1pdm09 のなかにオセルタミビルおよびペラミビルの IC_{50}が上昇したウイルスが 2 株分離された[10]．この IC_{50}が上昇した 2 株の NA のアミノ酸配列が今回解析され，H275Y 変異が，オセルタミビルおよびペラミビルの IC_{50}上昇の原因であることが確認された（Table 1）．A/H1N1pdm09 において，その他の NA の catalytic site には変異はみられず，catalytic site 以外の変異にも各 NA 阻害薬の IC_{50}に有意な影響を与えていると考えられる変異はみられず，A/H1N1pdm09 においては，H275Y 変異以外の耐性遺伝子の出現やその集積が起こっているとは考えられなかった．

A/H3N2 では，catalytic site に E119V，R292K 変異が起こると，NA 阻害薬の耐性化が起こることが報告されている[4]．しかし，それらの変異は 2013/14 年の A/H3N2 分離株にはみられなかった．NA の catalytic site では，D151N の変異を有するウイルスが 1 株検出された以外に変異はみられなかった（Table 2）．D151N 変異については，MDCK 細胞を用いた培養中に起こるもので，実際の流行株ではみられないとの報告がある[16]．このウイルスが分離された患者の臨床検体からのシークエンスは実施されていないため，この点については不明であるが，2011/12 年度に分離された 48 株中 1 株，2012/13 年度に分離された 48 株中 4 株に D151N 変異がみられており，MDCK 細胞を用いた培養中に起こるものである可能性は充分高いと思われた．しかし，D151N 変異がみられた株の 4 つの NA 阻害薬の IC_{50}は，他の株の IC_{50}と有意な差はなく，この変異が NA 阻害薬の感受性に影響しているとは考えにくかった．NA の catalytic site 以外に 21 の部位に変異がみられ，それぞれの変異について IC_{50}値との関連を検討したが，IC_{50}に臨床効果に影響を与えると考えられるような程度の差はみられず，A/H3N2 では NA 阻害薬の感受性低下に関連する NA の変異は 2013/14 年の分離株には出現していないと考えられた．

catalytic site 以外の変異の中で，T 細胞のエピトープとされている AA93 部位について，ワクチン株は 2011/12 年度は D93，2012/13 年度と 2013/14 年度は G93 で，2013/14 年度の分離株は全て G93 となっており，ワクチン株と同じアミノ酸であった．宿主の免疫の主たる標的となる HA では，ワクチンから逃れるようなアミノ酸変異がしばしばみられるが，今回，前回の報告の成績や，ワクチン株の NA 部分との比較した範囲では，NA にワクチンによってもたらされる免疫から逃れるために作用していると考えられるような変異は確認出来なかった．

一方，B 細胞のエピトープである AA369 では，ワクチン株が 2011/12 年度が K369，2012/13 年度と 2013/14 年度は T369 であったが，臨床分離株では T369 が 2011/12 年度が 48 株中 7 株，2012/13 年度は 48 株中 14 株みられていた[6]．2013/14 年度は 20 株中 1 株のみで，残りの株は K369 であった．この K369 の増加にはワクチン株の T369 からのエスケープに関与している可能性も考えられる．インフルエンザウイルスの流行株形成については，HA 領域の変異だけでなく，NA 領域における変異の継続した観察によっても有用な情報が得られる可能性があると思われる．

B 型ウイルスにおいて，A/H1N1pdm09 の H275Y 変異に相当する H273Y 変異が，オセルタミビルとペラミビルの IC_{50}の著しい上昇を起こすことが知られている[4)5)]．今回 2013/14 年の B には H273Y 変異はみられなかった．これまでも

臨床分離株でこの変異の検出は報告されておらず，Bにおいてこの変異は自然界では起こりにくいのかも知れない．

今回の20株のBのNAアミノ酸配列では，オセルタミビルとラニナミビルのIC_{50}が高い株に集中するアミノ酸配列が4ヶ所，IC_{50}が低い株に集中するものが3ヶ所みられた（Table 3, 4）．一方，ザナミビルとペラミビルでは上記と異なる3つのアミノ酸配列の集中がIC_{50}の高い株にみられた．オセルタミビルとペラミビルはその分子構造に疎水基があるために，H273Yの変異によるIC_{50}の上昇が，オセルタミビルとペラミビルに共通に起こると考えられている．IC_{50}との関連する可能性のある変異が，オセルタミビルとペラミビルに共通するのではなくオセルタミビルとラニナミビルの組み合わせと，ザナミビルとペラミビルの組み合わせにみられているのは，これらの変異とIC_{50}値の関連がH273Y変異のように疎水基の存在に起因するものではないことを示している．これらの変異はcatalytic siteに存在してはいないが，catalytic site以外の変異も組み合わせにより，特定のNA阻害薬のNAへの結合に影響を持つのかも知れない．catalytic siteだけでなくcatalytic site以外のアミノ酸配列をモニタリングすることにも意味があると思われる．B型ウイルスではA型ウイルスのような亜型分類はされないが，山形系とビクトリア系の2系統（lineage）にHAの抗原性より分類されている[17)18)]．2013/14年度は山形系が優位で70%を占めていたと報告されている．今回各株のHAアミノ酸配列が山形系かビクトリア系どちらに分類されるかについてはまだ検討されていない．Bの系統と薬剤感受性に関連があるかは，臨床的にも重要な問題であり，今後検討を行いたい．

今回，A/H1N1pdm09，A/H3N2，およびBの2013/14年臨床分離株において，そのNAのアミノ酸配列を決定し，薬剤感受性の指標であるIC_{50}との関連について解析を行った結果，A/H1N1pdm09のH275Y変異以外に4つのNA阻害薬への既知の耐性変異はみられなかった．NAのcatalytic siteには，培養によって導入される可能性が示唆されている変異の他には全く変異がみられず，A/H1N1pdm09，A/H3N2，Bのいずれにおいても耐性化の傾向はみられていないと考えられた．

この研究は第一三共株式会社との共同研究「インフルエンザウイルスの遺伝子変異と薬剤耐性ならびに臨床的意義に関する共同研究（FAJK 250010）」により支援されている．

参 考 文 献

1) Kawai N, Ikematsu H, Hirotsu N, Maeda T, Kawashima T, Tanaka O, Yamauchi S, Kawamura K, Matsuura S, Nishimura M, Iwaki N and Kashiwagi S : Clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir for treatment of influenza A virus subtype H1N1 with the H274Y mutation : a Japanese, multicenter study of the 2007–2008 and 2008–2009 influenza seasons. Clin Infect Dis 49 : 1828–1835, 2009.
2) Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Kondou K, Hirotsu N, Kawashima T, Maeda T, Tanaka O, Doniwa K and Kashiwagi S : Clinical effectiveness of oseltamivir for influenza A/H1N1 virus with H274Y neuraminidase mutation. J Infect. 59 : 207–212, 2009.
3) http://www.nih.go.jp/niid/images/flu/resistance/20150423/dr13- 14j20150423-1.jpg
4) Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, Butler EN, Wallis TR, Klimov AI and Gubareva LV : Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. Antimicrob Agents Chemother 52 : 3284–3292, 2008.
5) Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC and Tashiro M : Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. Antiviral Res. 117 : 27–38. 2015.
6) 池松秀之，鄭湧，白根健次郎，藤英博，佐々木裕之，古賀結，浦田美秩代，堀田多恵子，内海健，康東天：2011/12及び2012/13年インフルエンザ流行期に患者より分離されたA/H3N2型ウイルス96株のNA遺伝子配列と薬剤感受性との関連についての検討．福岡医学雑誌 106：16–22，2015
7) Ikematsu H, Kawai N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010–2011 season in Japan. J Infect Chemother 18 : 529–533, 2012.
8) Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory activity of four

neuraminidase inhibitors against influenza virus isolates in the 2011–2012 season in Japan. J Infect Chemother 20 : 77–80, 2014.
9) Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory activity of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of influenza virus in the Japanese 2012–2013 season. J Infect Chemother 21 : 39–42, 2015.
10) Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory activity of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of the influenza virus circulating in the Japanese 2013–2014 season. J Infect Chemother 21 : 634–638, 2015.
11) Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y and Wentworth DE : Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. J Virol 83 : 10309–10313, 2009.
12) Zhou B, Lin X, Wang W, Halpin RA, Bera J, Stockwell TB, Barr IG and Wentworth DE : Universal influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. J Clin Microbiol 52 : 1330–1337, 2014.
13) Colman PM, Varghese JN and Laver WG : Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature 303 : 41–44, 1983.
14) Air GM, Els MC, Brown LE, Laver WG and Webster RG : Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. Virology 145 : 237–248, 1985.
15) Gianfrani C, Oseroff C, Sidney J, Chesnut RW and Sette A : Human memory CTL response specific for influenza A virus is broad and multispecific. Hum Immunol 61 : 438–452, 2000.
16) Lee HK, Tang JW, Kong DH, Loh TP, Chiang DK, Lam TT and Koay ES : Comparison of mutation patterns in full-genome A/H3N2 influenza sequences obtained directly from clinical samples and the same samples after a single MDCK passage. PLoS One 8 : e79252, 2013.
17) Kanegae Y, Sutiga S, Endo A, Ishide M, Senya S, Osake K, Nerome K and Oya A : Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B virus isolated in Japan : Co-circulating lineages in the same epidemic season. J. Virol. 64 : 2860–2865, 1990.
18) Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP and Nerome K : Co-circulation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. Virology 175 : 59–68, 1990.

Received June 24, 2015
Accepted June 24, 2015