

2015/16年シーズンに日本で患者より分離されたインフルエンザウイルス，A/H1N1pdm09，A/H3N2，およびB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
九州大学病院検査部 | 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班

鄭，湧
九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野（第一内科） | 九州大学大学院医学研究院：助教

松本，信也
九州大学病院検査部

野田，望
九州大学病院検査部

他

<https://doi.org/10.15017/1904344>

出版情報：福岡醫學雑誌. 108 (7), pp.194-203, 2017-07-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

原 著

**2015/16年シーズンに日本で患者より分離されたインフルエンザウイルス、
A/H1N1pdm09, A/H3N2, およびB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¹⁾²⁾, 鄭湧³⁾, 松本信也¹⁾, 野田望¹⁾,
堀田多恵子¹⁾, 内海健¹⁾⁴⁾, 康東天¹⁾⁴⁾

¹⁾九州大学病院検査部

²⁾日本臨床内科医会 インフルエンザ研究班

³⁾九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学分野 (第一内科)

⁴⁾九州大学大学院医学研究院 臨床検査医学分野

**Analysis of the Neuraminidase Amino Acid Sequences of Influenza
A/H1N1pdm09, A/H3N2, and B Viruses Isolated from Influenza
Patients in the 2015/16 Japanese Influenza Season**

Hideyuki IKEMATSU¹⁾²⁾, Yong CHONG³⁾, Shinya MATSUMOTO¹⁾, Nozomi NODA¹⁾,
Taeko HOTTA¹⁾, Takeshi UCHIMI¹⁾⁴⁾ and Dongchon KANG¹⁾⁴⁾

¹⁾*Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,
Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan*

²⁾*Japan Physicians Association, Influenza Study group, Tokyo, Japan*

³⁾*Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School
of Medical Sciences, Fukuoka, Japan*

⁴⁾*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Graduate School 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, thus emergence of resistant viruses is of great concern. We sequenced the NA segment of isolated virus from influenza patients in the 2015–16 influenza season and investigated the relation between the deduced NA amino acid sequence and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of four NA inhibitors.

Materials and Methods : A total of 59 viruses (20 A/H1N1pdm09, 19 A/H3N2, and 20 B) that showed high or low IC₅₀ to NA inhibitors were sequenced using a “next generation sequencer”, and the deduced amino acid sequences were analyzed.

Results : Two A/H1N1pdm09 viruses that showed very high IC₅₀ for oseltamivir (150 nM and 130 nM) contained the H275Y mutation that has been reported in several previous seasons. Except for this H275Y mutation, no significant relation was found between the NA amino acids and the IC₅₀ of the four NA inhibitors in A/H1N1pdm09 viruses. There was no significant relation between the NA amino acids and the IC₅₀ of the four NA inhibitors for A/H3N2. NA amino acids sequences of B were divided

into two groups. There was no significant relation between the NA amino acids and the IC₅₀ of the four NA inhibitors for B.

Conclusion : The previously reported H275Y mutation that causes oseltamivir resistance was found in two A/H1N1pdm09 viruses that showed a very high IC₅₀ for oseltamivir. No additional NA amino acid sequences related to the IC₅₀ of four NA inhibitors was found in other virus in the 2015-16 influenza season.

Key words : Influenza, Neuraminidase, Sequence, IC₅₀

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、時に重症化などによる死亡例もみられ、社会に大きな影響を与えている。日本では、インフルエンザの治療に、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬が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 (zanamivir, 以下ザナミビル), オセルタミビルリン酸塩 (oseltamivir, 以下オセルタミビル), ペラミビル水和物 (peramivir, 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 (laninamivir, 以下ラニナミビル) の4剤が使用されている。そのため、この4つのNA 阻害薬に対する耐性ウイルスの出現は臨床で重要な問題となる。

NA 阻害薬の耐性が最初に問題になったのは、2007年より出現した、NA にオセルタミビルに耐性となる H275Y 変異を持つ A/H1N1 (ソ連型) で¹⁾、2008/09年シーズンに A/H1N1 感染者で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²⁾³⁾。2009年に新型インフルエンザとして A/H1N1pdm09 が出現し、それ以降は A/H1N1 (ソ連型) の流行は見られなくなった。一方、A/H1N1pdm09 においてもオセルタミビル耐性ウイルスの流行が報告されている⁴⁾。また、H3N2 や B でも、流行は確認されていないが、in vitro で NA 阻害薬への感受性低下を示す NA の変異が報告されており、NA 阻害薬耐性ウイルスについてのサーベイランスが世界で行われている^{5)~7)}。

我々は、2010/11年シーズンよりインフルエンザウイルスの NA 阻害薬への感受性を調査する為に、各シーズンに患者から分離されたウイルスについて各薬剤の IC₅₀ を検討している^{8)~13)}。また、2011/12年シーズンより患者から分離されたインフルエンザウイルスの NA の全領域の遺伝

子を解析し、NA のアミノ酸 (Amino Acid, 以下 AA) 変異と IC₅₀ との関連について検討を継続している^{14)~16)}。今回、2015/16年シーズンに分離された A/H1N1pdm09, A/H3N2, B ウイルスについて NA 領域の遺伝子を解析し、推定される AA 配列と各 NA 阻害薬の IC₅₀ との関連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^{8)~13)}。2015/16年流行期にこの調査に参加した23の医療機関 (東北, 関東, 北陸, 関西, 四国, 九州) 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, IC₅₀) を fluorescence-based neuraminidase inhibition assay により測定した¹⁷⁾。2015/16年シーズンに分離されたウイルスの内訳は A (H1N1) pdm09 が 210 株 (67.3%), A (H3N2) が 19 株 (6.4%), そして B が 82 株 (26.3%) であった。A/H1N1pdm09 と B のそれぞれについて、オセルタミビルおよびラニナミビルの IC₅₀ が高い 10 株, 低い 10 株を選び、解析の対象とした。A/H3N2 は 19 株全てについて解析した。

NA 遺伝子の決定

A 型インフルエンザである A/H1N1pdm09 および A/H3N2 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 re-

verse transcribed polymerase reaction (RT-PCR) を施行した¹⁸⁾. B では, Zhou らの報告した B 型ウイルスの全遺伝子を増幅するための primer set を用いて RT-PCR を施行した¹⁹⁾. この PCR 産物から, 既に報告した方法にて NA の AA 配列を推定した²⁰⁾. その概略は, 上述の PCR 産物を材料として, 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し, MiSeq によるシーケンズを実施した. 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 配列をコンセンサス配列 (consensus) と比較した.

結 果

A/H1N1pdm09 の NA と IC₅₀

A/H1N1pdm09 20 株の AA 配列でコンセンサスから変異がみられた部位をオセルタミビルの IC₅₀ が高い株より示した (Table 1). NA の 469 アミノ酸中 24ヶ所に差異がみられた. オセルタミビルの IC₅₀ が 150nM および 130nM と著しく高値であった 2 株では, NA の catalytic site である 275 番目に H から Y への変異が認められた. この 2 株のペラミビルの IC₅₀ は 10nM および 17nM であり, そのシーズンに分離された株のペラミビルの IC₅₀ の幾何平均 0.5 nM の 20 倍以上に上昇していた¹³⁾. NA 蛋白の活性部位 (catalytic site) は既に同定されているが²¹⁾, この H275Y 以外には, catalytic site に 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. 株間で複数の変異が catalytic site 以外にみられたが, それらの変異と 4 つの NA 阻害薬の IC₅₀ に関連をみいだすことは出来なかった.

A/H1N1pdm09 の流行がみられた 2013/14 年シーズンの A/H1N1pdm09 に置ける NA のコンセンサス配列と今回の AA の比較では, 5ヶ所 (AA13, AA44, AA264, AA270, AA314) に, 2015/16 年シーズンに分離された多数の株で変異がみられた (Table 1). AA13 では V から I, AA44 では S から N, AA264 では V から I, AA270 では N から K, AA314 では I から M への変異が見られ, 多くの株で 2013/14 年シーズンのコンセンサスとは異なっていた. これら 5ヶ所の AA 変異と 4 つの NA 阻害薬の IC₅₀ の高低に

関連をみいだすことは出来なかった.

A/H3N2 の NA と IC₅₀

解析された 19 株の A/H3N2 の AA におけるコンセンサスからの変異をオセルタミビルの IC₅₀ が高い株より示した (Table 2). A/H3N2 の NA 蛋白 468 AA 中 15ヶ所に変異がみられた. 変異は全て catalytic site ではない部位であり, catalytic site では変異はみられなかった. いくつかの変異が複数の株にみられたが, 4 つの NA 阻害薬の IC₅₀ の高低に強く関与すると推定される AA 変異をみいだすことは出来なかった.

2014/15 年シーズンに得られた A/H3N2 のコンセンサスとの比較では, 2015/16 年シーズンコンセンサスに 10ヶ所の変異がみられた (data not shown). その中の 7ヶ所は, 2015/16 年シーズンに得られた株全てで 2014/15 年シーズンのコンセンサスから変異をしていた. 残りの 3ヶ所は Table 2 に示された AA147, AA 150, AA 380 で, 半数以上が 2014/15 年シーズンから変異をしていたが, これらの変異と 4 つの NA 阻害薬の IC₅₀ の高低に関連をみいだすことは出来なかった.

B の NA と IC₅₀

B 20 株のコンセンサスからの変異と各株の IC₅₀ を Table 3 に示した. 2015/16 年シーズンに得られた株の AA 配列は大きく 2 つに分類され, それらは分離された株の抗原性によって決定された B 型ウイルスの 2 つの系統の分類, Victoria 系統 (以下 Vic) と Yamagata 系統 (以下 Yam), と一致していた²²⁾²³⁾.

Vic の 13 株のコンセンサスとの比較では, 466 の NA の AA 中 12ヶ所で変異がいくつかの株認められた. 変異は全て catalytic site 以外で, catalytic site には変異はみられなかった. これらの変異と 4 つの NA 阻害薬の IC₅₀ の高低に関連をみいだすことは出来なかった.

Yam の 7 株は, 多くのアミノ酸が前年度のコンセンサスと一致していたが, 5ヶ所の AA (AA45, AA150, AA245, AA393, AA464) では, Yam 7 株全てに Yam が流行の主体であった前年度に得られた B の NA のコンセンサスからの変化がみられた. 全ての Yam 株が今回のコンセンサスからの変異をしていた 22ヶ所を除いて,

Table 1 NA AA mutation and IC₅₀ of A/H1N1 pdm09 in the 2015/16 season

Consensus	AA position																				NAI								
	13	19	34	44	52	67	74	82	93	96	117	150	151	199	263	264	270	275	288	314	381	397	450	453	Os	Ln	Zn	Pr	
	I	M	V	N	S	V	F	S	P	G	I	K	D	D	I	I	I	K	H	I	M	T	N	S	V	IC ₅₀ ,nM	IC ₅₀ ,nM	IC ₅₀ ,nM	IC ₅₀ ,nM
DS6-352	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	150	3.9	1.3	10	
DS6-528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	130	2.7	1.2	17	
DS6-349	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.0	12.0	8.3	2.5	
DS6-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	1.2	2.4	2.5	0.6	
DS6-25	-	-	-	S	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	V	N	-	-	-	V	-	-	G	-	1.0	2.6	1.8	0.7	
DS6-513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	2.4	1.4	0.6	
DS6-271	V	-	I	S	R	I	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	-	-	-	0.9	2.7	2.1	0.7	
DS6-1	V	V	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	V	V	N	-	-	-	I	-	-	-	-	0.9	2.6	1.5	0.6	
DS6-104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	2.7	1.1	0.5	
DS6-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	1.2	1.0	0.4	
DS6-369	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	1.5	1.0	0.4	
DS6-98	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	2.6	0.9	0.7	
DS6-370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	0.6	1.0	0.8	0.2	
DS6-332	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.2	1.0	0.3	
DS6-45	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.1	1.1	0.3	
DS6-281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.5	1.2	0.3	
DS6-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.9	1.0	0.5	
DS6-343	V	-	I	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	-	-	-	0.5	1.2	1.0	0.3	
DS6-174	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	1.2	0.8	0.2	
DS6-84	-	-	-	-	-	-	-	P	S	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	1.4	0.8	0.4	
Consensus in 2013/14 season	V	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	N	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geometric Mean of IC ₅₀																									0.8	1.9	1.3	0.5	

NAI ; neuraminidase inhibitor, Os ; oseltamivir, Ln ; laninamivir, Zn ; zanamivir, Pr ; peramivir

Table 2 NA AA mutation and IC₅₀ of A/H3N2 in the 2015/16 season

Consensus	AA position															NAI			
	50	141	147	150	151	238	310	331	339	380	384	386	398	435	468	Os	Ln	Zn	Pr
	V	N	N	R	D	T	H	S	D	V	S	P	V	E	P	IC ₅₀ , nM			
DS6-293	-	D	-	-	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	1.3	4.7	2.8	1.1
DS6-150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	4.4	2.5	0.9
DS6-40	-	D	-	H	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	1.2	5.2	2.7	0.9
DS6-160	-	D	-	H	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	1.1	5.0	2.3	0.8
DS6-47	G	D	-	-	G	A	Y	-	-	I	A	-	-	-	-	1.0	4.5	2.1	0.8
DS6-111	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	1.0	4.8	2.5	0.9
DS6-159	-	D	-	H	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	1.0	4.9	2.3	0.8
DS6-381	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	0.9	3.8	2.2	0.7
DS6-116	-	D	-	-	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	0.9	4.0	2.7	0.9
DS6-524	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	H	I	-	H	0.9	3.3	1.9	0.7
DS6-149	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	0.9	3.6	2.5	0.8
DS6-11	-	-	-	-	-	-	-	R	N	-	-	-	-	-	H	0.8	2.9	2.3	0.3
DS6-270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	3.4	2.1	0.7
DS6-348	-	-	-	H	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	0.8	3.5	2.3	0.7
DS6-167	-	-	D	H	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	0.7	3.0	2.1	0.7
DS6-52	-	D	-	-	-	-	Y	-	-	I	-	-	-	-	-	0.7	2.7	1.8	0.7
DS6-82	-	-	D	H	-	-	-	-	N	-	-	H	-	-	H	0.7	3.0	1.8	0.5
DS6-10	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	0.7	3.3	2.3	0.8
DS6-363	-	-	D	H	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	H	0.4	2.1	1.9	0.6
Consensus in 2014/15 season	-	-	D	H	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-				
Geometric Mean of IC ₅₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	3.7	2.22	0.7

NAI ; neuraminidase inhibitor, Os ; oseltamivir, Ln ; laninamivir, Zn ; zanamivir, Pr ; peramivir

Yam 7株間で6ヶ所にコンセンサスからの変異がみられた。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。また、これらの6ヶ所の変異と4つのNA阻害薬のIC₅₀の高低に関連をみいだすことは出来なかった。

考 察

インフルエンザの治療においてNA阻害薬への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)であるが、このウイルスは2009年のA/H1N1pdm09出現以降、流行は見られていない。A/H1N1pdm09の流行は毎年ではないが、流行がみられた2011/12年と2013/14年シーズンには、オセルタミビルへの感

受性を低下させるH275Y変異をもつA/H1N1pdm09が検出されたが、その割合は極めて低く、治療への明らかな影響は報告されていない。2014/15年シーズンはA/H1N1pdm09がほとんど検出されなかった。今回検討した2015/16年シーズンは、A/H1N1pdm09が流行の半数以上を占め、その中の1.9%にH275Y変異を持つオセルタミビル耐性ウイルスが存在していたと国立感染症研究所から報告されている²⁴⁾。我々が実施しているIC₅₀上昇の調査では、2015/16年シーズンに分離されたA/H1N1pdm09のなかに、オセルタミビルおよびペラミビルのIC₅₀が著しく上昇したウイルスが2株分離された¹³⁾。今回この2株では、オセルタミビル耐性変異として認識されているNAのH275Y変異がみられ、この変異がオセルタミビルおよびペラミビルのIC₅₀上昇の

原因であることが確認された。また、耐性の基準には達していないが、オセルタミビル IC₅₀ が 21.0 nM と上昇しているウイルス株がみられている (Table 1, DS6-349)。この株では、他の NA 阻害薬の IC₅₀ もわずかながら上昇している。NA のアミノ酸配列が全く同一のウイルス株は他に 4 株みられているが、IC₅₀ の上昇は見られていない。NA 以外にも耐性となるかはわからないが、IC₅₀ に影響を与える部位か因子が存在していると思われる。

国立感染症研究所から報告される A/H1N1 pdm09 の HA 遺伝子による系統樹解析では、2015/16 年シーズンの A/H1N1 pdm09 に以前に流行した株からの系統樹上のクレードが分岐するような変異がみられることが報告されている²⁵⁾。今回の NA 遺伝子検討では、変異が 4 つみられている。これらの変異は NA 阻害薬の IC₅₀ の高低には関連を示していないが、ウイルスの変化には意義がある可能性があり、HA と NA の変異の関連については、今後詳細に検討する予定である。

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が、A/H3N2 や B では、耐性ウイルスの大きな流行は報告されていないが、in vitro では NA 阻害薬への感受性低下を示す NA の変異が知られている^{26)~28)}。A/H3N2 では、catalytic site に E119V, R292K 変異が起こると、NA 阻害薬の耐性化が報告されている²⁶⁾。しかし、in vitro で確認されているこれらの既知の耐性変異は、現在日本で行われている全国規模のインフルエンザ耐性サーベイランスでは報告されておらず、今回の検討や我々の過去の検討でもみられていない。日本では NA 阻害薬に耐性を示す A/H3N2 の流行は報告されておらず、A/H3N2 では、NA 阻害薬が広く治療に使用されても、耐性変異は容易には起こらないものと考えられる。

A/H3N2 では NA の catalytic site に D151N 変異がしばしばみられるが、これは 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²⁹⁾。我々は 2011/12 年シーズンに 48 株中 1 株、2012/13 シーズンに 48 株中 4 株の D151N 変異を報告したが、2013/14 年シーズンおよび 2014/15 年シーズンにはこの変異は検出されなかった^{14)~16)}。今回解析した 19 株の A/H3N2 には、この変異はみられなかつ

たが、1 株に AA151 で D151G の変異がみられた。この変異が実際の流行株ではみられたのかについては不明である。catalytic site にこれまでに解析した臨床分離株では AA151 以外には、変異がみられていないことより、インフルエンザウイルスの中で A/H3N2 は変異の多いウイルスといわれているが、NA の catalytic site は非常によく保存されていることが確認された。A/H3N2 の NA の catalytic site 以外に、いくつかの変異がみられたが、IC₅₀ に有意な影響を与える変異はみつからなかった。A/H3N2 において、NA 阻害薬の感受性低下に関連する NA の変異の出現や、その蓄積をもたらす傾向はこれまでのところないと考えられる。

B において、A/H1N1 pdm09 の H275Y 変異に相当する H273Y 変異は、2015/16 年シーズンに解析された B にはみられなかった (Table 3)。これまで、この変異は海外や日本でのサーベイランスでも報告されておらず、B において、この変異は自然界ではおこりにくいと思われる。また、NA 阻害薬の感受性低下に関連するその他の変異として、E105K, E117A, E117G, Q138R, P139S, G140R が報告されている²⁷⁾²⁸⁾。しかし、これらの変異も、これまでの成績と同様に、今回の B 型 20 株にみられておらず、NA 阻害薬の一般的な使用によるこれらの耐性変異の誘導は容易には起こらないと考えられた。

B ウイルスでは亜型分類はされないが、山形系統とビクトリア系統の 2 系統に HA 抗原性により分類されている²²⁾²³⁾。日本における流行サーベイランスでは 2014/15 年シーズンは殆どが山形系統であったが、2015/16 年シーズンは山形系統とビクトリア系統の 2 系統の流行がみられ、日本では山形系統がわずかに多かったと報告されている³⁰⁾。今回の B 型 20 株は、その抗原性から 13 株が Vic で、7 株が Yam と判定されたが、NA のアミノ酸配列も、2 系統で差がみられた。しかし、それぞれの系統内でみられた株間の変異は、全て catalytic site 以外に見られており、薬剤感受性に与える影響は考えにくく、実際の IC₅₀ にも各変異と有意な関連はみいだされなかった。興味深いことに、今回 Yam と判定された株において、6ヶ所 (AA45, AA49, AA236, AA245, AA393, AA464) で全ての株に、昨シーズンのコンセンサ

スからの変異がみられている。これらのうち4ヶ所 (AA45, AA49, AA245, AA393) では, Vic の13株が昨シーズンのコンセンサスと同じであった。昨シーズンの Yam にみられた AA が2015/16年シーズンの Vic で保存されている。Bの進化は複雑で, その過程においてウイルス間で文節の交換などが起こっているのではないかと, 推定されているが, 今回のBの Yam および Vic にみられた2014/15年シーズンからの変異も単純には2つの系統が独立して進化しているという考え方では説明出来ず, 複雑な仕組みが存在しているようである。NAのHA領域との関連や, Vic および Yam の2系統間の変異の関連について, 今後解析する株の数を増やし, さらなる解析を行う予定である。

今回, 2015/16年シーズンに分離されたA/H1N1pdm09, A/H3N2, BウイルスについてNA領域の遺伝子を解析し, 推定されるAA配列と各NA阻害薬のIC₅₀との関連について検討したが, 耐性変異としてA/H1N1pdm09の一部に既知のH275Y変異を認めた以外は, NA阻害薬の感受性と関連が考えられる変異はみられなかった。NA阻害薬の一般的な使用による耐性変異の誘導は容易には起こらないと考えられるが, その可能性は残されており, サーベイランスは今後も必要であると思われる。

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。

謝 辞

次世代シーケンサーによる塩基配列の決定に協力していただいた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, 白根健次郎氏, 藤英博氏, 佐々木裕之教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ and Zambon MC : Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 13. pii : 8026. 2008.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Gehrig N and Kelso A : Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza, *NEJM* 365 : 2541-2542, 2011.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, Huang W, Lackenby A, Lee RT, Lo J, Maurer-Stroh S, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Tilmanis D, Wang D, Zhang W and Meijer A : Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015. *Antiviral Res.* 132 : 178-185, 2016.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory concentration (IC₅₀) of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of the influenza viruses circulating in the 2010-2011 to 2014-2015 Japanese influenza seasons. *J Infect Chemother* 22 : 599-604, 2016.
 - 13) Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N and Kashiwagi S : In vitro neuraminidase inhibitory concentration (IC₅₀) of four neuraminidase inhibitors in the Japanese 2015-16 season : Comparison with the 2010-11 to 2014-15 seasons. *J Infect Chemother*. 2017 in press.
 - 14) 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.
 - 15) 池松秀之, 鄭湧, 白根健次郎, 藤英博, 佐々木裕之, 松本信也, 野田望, 堀田多恵子, 内海健, 康東天 : 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 *福岡医学雑誌* 106 : 231-239, 2015.
 - 16) 池松秀之, 鄭湧, 白根健次郎, 藤英博, 佐々木裕之, 古賀結, 松本信也, 堀田多恵子, 内海健, 康東天 : 2014/15 年流行期に患者より分離されたインフルエンザ 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 *福岡医学雑誌* 107 : 98-104, 2016.
 - 17) Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H and Kubo S : CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 53 : 186-192, 2008.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Chong Y and Ikematsu H : Effect of seasonal vaccination on the selection of influenza A/H3N2 epidemic variants. *Vaccine*. 35 : 255-263, 2017.
 - 21) Colman PM, Varghese JN and Laver WG : Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303 : 41-44, 1983.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 表 1. 2015/2016 シーズン抗インフルエンザ薬耐性株検出情報 <https://www.niid.go.jp/niid/images/flu/resistance/20170707/dr15-16j20170707-1.pdf>
 - 25) 2015/16 シーズンのインフルエンザ分離株の解析 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/surveillance/2350-iasr/related-articles/related-articles-441/6872-441r01.html>
 - 26) Abed Y, Baz M and Boivin G : Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther*. 11 : 971-976, 2006.
 - 27) Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M and 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.
 - 28) Farrukhee R, Leang SK, Butler J, Lee RT, Maurer-Stroh S, Tilmanis D, Sullivan S, Mosse J, Barr IG and Hurt AC : Influenza viruses with

- B/Yamagata- and B/Victoria-like neuraminidases are differentially affected by mutations that alter antiviral susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 70 : 2004-2012, 2015.
- 29) 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.
- 30) 週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数, 2012/13~2016/17 シーズン <https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/iasr/Byogentai/Pdf/data2j.pdf>

(Received for publication July 3, 2017)