

長時間作用型抗インフルエンザ薬 CS-8958 (ラニナミビル オクタン酸エステル, イナビル®) のパンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルスに対する *in vitro* および *in vivo* 効果

久保 淑・角田正代・山下 誠
第一三共株式会社生物医学研究所

(2010年9月1日受付)

ラニナミビルは新規のインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬で、CS-8958はそのプロドラッグ体であり、長時間作用の性質を有することが知られている。2009年にパンデミックを起したパンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルスの長崎分離株を使用し、ラニナミビルがNA活性と培養細胞系でのウイルス増殖に対し強い阻害活性を有すること、さらにNAに対し強い結合力を示すことを明らかにした。さらに、マウス感染モデル系において単回経鼻投与のCS-8958が優れた肺中のウイルス産生抑制効果を示したことから、パンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルス感染に対してもCS-8958は長時間作用型薬剤として有効であることが示唆された。

インフルエンザはインフルエンザウイルスが上気道から気管、肺へと拡大感染して起きる、高年齢者を中心に時に致死的にもなる呼吸器疾患であり、世界で毎年350万人が重篤化し、30万人から50万人が死に至ると考えられている¹⁾。インフルエンザウイルスは主にA型とB型がヒトで流行を繰り返しているが、A型インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面抗原であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性の違いによりHAはH1からH16の16種、NAはN1からN9の9種があり、その組合せで多くの亜型が知られている。過去約100年において、ヒトは4回のパンデミック、即ち1918年のH1N1型ウイルスによるスペインかぜ、1957年のH2N2型ウイルスによるアジアかぜ、1968年のH3N2型による香港かぜ²⁾、

そして2009年のブタ由来パンデミック (H1N1)2009 (以下pdm(H1N1)2009) インフルエンザウイルス³⁾によるものを経験した。感染症発生動向調査によると、2009年6月のパンデミック宣言後に日本で患者発生が報告され始めた2009年28週から2010年10週までpdm(H1N1)2009ウイルス分離率が99.29%であり⁴⁾、A型インフルエンザウイルスは殆どpdm(H1N1)2009ウイルスに置換わったかに見えるが、今シーズン以降の動向に注意を払う必要がある。

抗インフルエンザ薬として2つのクラスの薬剤—M2イオンチャンネル阻害薬とNA阻害薬—がある。M2イオンチャンネル阻害剤 (アマンタジン、リマンタジン) はインフルエンザウイルス遺伝子の脱殻やウイルスのアセンブリーを阻害する

が⁵⁾、B型ウイルスには無効で、また耐性株が容易にできることから、米国においては2005年から使用されていない^{6,7)}。また、pdm(H1N1)2009ウイルスも初期の分離株で既に耐性変異を有していた⁹⁾。NA阻害薬は産生したインフルエンザウイルスが感染細胞から遊離する時に必要なNAを阻害することで感染の拡大を抑制するものであるが、現在、オセルタミビル(タミフル[®]、75mgの1日2回5日間の経口剤)、ザナミビル(リレンザ[®]、10mgの1日2回5日間の吸入剤)、ペラミビル(ラピアクタ[®]、300mgの単回点滴静注剤)があり、オセルタミビルが最も広く使用されている。しかしながら、既にインフルエンザ患者から何種類かのオセルタミビル耐性ウイルスが分離されている^{9,10)}。特にオセルタミビル耐性のH274Y変異株(274位のヒスチジンがチロシンに変異の意、N2ナンバリング)の野生株からの置換わりは極めて急であった。即ち、まず2006~2007年の北欧地域での高い分離頻度が報告され¹¹⁾、国内では翌2007~2008年シーズンに2.6%の分離率に過ぎなかったものの¹²⁾、2008~2009年シーズンには国内では99.7%となり¹³⁾、世界的にも殆どがH274Y耐性変異に^{14,15)} わずか1年で置換わった。このH274Y変異株は高病原性H5N1トリインフルエンザウイルス¹⁶⁾やpdm(H1N1)2009ウイルスでも分離されており、pdm(H1N1)2009ウイルスでは既にWHOにより300例近くが¹⁷⁾、国内において1.13%の分離率が報告されている¹⁸⁾。pdm(H1N1)2009ウイルスのH274Y変異株に対し、オセルタミビル活性体とペラミビルはほぼ同等の耐性度上昇との報告がなされた¹⁹⁾。

我々はラニナミビルは高病原性トリH5N1型インフルエンザウイルスを含む各種インフルエンザウイルスNAに強い阻害活性をもつ新規NA阻害薬として見出し、H274Y変異ウイルスを含む各種オセルタミビル耐性ウイルスにも有効であることを報告した^{20,21)}。ラニナミビルにオクタン酸をエ

ステル結合したCS-8958は単回投与で各種インフルエンザウイルスの動物感染系で優れた薬効を示すようになったが^{20~23)}、それはCS-8958がその経鼻投与により呼吸器での長期貯留性を獲得し²⁴⁾、またラニナミビルがNAに強い結合性を有することで長期作用型の性質を獲得し、単回投与で有効になったものと考えられた²¹⁾。この長期作用型の特長を生かし、インフルエンザ治療がCS-8958の単回投与で完結することがpdm(H1N1)2009インフルエンザウイルスによるパンデミック前までに行われた臨床試験で証明されている^{25,26)}。CS-8958はインフルエンザ治療が1回で完結する吸入剤イナビル[®]として、2010年9月に製造販売が承認された。

本論文では2009年に国内で分離されたpdm(H1N1)2009インフルエンザウイルスを使用し、NA阻害活性、培養細胞でのウイルス増殖阻害活性、NAへの結合力、マウス感染モデル系での薬効評価を行った結果、pdm(H1N1)2009インフルエンザウイルス感染症に対するCS-8958の単回投与での有効性を示唆したことを報告する。

材料と方法

1. ウイルス、細胞、動物

pdm(H1N1)2009インフルエンザウイルス A/Na-gasaki/I01/2009v²⁷⁾、INF007、INF010、INF020、INF023、INF034、INF095、INF126、INF138、INF139、INF189、INF223、INF324、INF331、INF407、INF442、INF444株は2009年7月より12月にインフルエンザ患者より長崎県で分離され、Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK細胞、ATCC CCL-34)で1回増殖させたものを長崎大学熱帯医学研究所より入手した。入手したウイルスはMDCK細胞で1回増殖させ、培養上清を分注して-80°Cで保存し、適宜溶解し実験に供した。MDCK細胞はAmerican Type Culture

Collectionより入手した。BALB/c マウス (5週令, メス, SPF) は日本チャールス・リバー株式会社より購入した。

2. 被験化合物

CS-8958 (ラニナミビルオクタン酸エステル), ラニナミビル, ザナミビル, ペラミビルは第一三共株式会社で合成した。オセルタミビルはタミフル®より抽出し, オセルタミビル活性体はオセルタミビルよりいずれも第一三共株式会社で調製した。

3. 試薬

4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- α -D-Neuraminic Acid, Ammonium Salt (MU-NANA) はナカライテスク株式会社, Distilled Water (DW), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS), Modified Eagle Medium (MoEM), HEPES 緩衝液, 500 U/mL ペニシリン/500 μ g/mL ストレプトマイシン (100 \times PS), ファンギゾン (Life Technologies Corporation), 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid (MES), トリプシン (Type IX-S, From Porcine Pancreas), ウシ血清アルブミン (35%) Fraction V (BA), DEAE デキストラン, アガー, クリスタルバイオレット, フェノールレッドは Sigma-Aldrich Corporation よりそれぞれ購入した。

4. 50% 酵素阻害濃度 (IC₅₀) の算出

32.5 mM MES-4 mM CaCl₂ 溶液 (pH 6.5) (NAB) 中で, 10~100 pmol/min の酵素活性を与えるよう希釈したウイルス液と各種被験化合物を混合し, 室温で10分間静置した。MU-NANAを100 μ Mとなるよう添加し, 室温で30分反応後, 蛍光プレートリーダー CytoFluor Series 4000 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) で励起波長 360 nm, 蛍光波長 460 nm での蛍光強度を測定した。バックグラウンドとして, ウイルス

の代わりに非感染細胞培養液上清を用いた。残存酵素活性は次式により求めた。

$$\text{残存酵素活性 (\%)} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \text{ 平均値} \\ \times 100$$

ここで, A: 蛍光値, B: バックグラウンド平均値, C: 薬剤非添加の蛍光値である。

残存酵素活性が10~90%を与える連続した濃度を選択し, その対数値と残存酵素活性値から直線回帰により IC₅₀ と 95% 信頼区間を SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を用いて求めた。

5. 50% ウイルス増殖有効濃度 (EC₅₀) の算出

ウイルスを6穴プレートの MDCK 細胞に1時間接触させ PBS で洗浄した後, 0.21% ウシ血清アルブミン, 25 mM HEPES 緩衝液, 0.01% DEAE デキストラン, 1.0 μ g/mL トリプシン, 0.001% フェノールレッド, 1 \times PS, 0.5 μ g/mL ファンギゾン, 0.6% アガーを含む MoEM (MoEM/BA 寒天培地) に種々濃度の被験化合物を加え, 添加した。37°C, 5% 炭酸ガスインキュベータで42~44時間培養を行った後, クリスタルバイオレットで生細胞を染色しプラークを計数した。プラーク形成率は次式で算出した。

$$\text{プラーク形成率 (\%)} = \frac{(M/M_{100})}{100} \times 100$$

ここで, M: 被験化合物添加ウェルのプラーク数, M₁₀₀: 被験化合物非添加ウェルのプラーク数である。プラーク形成率と対数濃度から次式のシグモイド Emax モデルにより SAS System Release 8.2 を用いて EC₅₀ を算出した。

$$\text{プラーク形成率 (\%)} = \frac{100 \times (\text{濃度})^n}{[(EC_{50})^n + (\text{濃度})^n]}$$

(n: sigmoidicity factor)

6. NA 解離測定

NAB 中で, 0.4% BA と 1 \times PS 含有の PBS (PBS-BA/PS) に懸濁した INF139 と各被験化合物を終濃度で 100 nM になるように添加し, 37°C で 60 分イ

ンキュベートした。被験化合物無しにはDWを、ウイルス無しにはPBS-BA/PSを添加し同様にインキュベートした。インキュベート後、バイオスピカラム6（ゲルろ過担体バイオゲルP-6、バイオラッド）にアプライし、1000×*g*、4分間遠心し、NA阻害薬とウイルス酵素の複合体からなる溶出液を回収し、遊離の被験化合物を除去した。直ちにその複合体にNAB中で終濃度100 μMとなるようにMU-NANAを添加し、蛍光プレートリーダーで励起波長360 nm/蛍光波長460 nmで基質添加直後から15分間隔で6時間後まで蛍光を測定した。

7. ウイルス感染マウスでの薬効評価

100 プラーク形成単位 (pfu) の A/Nagasaki/I01/2009v をイソフルラン麻酔したマウスに経鼻感染した。オセルタミビル投与群は感染2時間後から40 および100 mg/kg のオセルタミビルを1日2回経口投与、2時間後に生理食塩水を1回経鼻投与した。CS-8958 投与群は感染2時間後に0.080 および0.24 mg/kg のCS-8958 を1回経鼻投与、2時間後から生理食塩水を1日2回経口投与した。コントロール群は薬剤投与群に合わせて生理食塩水を経鼻投与、経口投与した。経鼻投与はイソフルラン麻酔下で行った。感染39, 63, 87時間後にマウス肺を摘出し、PBS-BA/PSでホモジナイズした。時点毎に3匹のマウスを使用した。ホモジナイズ液は10倍希釈系列を調製し、6穴プレートで増殖させたMDCK細胞に37°C、1時間接触させた。細胞はPBSで洗った後、MoEM/BA寒天培地を加え、37°C下、5% CO₂ インキュベーターで約42時間培養した。プラーク数を基に肺中のウイルス力価を算出した。統計解析はSAS System Release 8.2を用いて2元配置分散分析で行い、*p*値は、*: *p*<0.05, **: *p*<0.01, ***: *p*<0.001として記載した。

結果

1. ノイラミニダーゼ阻害活性

ノイラミニダーゼ活性を50%に阻害する濃度 (IC₅₀ 値) を表1に示した。ラニナミビルは他のNA阻害薬と同様に強い阻害活性を有し、17株に対するIC₅₀ 値の中央値は1.50 nM (最小値1.21 nM~最大値2.11 nM) であった。他2剤について、IC₅₀ 値を同様に記すと、ザナミビルは1.32 nM (1.04 nM~1.97 nM)、オセルタミビル活性体は0.655 nM (0.468 nM~0.831 nM) であった。

2. 培養細胞系でのウイルス増殖抑制活性

pdm(H1N1)2009ウイルス3種のMDCK細胞での増殖における各種薬剤のウイルス産生抑制効果をプラーク減少法で検討し、プラーク数を50%にする濃度 (EC₅₀) を表2に示した。EC₅₀ 値はラニナミビルが1.5~9.4 nM、ザナミビルは12~17 nM、オセルタミビル活性体は4.3~14 nMであった。

3. ノイラミニダーゼへの結合力の比較

pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルス INF139株のノイラミニダーゼ結合からの解離を調べ、図1に示した。オセルタミビル活性体は薬剤非添加よりやや遅れるもののほぼ同じ傾きで酵素活性が観察された。ザナミビルが次ぎに解離が遅く、ペラミビルとラニナミビルの解離は非常に遅いものの、ラニナミビルの方がややペラミビルより遅い解離を示した。

4. マウス感染モデル系でのウイルス産生抑制効果

pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルス A/Nagasaki/I01/2009v の100 pfu をマウスに感染させ、薬剤を投与した時の肺中ウイルス力価の推移を図2に示した。ウイルスを感染させると薬剤非投与の時、ウイルス力価は3日後にピークを迎え、

表1. パンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに対する各種のイラミニダーゼ阻害薬の阻害活性

pdm(H1N1)2009 ウイルス	IC ₅₀ (nM)					
	ラニナミビル		ザナミビル		オセルタミビル活性体	
	IC ₅₀	95%信頼区間	IC ₅₀	95%信頼区間	IC ₅₀	95%信頼区間
A/Nagasaki/I01/2009v	1.47	1.19-1.90	1.23	1.07-1.42	0.555	0.507-0.609
INF007	1.67	1.63-1.71	1.48	1.46-1.51	0.712	0.663-0.763
INF010	1.50	1.20-1.98	1.35	1.15-1.63	0.655	0.584-0.736
INF020	1.75	1.72-1.77	1.54	1.52-1.56	0.780	0.715-0.847
INF023	1.55	1.22-2.09	1.32	1.14-1.56	0.632	0.566-0.708
INF034	1.21	1.03-1.44	1.19	1.06-1.34	0.679	0.605-0.755
INF095	1.74	1.70-1.77	1.55	1.53-1.57	0.831	0.782-0.883
INF126	1.50	1.21-1.95	1.35	1.17-1.60	0.750	0.703-0.798
INF138	1.37	1.13-1.70	1.23	1.08-1.43	0.607	0.552-0.668
INF139	1.66	1.64-1.67	1.51	1.46-1.56	0.621	0.515-0.752
INF189	1.28	1.01-1.70	1.04	0.704-1.74	0.468	0.333-0.681
INF223	1.85	1.66-2.07	1.66	1.54-1.79	0.732	0.682-0.783
INF324	2.11	1.65-2.98	1.97	1.32-3.86	0.707	0.554-0.894
INF331	1.52	0.971-2.88	1.23	0.936-1.71	0.592	0.496-0.702
INF407	1.40	0.715-4.38	1.18	0.780-1.95	0.652	0.510-0.848
INF442	1.23	0.926-1.73	1.17	1.04-1.31	0.657	0.505-0.817
INF444	1.28	1.03-1.66	1.13	0.914-1.43	0.620	0.532-0.725
median	1.50		1.32		0.655	

IC₅₀: 50%酵素阻害濃度 (50% inhibitory concentration)

4日後に若干の減少が見られるウイルス増殖パターンを示し、最大で肺当たり約10⁶ pfuまで増殖した。いずれの薬剤とも使用した投与量、投与回数で有意なウイルス減少効果を示し、感染3日後のピーク時において、オセルタミビルの40 mg/kg、100 mg/kg 反復投与はおおむね0.5 logの、CS-8958の0.080 mg/kg、0.24 mg/kgの単回投与は、それぞれ0.75 log、1 logのウイルス減少が観察された。CS-8958単回投与は両投与量ともオセルタ

ミビル 100 mg/kg 反復投与に比べ、有意なウイルス減少効果を示した。

考察

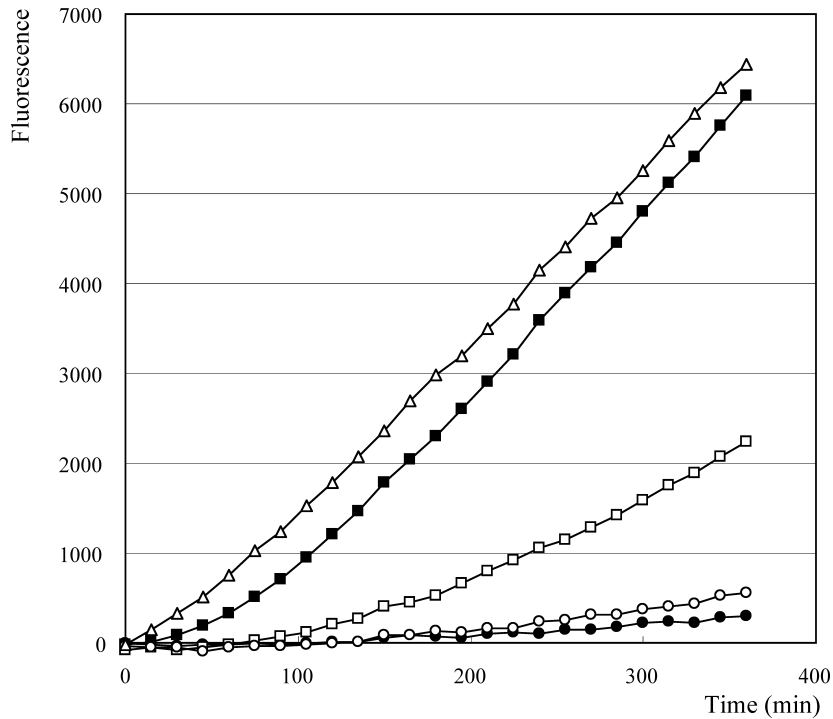
NGUYENらは、基質として本報告と同じMU-NANAを用いた方法で、pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルスのニューヨーク、ワシントン、シンガポール分離株を用いた成績を発表した¹⁹⁾。

表2. パンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルスの培養細胞系での増殖に対する各種のイラミニダーゼ阻害薬の阻害効果

pdm(H1N1)2009 ウイルス	EC ₅₀ (nM)		
	ラニナミビル	ザナミビル	オセルタミビル活性体
INF007	5.6	12	14
INF023	1.5	13	4.3
INF126	9.4	17	12

EC₅₀: 50%有効濃度 (50% effective concentration)

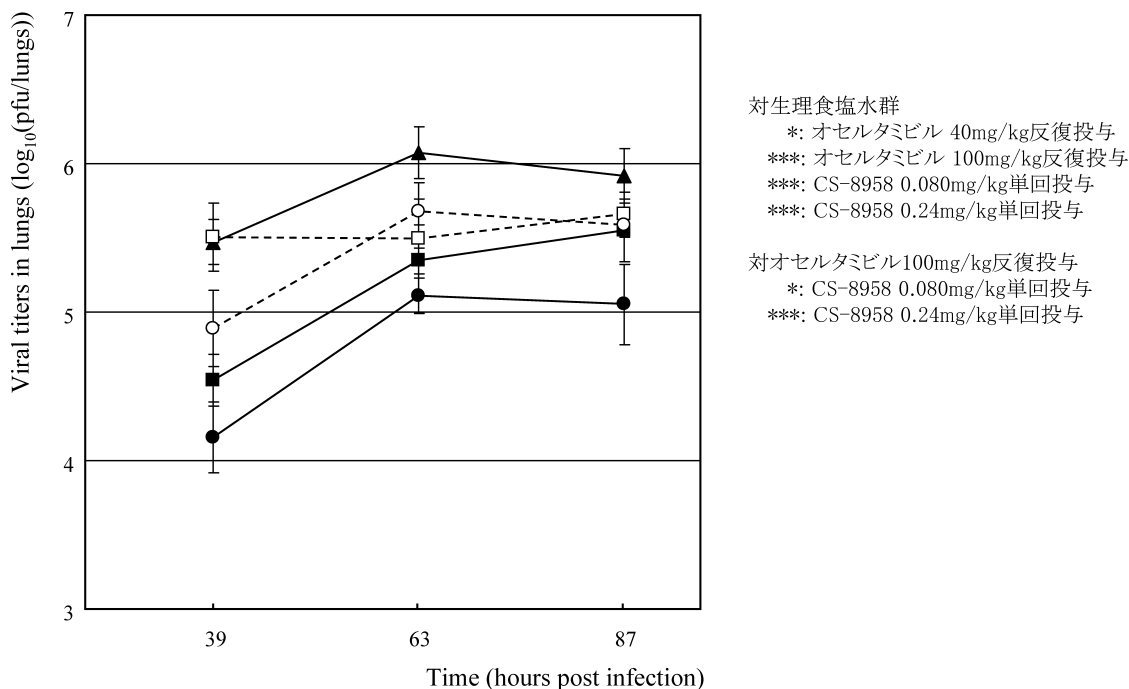
図1. パンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルスノイラミニダーゼへのラニナミビルの結合安定性



pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルス INF139 を過剰量の各種 NA 阻害薬, オセルタミビル活性体 (■), ザナミビル (□), ペラミビル (○), ラニナミビル (●), あるいは蒸留水 (△) と混合した後, 遊離の NA 阻害薬をバイオスピカラムで除去し, ウイルス NA と NA 阻害薬複合体を調製した。そこに NA の基質である MU-NANA を添加し, NA 反応を 360 分まで追跡し, NA 阻害薬の NA からの解離を比較した。オセルタミビル活性体, ザナミビル, ペラミビル, ラニナミビルの順に解離し, ラニナミビルの解離が最も遅く, 強い結合を示した。

その 3 株の平均 IC₅₀ 値は, ラニナミビルは 0.74 nM, ザナミビルは 1.20 nM, オセルタミビル活性体は 1.90 nM, ペラミビルは 0.22 nM であった。また, Itoh らは pdm(H1N1)2009 インフルエンザウ

図2. パンデミック (H1N1)2009 インフルエンザウイルス感染マウスでのCS-8958の薬効



pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルス A/Nagasaki/I01/2009v を 100 プラーク形成単位、マウスに経鼻感染し、その2時間後からオセルタミビルを 40 mg/kg (□) および 100 mg/kg (○) を 1日2回経口投与、あるいは2時間後に CS-8958 を 0.080 mg/kg (■) および 0.24 mg/kg (●) を 1回経鼻投与、あるいは生理食塩水 (▲) を投与した。感染 39, 63, 87時間後にマウス肺を摘出し (各時点 n=3)、肺中のウイルス力価をプラーク法で測定した。

イルスのカリフォルニア (初期分離株)、大阪分離株を用い、ラニナミビルは 0.41~0.44 nM、ザナミビルは 0.32~0.43 nM、オセルタミビル活性体は 0.96~1.6 nM と報告した²³⁾。長崎県で分離された pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルス NA の NA 阻害薬 3 剤に対する感受性は、他国や国内他地域の分離株とほぼ同等であった。また、長崎地域で 2009 年の 7 月から 12 月の 6 ヶ月の間、NA 阻害薬 3 剤に対し分離ウイルスは非常に安定した感受性を維持していた。これらのことは pdm(H1N1)2009 ウイルスの NA は初めて分離された 2009 年 4 月以降から比較的安定に維持されていることを示唆している。

さらに、NGUYEN らは大阪、ワシントン、香港、シンガポールで分離された H274Y 変異をもつ 4 種の pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルスの NA

に対する平均 IC₅₀ 値が、ラニナミビルが 1.14 nM、ザナミビルが 1.04 nM、オセルタミビル活性体が 1146 nM、ペラミビルが 124 nM と報告した¹⁹⁾。この数値は本報告と同じ MU-NANA を基質として測定した値から計算した。この IC₅₀ 値は野生株 IC₅₀ 値のそれぞれ、1.5 倍、0.87 倍、603 倍、564 倍の活性低下であり、pdm(H1N1)2009 ウイルスの H274Y 変異に対し、ラニナミビルとザナミビルはほぼ阻害活性を維持しているが、オセルタミビル活性体とペラミビルは共に 600 倍程度の阻害活性低下があることを意味している。季節性 H1N1 型インフルエンザウイルスの H274Y 変異を有するオセルタミビル耐性ウイルスはわずか 1 年でそれまでの感受性株に置換わった^{12~15)}。pdm(H1N1)2009 インフルエンザウイルスにおいても、既に H274Y 変異を持つオセルタミビル耐性

ウイルスが世界的に出現している^{17~19)}。A型インフルエンザウイルスの変異スピードは極めて速く、かつOne Lineage進化をすることが知られている²⁸⁾ことから、H274Y変異をもつpdm(H1N1)2009インフルエンザウイルスが再び一気に蔓延する危険性を示唆している。

培養細胞系でのpdm(H1N1)2009インフルエンザウイルスの増殖をラニナミビルは $EC_{50}=1.5\sim 9.4$ nMで強く阻害し、この値はザナミビルやオセルタミビル活性体の EC_{50} 値より強いものであった(表2)。NA阻害活性はラニナミビルがザナミビルやオセルタミビル活性体より同等ないしやや弱い値を示しており(表1)、この逆転現象は図1の結果から説明可能と考えている。即ち、ラニナミビルはオセルタミビル活性体やザナミビルよりNAに対し強い結合を示した。酵素阻害は30分の反応であるのに対し、ウイルス増殖阻害は2日の反応であり、解離速度の遅いラニナミビルは長い反応を観察するウイルス増殖阻害では、他剤より阻害活性が強く出たと考えられる。この強い結合性は季節性H1N1ウイルス、H3N2ウイルス、B型ウイルスに対しても観察されることを我々は報告している²¹⁾。

マウス感染モデル系においてCS-8958は0.080 mg/kg、0.24 mg/kgの単回経鼻投与で有意なウイルス産生抑制効果を示した。この投与量は小児、成人を対照に行われた臨床吸入投与量(20 mg、40 mg)よりやや低い用量である。CS-8958はオセルタミビルの100 mg/kgの反復経口投与より有意に強くウイルス産生を抑制したが、オセルタミビルの投与量は臨床投与量75 mg/body/shot(成人、体重37.5 kg以上の小児)、2 mg/kg(小児)よりかなり高い。この理由は不明であるが、薬物動態的側面を含めた検討が必要であると思われる。

NA阻害作用による抗インフルエンザ薬は既存の3剤にCS-8958が加わると、反復投与が必要な経口剤と吸入剤、1回投与の点滴静注剤、1回投

与で治療が完結する吸入剤と医療現場における薬剤の選択肢が広がることになる。耐性ウイルスの出現状況、患者の年齢や重篤度、服薬コンプライアンスなど、医療現場での多様な状況に最適な薬剤選択ができるようになることが期待される。

謝辞

pdm(H1N1)2009インフルエンザウイルスをご恵与下さいました長崎大学熱帯医学研究所 森田公一博士および久保 亨博士、日本赤十字社長崎原爆諫早病院 福島喜代康博士に感謝申し上げます。動物実験は第一三共株式会社生物医学研究所 友澤尚徳氏に担当して頂きました。感謝致します。

引用文献

- 1) FIORE, A. E.; D. K. SHAY, P. HABER, *et al.*: Prevention and control of influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm. Rep. 56 (RR-6): 1~54, 2007
- 2) WRIGHT, P. F. & R. G. WEBSTER: Orthomyxoviruses, pp. 1534~1579. In D. M. KNIPE, P. M. HOWLEY, D. E. GRIFFIN, *et al.* (ed.), Fields virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001
- 3) Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team: Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 360: 2605~2615, 2009
- 4) <http://idsc.nih.gov/idwr/douko/2010d/10douko.html#chumoku1>
- 5) HAY, A. J.; A. J. WOLSTENHOLME, J. J. SKEHEL, *et al.*: The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. EMBO J. 4: 3021~3024, 1985
- 6) BRIGHT, R. A.; D. K. SHAY, B. SHU, *et al.*: Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006

- influenza season in the United States. *JAMA* 295: 891~894, 2006
- 7) BRIGHT, R. A.; D. SHAY, J. BRESEE, *et al.*: High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents—United States, 2005–06 influenza season. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55: 44~46, 2006
 - 8) GUBAREVA, L.; M. OKOMO-ADHIAMBO, V. DEYDE, *et al.*: Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58: 433~435, 2009
 - 9) KISO, M.; Y. MITAMURA, K. SAKAI-TAGAWA, *et al.*: Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 364: 759~765, 2004
 - 10) HATAKEYAMA, S.; N. SUGAYA, M. ITO, *et al.*: Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA* 297: 1435~1442, 2007
 - 11) LACKENBY, A.; O. HUNGNES, S. G. DUDMAN, *et al.*: Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Euro. Surveill.* 13: 1~2, 2008
 - 12) Infectious Agents Surveillance Report 29: 334~339, 2008
 - 13) Infectious Agents Surveillance Report 30: 287~297, 2009
 - 14) http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1webupdate20090318%20ed_ns.pdf
 - 15) <http://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2008-2009/weekly15.htm>
 - 16) LE, Q. M.; M. KISO, K. SOMEYA, *et al.*: Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437: 1108, 2005
 - 17) http://www.who.int/csr/disease/swineflu/laboratory18_06_2010/en/index.html
 - 18) Infectious Agents Surveillance Report 31: 173~178, 2010
 - 19) NGUYEN, T.; T. G. SHEU, V. P. MISHIN, *et al.*: Assessment of pandemic and seasonal influenza A (H1N1) virus susceptibility to neuraminidase inhibitors in three enzyme activity inhibition assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 3671~3677, 2010
 - 20) YAMASHITA, M.; T. TOMOZAWA, M. KAKUTA, *et al.*: CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 186~192, 2009
 - 21) KISO, M.; S. KUBO, M. OZAWA, *et al.*: Efficacy of the new neuraminidase H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 6: e1000786, 2010
 - 22) KUBO, S.; T. TOMOZAWA, M. KAKUTA, *et al.*: Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 1256~1264, 2010
 - 23) ITOH, Y.; K. SHINYA, M. KISO, *et al.*: *In vitro* and *in vivo* characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460: 1021~1025, 2009
 - 24) KOYAMA, K.; M. TAKAHASHI, M. OITATE, *et al.*: CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a favorable long retention profile in the mouse respiratory tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4845~4851, 2009
 - 25) SUGAYA, N. & Y. OHASHI: Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate (CS-8958) versus oseltamivir as treatment for children with influenza virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2575~2582, 2010
 - 26) WATANABE, A.; S-C. CHANG, M. J. KIM, *et al.*: Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: a double-blind, randomized, non-inferiority clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* (in press)
 - 27) KUBO, T.; M. AGOH, L. Q. MAI, *et al.*: Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J. Clin. Microbiol.* 48: 728~735, 2010
 - 28) PALESE, P. & M. YAMASHITA: Evolutionary lin-

eage and molecular epidemiology of influenza A, B, and C viruses. pp. 119~129, *In* E. KURASTAK, R. G. MARUSYK, F. A. MURPHY,

et al. (ed), Applied Virology Research. Plenum Publishing Corporation. New York, NY. 1990

In vitro and *in vivo* effects of a long-acting anti-influenza agent CS-8958 (laninamivir octanoate, Inavir[®]) against pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses

SHUKU KUBO, MASAYO KAKUTA and MAKOTO YAMASHITA
Daiichi Sankyo Co. Ltd., Biological Research Laboratories

Laninamivir is a novel neuraminidase inhibitor of influenza viruses and it has been reported that its prodrug, CS-8958 shows a long-lasting characteristics. Using viruses isolated in Nagasaki of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus which cause pandemic in 2009, it was shown that laninamivir has a strong inhibitory activities against their neuraminidases and virus replication in cultured cells, and strong binding stability to the virus NA. Furthermore, a single intranasal administration of CS-8958 showed a superior reduction of virus load in lungs in mouse infection model. These suggest that CS-8958 will work as a long-acting neuraminidase inhibitor to an infection with pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses as well.