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

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

池松，秀之
九州大学病院検査部

鄭，湧
九州大学大学院医学研究院病態修復内科学（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/10.15017/1670655

出版情報：福岡醫學雜誌. 107 (5), pp.98-104, 2016-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

福岡医誌　107(5)：98―104，2016

原　　著

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

[1)]九州大学病院検査部
[2)]九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学（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)]，
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)]

Neuraminidase Amino Acid Sequences of Influenza A/H3N2 and B Viruses Isolated from Influenza Patients in the 2014/15 Japanese Influenza Season

Hideyuki Ikematsu[1)]，Yong Chong[2)]，Kenjiro Shirane[3)]，Hidehiro Toh[3)]，
Hiroyuki Sasaki[3)]，Shinya Matsumoto[1)]，Nozomi Noda[1)]，Taeko Hotta[1)]，
Takeshi Uchiumi[1)4)] and Dongchon Kang[1)4)]

[1)]Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan
[2)]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 Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Abstract

Background : Neuraminidase (NA) is a surface protein essential 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 : Forty A/H3N2 and 19 B influenza virus isolated from patients in the 2014/15 influenza season were analyzed. The IC_{50} was determined by a neuraminidase inhibition assay using a fluorescent substrate. Viral RNA was amplified by RT-PCR and the genome was sequenced using a next generation sequencer. The deduced amino acid sequences were analyzed.

Results : There was no AA change in the NA catalytic site of the A/H3N2 and B viruses isolated in the 2014-15 influenza season. There was no significant relation between the NA amino acids and the IC_{50} of the four NA inhibitors for A/H3N2 or B viruses.

Corresponding author : Hideyuki Ikematsu
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel：+81-92-435-1150　Fax：+81-92-435-1151　E-mail：ikematsu@gray.plala.or.jp

Conclusion : The catalytic site of NA was highly conserved for these A/H3N2 and B viruses. No emergence of NA amino acid mutations related to the sensitivity of the four currently used NA inhibitors was observed.

Key words：Influenza・A/H3N2・B・Neuraminidase・Amino acid 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，その流行にはウイルスの遺伝子変異が関与していることが広く認識されている．この宿主の免疫から逃れるための変異は主としてウイルスの表面蛋白であり，免疫応答の標的となるヘムアグルチニン（hemagglutinin，HA）の変異が重要であり，ワクチンの効果の低下もこの変異によりもたらされていると考えられている[1]．このヘムアグルチニンの変異にノイラミニダーゼ（neuraminidase，NA）の変異も関与している可能性があるが，詳細は解明されていない．

日本では，インフルエンザの治療に NA のシアル酸への結合を阻害する 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 Zn），オセルタミビルリン酸塩（商品名：タミフル，以下 Os），ペラミビル水和物（商品名：ラビアクタ，以下 Pm），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 Ln）の 4 剤が使用されている．

これまで，流行したインフルエンザウイルスにおいて，NA 阻害薬への耐性が問題になったのは，2007 年より出現した，Os 耐性となる NA に H275Y 変異を持つ A/H1N1（ソ連型）で，この耐性変異が臨床効果の低下をもたらしたことが確認されている[2)3)]．2009 年より出現した A/H1N1 pdm09 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いる[4)5)]．一方，H3N2 や B では，*in vitro* で NA 阻害薬への感受性低下を示す NA の変異が知られているが，これまで耐性ウイルスの流行は確認されていない．NA 阻害薬への耐性化は臨床上重要な問題であり，現在，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[6)]．

我々は，2011/12 年流行期（以下流行期略）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 NA 阻害薬の感受性との関連について検討を継続している[7)8)]．今回，2014/15 年に分離された A/H3N2，B ウイルスについて NA 全領域の遺伝子を解析し，遺伝子配列より推定される AA 配列と NA 阻害薬の IC_{50} 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[9)~12)]．その調査において 2014/15 年に全国 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（Os，Zn，Pm，Ln）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[9)]．2014/15 年に分離された A/H3N2 は 200 株で，その中から 40 株をランダムに選択し解析の対象とした．また分離された B ウイルスの 19 株はすべて解析の対象とした．

NA 遺伝子の決定

NA 遺伝子の決定はこれまでの報告と同様におこなった．その概略は，A/H3N2 ウイルスでは，8 分節共通の Universal primer を，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[13)14)]．

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．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

はweb上に公開されているソフトウェアMEGA 6.0を用いて行った.

結 果

A/H3N2のNAとIC50

A/H3N2 40株のAAコンセンサス配列と比較して変異が認められた部位におけるAAをTable 1にOsのIC_{50}値が高い株より示した.NA領域468 AA中25ヶ所に変異がみられた.既知のcatalytic siteの耐性変異であるE119V,R292Kはみられなかった.NAのcatalytic site全て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阻害薬それぞれにおいて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のNAとIC_{50}

B 19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,OsのIC_{50}が高い株よりTable 2に示した.

466 AA中14ヶ所にコンセンサス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に変異はみられなかった.既知のcatalytic siteの耐性変異であるH273Yはみられなかった.また,その他の既知の耐性変異であるE105K,E117A,E117G,Q138R,P139S,G140Rはみられなかった.4つのNA阻害薬それぞれにおいて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.

考 察

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[15].しかし,それらの変異は,2014/15年に分離されたA/H3N2株にもみられず,2011/12年からの検討においてみられていない.A/H3N2のNA領域の変異について検討を続けているが,*in vitro*で確認されているこれらの既知の耐性変異はみられておらず,現在日本で行なわれているインフルエンザ耐性サーベイランスでもA/H3N2でのNA阻害薬耐性ウイルスの流行は報告されていないことから,臨床でのNA阻害薬の一般的な使用によるこれらの耐性変異は容易には起こらないものと考えられる.

A/H3N2のNA catalytic siteにしばしば見られるD151N変異は,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].我々は2011/12年に48株中1株,2012/13年に48株中4株のD151N変異を報告したが,2013/14年および今回解析したウイルスに,この変異はみられなかった.D151N変異以外にはcatalytic siteにこれまでに解析した臨床分離株で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以外には25の部位に変異がみられたが,それぞれの薬剤のIC_{50}に影響を与えると考えられる変異はみつからなかった.最終的に,今回の検討では,NA阻害薬の感受性低下に関連するNAの変異は2014/15年まで分離株には認められず,日本では耐性化の傾向はないと考えられる.

NA領域には酵素活性だけでなく,免疫のエピトープとなる部位があることが報告されている[17)~19)].B細胞のエピトープであるAA369では,ワクチン株のAAは2011/12年はKであったが,2012/13年と2013/14年はTであった.臨床分離株ではTが2011/12年は48株中7株,2012/13年は48株中14株であったが,2013/14年は20株中1株のみで,残りの株はKであり,2014/15年は全てKであった.この部位におけるKの増加には2012/13年以降のワクチン株のpressureが関与している可能性が考えられる.インフルエンザウイルスの流行形成については,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からも有用な情報が得られる可能性があると思われる.

Bにおいて,A/H1N1pdm09のH275Y変異に相当するH273Y変異が,OsとPmのIC_{50}の著しい上昇を起こすことが知られている[4)5)].しかし,2014/15年のBにはH273Y変異はみられなかった.2013/14年もこの変異はみられていない.Bにおいて,この変異は自然界では起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[20)21)].しかし,これらの変異は今回の解析では

Table 1 Comparison of NA AA for A/H3N2 viruses isolated in the 2014/15 influenza season and IC_{50} value of the isolates.

Consensus AA	AA Position																									IC_{50} (nM) of			
	44	77	93	148	155	176	194	215	221	238	240	267	287	303	310	315	320	346	367	370	386	392	402	464	466				
	S	I	G	T	Y	I	V	I	E	A	V	K	I	V	H	S	G	G	N	L	P	I	D	L	L	Os	Zn	Ln	Pm
DS-311	–	–	D	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	1.4	2.6	5.0	0.96
DS-317	–	M	D	–	–	–	I	–	–	T	–	T	–	–	–	–	–	–	–	S	S	–	–	I	–	1.3	2.8	4.6	0.93
DS-462	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	N	–	–	1.3	2.3	5.4	0.92
DS-386	–	M	D	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	I	–	1.1	2.3	5.2	0.79
DS-68	–	–	–	–	–	–	–	–	–	T	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	0.99	2.1	4.2	0.81
DS-427	–	–	D	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	0.98	1.8	5.3	1.2
DS-323	P	–	D	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	0.98	2.6	4.9	0.78
DS-384	–	–	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	0.95	2.9	6.6	0.87
DS-276	–	–	D	–	–	–	–	–	–	T	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.95	2.4	4.1	0.62
DS-388	–	–	–	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	Y	–	E	–	–	–	–	–	N	–	–	0.94	2.2	2.8	0.60
DS-85	P	–	D	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	0.92	2.8	4.7	1.1
DS-553	–	–	D	–	–	–	–	–	–	T	–	T	V	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	I	–	0.90	2.3	4.7	0.82
DS-499	P	–	D	–	–	–	–	V	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.89	2.7	4.5	0.82
DS-282	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	V	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	0.89	0.9	4.6	0.29
DS-485	–	M	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	0.87	2.6	4.7	0.88
DS-451	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	0.87	2.5	4.8	0.79
DS-288	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	I	–	–	–	Y	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	0.86	2.4	4.2	0.69
DS-442	–	–	–	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	0.85	1.3	4.9	0.36
DS-247	–	–	D	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	0.83	2.3	5.0	0.80
DS-284	–	–	D	–	–	M	–	V	–	–	–	–	V	–	Y	–	–	D	S	–	–	T	N	I	–	0.82	2.4	5.0	0.55
DS-547	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	0.76	1.9	4.2	0.79
DS-316	–	–	D	–	–	–	–	V	D	T	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	0.75	1.8	2.8	0.57
DS-508	–	–	–	–	–	–	I	V	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	I	–	0.74	1.9	2.6	0.69
DS-461	–	–	D	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	0.73	1.9	2.4	0.57
DS-164	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	0.73	1.8	2.4	0.49
DS-248	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	0.70	1.9	2.7	0.61
DS-217	–	–	–	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	I	–	0.69	1.7	2.7	0.69
DS-472	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	–	–	–	–	S	–	–	N	–	–	0.68	1.2	2.3	0.44
DS-383	–	–	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	I	–	0.67	1.8	2.5	0.60
DS-34	–	–	D	–	H	–	I	–	–	T	–	–	–	–	Y	–	–	–	S	–	–	–	–	–	–	0.67	1.5	2.2	0.65
DS-271	–	–	–	–	–	–	–	V	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	N	I	F	0.61	1.9	2.2	0.63
DS-448	–	–	–	–	–	–	I	–	D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	0.61	2.1	2.3	0.56
DS-424	–	–	–	–	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	–	0.61	1.7	2.4	0.54
DS-542	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	N	–	–	0.59	1.7	2.0	0.46
DS-126	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	S	–	–	–	I	–	0.58	1.9	2.7	0.72
DS-482	–	–	–	–	–	–	I	V	–	–	–	–	V	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	0.52	1.5	1.8	0.45
DS-135	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.43	1.1	1.9	0.46
DS-47	–	–	–	–	–	–	I	–	–	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	S	–	–	N	–	–	0.43	1.5	2.1	0.42
DS-84	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	Y	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.40	1.7	1.3	0.49
DS-403	–	–	–	K	–	–	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.31	1.5	2.1	0.44

Table 2 Comparison of NA AA for B viruses isolated in the 2014/15 influenza season and IC_{50} value of the isolates.

Consensus AA	AA Position														IC_{50} (nM) of			
	27	42	60	62	76	219	272	320	329	340	342	392	436	465	Os	Zn	Ln	Pm
	L	P	V	A	P	K	K	K	N	N	D	D	K	I				
DS5-541	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	24	11	17	5.5
DS5-296	–	–	–	–	S	–	–	–	–	–	–	E	–	–	23	8.6	17	3.6
DS5-490	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	–	23	8.5	17	4.2
DS5-489	S	–	–	–	–	–	–	–	–	D	–	–	–	–	22	8.8	16	4.0
DS5-225	–	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	22	8.2	15	4.3
DS5-369	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	V	22	8.4	14	4.2
DS5-546	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	20	13	26	4.8
DS5-396	–	–	–	–	–	N	E	E	D	–	–	–	–	–	20	9.8	19	5.0
DS5-516	–	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	–	20	9.1	16	4.6
DS5-538	–	–	–	–	S	–	–	–	–	D	–	–	–	–	20	9.3	16	4.0
DS5-558	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	N	–	–	–	19	11	25	4.6
DS5-560	–	–	–	T	–	N	E	–	–	–	N	–	–	V	19	9.3	22	4.9
DS5-551	S	Q	–	–	–	–	–	–	–	–	N	E	–	–	19	13	21	5.4
DS5-511	S	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	19	12	18	4.2
DS5-535	S	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	18	8.7	15	3.4
DS5-550	–	–	–	–	–	N	E	–	D	–	–	–	M	–	17	11	21	4.6
DS5-555	–	–	–	T	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	17	10	20	4.4
DS5-517	–	–	–	–	S	N	–	–	–	D	–	–	–	–	17	8.9	14	2.8
DS5-512	S	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	E	–	–	13	8.0	18	2.8

みられなかった．B ウイルスにおいても臨床での NA 阻害薬の一般的な使用による耐性変異は容易には起こらないものと考えられる．

2013/14 年に患者より分離された B ウイルスの NA 領域と薬剤感受性との関連についての検討では，Os と Ln の IC_{50}が高い方のウイルスと Zn と Pm の IC_{50}が高い方のウイルスに，それぞれいくつかの変異がみられ，薬剤感受性との関連が疑われた[8]．しかし，今回の 2014/15 年の B ウイルスには Os と Ln の IC_{50}高値との関連が疑われた K125N や E404K はみられず，Zn と Pm の IC_{50}高値との関連が疑われた R186K もみられず，P42Q が 1 株にみられたのみであった．これらの変異は消失していることより，現時点で NA 阻害薬の感受性低下に関連する変異が蓄積されているとは考えられなかった．

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)]．2013/14 年は山形系統が優位で 70％を占めていたが，日本におけるサーベイランスでは 2014/15 年は殆どが山形系統であった[24)]．今回解析の対象となった B の 19 株はすべて山形系統であることが HA 領域の解析であきらかにされている（data not shown）．2013/14 年と 2014/15 年の NA 領域の比較をおこなったが，両系統それぞれに特異的な AA はみいだされなかった．NA 領域のみから山形系統かビクトリア系統であるかについて鑑別することは困難であるとともに，NA 領域の系統による差から薬剤感受性に違いが生じるとは考えにくいと思われた．

今回 2014/15 年流行期に分離された A/H3N2 および B ウイルスについて NA 領域の解析を行なったが，NA の catalytic site は非常によく保存されており，catalytic site 以外の部位も含め NA 領域に NA 阻害薬の耐性化に関連する変異の出現やその蓄積は現時点ではみられていないと考えられる．

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．

参 考 文 献

1） Carrat F and Flahault A : Influenza vaccine : the challenge of antigenic drift. Vaccine. 25 : 6852–6862, 2007.
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, N Engl.J Med. 365 : 2541–2542, 2011.
5) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y and Tashiro M : Characterization of a large cluster of influenza A (H1N1) pdm09 viruses cross–resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013–2014 influenza season in Japan, Antimicrob Agents Chemother. 59 : 2607–2617, 2015.
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) 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.
8) 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：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.
9) 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.
10) 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.
11) 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.
12) 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.
13) 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.
14) 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.
15) 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.
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) Colman PM, Varghese JN and Laver WG : Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature 303 : 41–44, 1983.
18) 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.
19) 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.
20) 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.

21) Farrukee 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.

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) http://www.nih.go.jp/niid/images/iasr/arc/gv/1415/data1415.2j.pdf

(Received for publication May 8, 2016)