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

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

池松，秀之
久留米臨床薬理クリニック

鄭，湧
九州大学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/10.15017/1498215

出版情報：福岡醫學雜誌. 106 (1), pp.16-22, 2015-01-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

福岡医誌　106(1)：16―22，2015

原　　著

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

[1)] 久留米臨床薬理クリニック
[2)] 九州大学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)]，浦田美秩代[4)]，堀田多恵子[4)]，内海　健[5)]，康　東天[5)]

Analysis of Influenza A/H3N2 Neuraminidase Genes Obtained from Influenza Patients in the 2011/12 and 2012/13 Seasons in Japan

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

[1)]Kurume Clinical Pharmacology Clinic, Applied Bio-Pharmatech, Kurume, Japan
[2)]Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 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
[5)]Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Abstract

Background : Influenza virus has neuraminidase (NA), a surface protein with enzymatic activity that is essential for virus replication. Mutation may affect the effectiveness of NA inhibitors that are used for the treatment of influenza patients. In this study, we determined the NA gene sequences from the clinical isolates of influenza patients to examine the chronological genetic changes and the relation to drug susceptibility.

Methods : For 96 A/H3N2 virus isolates the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) (48 each from the 2011-12 and 12-13 influenza seasons) was measured. RT-PCR was done with extracted viral RNA, followed by nucleotide sequencing.

Results : One putative amino acid mutation, D151N, was found in an NA activity-related cite in five of ninety-six tested isolate. The mutation did not affect the IC_{50} value. The mutations identified at amino

Address correspondence :
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

acid positions 387 and 400 were statistically correlated with an increased IC_{50} value, although the change was less than ten times, suggesting no significant difference in the clinical effectiveness. A small number of isolates showed mutation in the T and/or B cell epitope region of NA.
Conclusion : No mutation that affected the IC_{50} value or effectiveness of NAIs was detected. Antigenic mutations of NA, which influence the selection of epidemic strains, were not determined. Continuous observation will be necessary to further clarify the genetic features of NA.

Key words : Influenza・Neuraminidase・Genes・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，健康上，社会上の大きな問題であるが，なかでも A/ H3N2（香港型）ウイルスは，病原性が最も高いとされている．現在，日本では，抗インフルエンザ薬として，neuraminidase（NA）のシアル酸への結合部位を阻害する NA 阻害薬（NAIs）4 剤が臨床で使用されている[1]．インフルエンザウイルスの中で A/ H1N1（ソ連型）において，NA 阻害薬であるオセルタミビルへの感受性を低下させる変異により，オセルタミビルの臨床効果が減弱することが報告されている[2)3)]．H3N2 についても，NA 阻害薬への感受性低下を起こすことが知られており，既知の変異部位についてのサーベイランスは行われている[4]．しかし，まとまった数の臨床分離株について，NA の全領域の変異と NA 阻害薬への薬剤感受性との関連を検討した報告はみられない．

また，インフルエンザが流行を繰り返す主な原因として，hemagglutinin（HA）の変異により，抗原性を変化させること（antigenic drift）が重要とされている[5]．しかし，NA についても，T 細胞や B 細胞の抗原として認識される部位が存在することが分かっており[6)~8)]，NA に対して誘導される免疫能は，生体防御上一定の役割を果たしていると推測されている．

今回我々は，A 香港型（H3N2）の臨床分離株を用いて，NA タンパクの全領域の遺伝子を解析することで，薬剤感受性に関与する NA 上のアミノ酸（Amino Acid, AA）の変異を検討し，薬剤の感受性との関連についても検討した．さらに，NA 領域の T 細胞および B 細胞のエピトープと報告されている部位の変異についても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オクタン酸エステル水和物（商品名：イナビル，第一三共）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，患者からの臨床分離株についてウイルスの薬剤感受性と臨床効果についての検討を継続している[9)~11)]．今回，その調査において全国 23 の参加医療機関から送られたサンプルより分離されたインフルエンザ A/H3N2 型株のウイルスの中から無作為に抽出された 96 株（2011/12 年度株 48 株, 2012/13 年度株 48 株）を対象とした．

NA 遺伝子

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[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 96 株の AA 配列の alignment とコンセンサス配列（consensus sequence）の作成を行い，web 上に公開されているソフトウェア MEGA を用いて系統樹作成を行った．

NA 阻害薬の感受性（IC_{50}）

臨床分離株の NA 阻害薬 4 剤（オセルタミビル，ザナミビル，ラニナミビル，ペラミビル）に対する 50% 阻害濃度（50% inhibitory concentration, IC_{50}）を fluorescence-based neuraminidase inhibition assay により測定した[9]．

統計解析

遺伝子変異の有無による2群間のIC_{50}値について，Wilcoxonの順位和検定により比較を行った．$P < 0.05$を統計学的に有意とした．

結　　果

NA系統樹解析

臨床分離株より得られた塩基配列より，NAの454のAA配列を推定するとともに，遺伝子配列により系統樹を作成した（Fig. 1）． 2011/12, 2012/13年度株は系統樹上でほぼ二分され，一方向性に遺伝的距離が離れていく様式を示した．2011/12年度流行株である48株は，ほぼ2つのcladeに分離されていたが，この分離はAA93のD93ないしはG93によって規定され，2011/12年の臨床分離株のなかでG93を有する株が2012/13年度の臨床分離株に遺伝的距離が近く，2012/13年度株は全株G93であった．

NA活性領域の変異

NAには，ノイラミニダーゼとしての活性領域（catalytic sites）が推定されている[13)14)]．臨床分離株96株から作成された活性領域のコンセンサス配列と，2011/12年および2012/13年度のワクチン株，各分離株の差異をTable 1に示す．活性領域で変異が認められた部位は，AA151のみで，D151N変異であった．この変異は，2011/12年度で1株，2012/13年度で4株に検出され，残りの91株のAA配列はコンセンサスと同一であった．変異がみられた5株と変異がみられなかった91株のIC_{50}値は，Laninamivir, Oseltamivir, Zanamivir, Peramivirで，それぞれ3.9 nMと4.3 nM, 0.9 nMと0.9 nM, 2.3 nMと2.2 nM, 0.8 nMと0.9 nMで，有意な差はみられなかった．また，A/H1N1型でオセルタミビルへの感受性低下を誘導することで知られるH274Y変異は，今回検討した株にはみられなかった．

AA変異とIC_{50}値の関連性

コンセンサス配列から変異を有する分離株と変異がみられない株においてIC_{50}値について検討した．単年度内で，5株以上にみられた変異を有するAA部位で解析した結果，活性領域とはされていないAA387, AA400, AA463部位にて，IC_{50}

Fig. 1　Genetic tree of the influenza A/H3N2 NA gene sequences obtained from the clinical isolates

値が変異を有する株で有意に高く，AA464 では変異を有する株の IC_{50} 値が有意に低かった（Table 2）．しかし，差は比較的少なく，最大でも 20 倍未満であり，臨床的に影響がでる程度のものではないと考えられた．

T および B 細胞の抗原認識領域の変異

T および B 細胞の抗原認識領域（エピトープ）として推定されている AA が T 細胞では 19 カ所，B 細胞では 45 カ所報告されている[6)~8)]．これらの部位について，臨床分離株および 2011/12 年度と 2012/13 年度のワクチン株について，コンセンサスからの AA の変異の有無を検討した（Table 3）．2011/12 年度では，T，B 細胞エピトープ領域の中で，AA 変異を認めた箇所は，それぞれ 4/19，7/45 カ所であった．同様に，2012/13 年度では，それぞれ，1/19，9/45 カ所であった．いずれのシーズンも，ほとんどが単一ないしは少数の分離株にのみ AA 変異が認められた．

考　　察

NA 活性領域における AA 変異が NA 阻害薬の感受性低下，所謂耐性化を起こすことが知られており，N2 では，活性領域の AA119，AA292 に，それぞれ E119V，R292K 変異が起こると，NA 阻害薬の耐性化を誘導することが報告されている[15)16)]．しかし，これまで NA 領域の両端を含むすべての塩基配列を多くの臨床分離株で決定した研究の報告は見当たらず，さらに 4 つの NA 阻害薬すべての IC_{50} 値と比較検討された成績は，世界で初めてと思われる．NA 活性部位の検討では，AA151 の変異，D151N を有する株が検出された（表 1）．AA151 については，AA 変異により NA 阻害薬の感受性低下が報告されているが，この AA 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[17)]．今回検出された AA151 変異株 5 株と残りの株では，4 つの NA 阻害薬全てで，IC_{50} 値に AA151 による有意な差はなく，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．最終的に，NA 阻害薬の感受性低下に関連する NA 活性部位の変化は認められなかったと考えられる．

NA 活性部位以外で，AA 変異により IC_{50} 値の上昇を認めた部位が 3 カ所，低下を認めた部位が 1 箇所みられた（Table 2）．しかし，変異による IC_{50} 値の上昇は 20 倍未満で，WHO の提唱する耐性株の 100 倍以上の上昇のレベルにはなく，臨床的な薬剤の効果には影響がなかったと考えられる．このなかで，AA387，AA400 は B 細胞エピトープ領域にあり，これらの変異が NA 阻害薬の結合阻害につながる生物学的な意味を有しているのかは不明である．また，NA 活性部位以外の変異によっても IC_{50} 値の上昇や低下がみられることから，今後も NA 全領域についての観察が必要であると思われる．

T 細胞および B 細胞のエピトープ部位での変異の解析では，NA 活性部位より多くの変異がみられた（Table 3）．これらの変異が宿主免疫から逃れるために何らかの働きをしている可能性を示唆しているかもしれない．しかし，T 細胞および B 細胞のエピトープの解析でみられた AA 変異の頻度は，HA におけるエピトープ領域の変異の頻度と比較して，明らかに少なかった[18)]．これは，宿主による抗原認識部位として，やはり HA タンパクにおけるエピトープ領域がより重要であることを示唆していると考えられる．しかし，AA93 部位については，2011/12 年度ワクチン株は D93 であることから，G93 を有する株がワクチンによる antigenic pressure により選択され，2012/13 年度の流行株となった可能性があり，系統樹解析ではその可能性が示唆されていると思われる（Fig. 1）．一方，B 細胞のエピトープである AA369 では 2011/12 年度ワクチン株は K369 であり，2011/12 年度ワクチン株は T369 になっているが，2012/13 年度の臨床分離株には T369 が前年度より多くみられている．この変異が antigenic pressure により選択されているとは考えにくいが，2013/14 年度の臨床分離株で T369 がみられなくなるとしたら，antigenic pressure が働いたと考えられるであろう．ワクチンとインフルエンザウイルスの変異による流行株形成との関連性については，HA 領域だけでなく，NA のエピトープ領域における継続した観察も必要と思われる．

2011/12 年度および 2012/13 年度の 2 シーズンにわたり H3N2 型の臨床分離株における NA タンパクの全領域遺伝子解析を行った結果より，

Table 1 Amino acid mutations in the catalytic sites of neuraminidase in the 2011/12 and 2012/13 influenza seasons.

	Amino acid position No.	118	119	121	134	151	152	178	198	224	227	243	274	276	277	292	330	350	425
	Consensus	R	E	Y	L	D	R	W	D	R	E	D	H	E	E	R	D	K	E
	2011/12 vaccine strain[a]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	2012/13 vaccine strain[b]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Season	Isolate No.																		
2011/12 season	20	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2012/13 season	49, 79, 83, 87	–	–	–	–	N	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Other isolates	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

[a]A/Victoria/210/2009(H3N2)
[b]A/Victoria/361/2011(H3N2)

Table 2 IC_{50} values in the mutated sites of neuraminidase in the 2011/12 and 2012/13 influenza seasons.

Amino acid position No.	Drug	mutation (AA)	No. of isolates	IC_{50} value (nM)			*P* value[b]
				Median	Lower 95%CI[a]	Upper 95%CI[a]	
AA387	Laninamivir	mutation (N)	15	6.00	4.48	6.20	
		no mutation (K)	81	3.90	3.68	4.36	0.003
	Oseltamivir	mutation (N)	15	1.00	0.95	1.50	
		no mutation (K)	81	0.85	0.84	0.99	0.023
	Zanamivir	mutation (N)	15	2.90	2.42	3.39	
		no mutation (K)	81	2.20	2.09	2.42	0.008
	Peramivir	mutation (N)	15	0.98	0.90	1.32	
		no mutation (K)	81	0.89	0.85	0.96	0.039
AA400	Laninamivir	mutation (K)	5	5.00	3.79	6.38	
		no mutation (R)	43	4.70	4.25	5.11	0.489
	Oseltamivir	mutation (K)	5	1.20	0.97	1.50	
		no mutation (R)	43	1.00	1.00	1.25	0.319
	Zanamivir	mutation (K)	5	3.20	2.47	3.97	
		no mutation (R)	43	2.30	2.25	2.74	0.039
	Peramivir	mutation (K)	5	0.99	0.78	1.46	
		no mutation (R)	43	0.94	0.90	1.08	0.176
AA463	Laninamivir	mutation (R)	7	5.40	4.86	6.60	
		no mutation (D)	41	4.60	4.13	4.97	0.027
	Oseltamivir	mutation (R)	7	1.40	1.09	1.73	
		no mutation (D)	41	1.00	0.97	1.21	0.035
	Zanamivir	mutation (R)	7	3.20	2.65	3.69	
		no mutation (D)	41	2.30	2.22	2.72	0.018
	Peramivir	mutation (R)	7	1.00	0.88	1.45	
		no mutation (D)	41	0.94	0.89	1.07	0.054
AA464	Laninamivir	mutation (I)	7	1.90	1.62	2.07	
		no mutation (L)	41	3.40	3.55	4.56	< 0.001
	Oseltamivir	mutation (I)	7	0.50	0.43	0.60	
		no mutation (L)	41	0.81	0.76	0.93	< 0.001
	Zanamivir	mutation (I)	7	1.40	0.95	1.80	
		no mutation (L)	41	2.20	2.05	2.50	< 0.001
	Peramivir	mutation (I)	7	0.61	0.51	0.68	
		no mutation (L)	41	0.91	0.83	1.00	< 0.001

[a] Lower and Upper 95% CI indicate the lower and upper limit of 95% confidence interval.
[b] Wilcoxon rank sum test
AA, amino acid ; SD, standard deviation ; SE, standard error

Table 3 Amino acid mutations in the T and B cell epitopes of neuraminidase in the 2011/12 and 2012/13 influenza seasons.

Season	T / B cell epitope	T	T	T	B	B	B	T	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	Amino acid position No.	90	93	99	197	199	221	238	329	331	336	346	369	387	390	392	400	403
	Consensus	P	G	P	D	K	E	T	N	S	H	G	K	K	L	I	R	R
	2011/12 vaccine strain[a]	−	D	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	2012/13 vaccine strain[b]	−	−	−	−	−	−	−	T	−	−	−	T	−	−	−	−	−
	isolates No.																	
2011/12 season	1,3,4,5,6,11,17,20,22,23,26,28,29,33,36,37,42,44,46	−	D	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	12	−	D	S	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	6	−	D	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	N	−	−	−	−
	8	−	D		−	−	D	A	−	−	N	−	−	−	−	−	−	−
	10	L	D	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	46	−	−	−	−	E	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	5,9,22,23,33,36,37	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	T	−	−	−	−	−
	13,14,34	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	N	−	−	−	−
	44	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	M	−	−	−
	22	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	M	−	−
2012/13season	63,68,90	−	−	−	N	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	58,75	−	−	−	−	−	D	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	57	−	−	−	−	−	−	A	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	51	−	−	−	−	−	−	−	T	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	57	−	−	−	−	−	−	−	K	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	89	−	−	−	−	−	−	−	−	R	−	−	−	−	−	−	−	−
	87	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	D	−	−	−	−	−	−
	75,79,80,81,83,84,85,87,89,90,92,94,95,96	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	T	−	−	−	−	−
	51,61,62,64,65,66,67,69,71,72,76	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	N	−	−	−	−
	60,72,78,84,96	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	K	−
	94	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	W

[a]A/Victoria/210/2009(H3N2)
[b]A/Victoria/361/2011(H3N2)

NA 活性部位以外の変異により，薬剤感受性に変化がみられることが確認され，薬剤耐性の調査においては，NA 活性部位のみならず NA 活性部位以外の検討も必要であると思われる．また，NA における抗原認識領域の変異が流行株の形成にどのように影響しているのかも検討が必要と思われる．今回の系統樹による解析においても，ウイルスの変異は連続的に起こっていると考えられ，疫学的，臨床的な観点から継続的な臨床分離株の塩基配列の検討が有用な情報をもたらすと思われる．

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．

参　考　文　献

1) 河合直樹，廣津伸夫，池松秀之：インフルエンザ診療マニュアル 2014-2015 年シーズン版．インフルエンザ研究班編集（柏木征三郎，岩城紀男監修）．日本臨床内科医会会誌 29，臨時付録，2014.

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) Boivin G : Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. Influenza Other Respir Viruses Suppl 3 : 18-23, 2013.

5) Carrat F and Flahault A : Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. Vaccines 25 : 6852-6862, 2007.

6) 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.
7) 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.
8) Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR and Rehermann B : Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. J Virol 75 : 11392-11400, 2001.
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) 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.
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) Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Caldwell JB, Kortt AA and Colman PM : The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. Proteins 14 : 327-332, 1992.
15) Mishin VP, Hayden FG and Gubareva LV : Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 49 : 4515-4520, 2005.
16) 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.
17) 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.
18) Westgeest KB, de Graaf M, Fourment M, Bestebroer TM, van Beek R, Spronken MI, de Jong JC, Rimmelzwaan GF, Russell CA, Osterhaus AD, Smith GJ, Smith DJ and Fouchier RA : Genetic evolution of the neuraminidase of influenza A (H3N2) viruses from 1968 to 2009 and its correspondence to haemagglutinin evolution. J Gen Virol 93 : 1996-2007, 2012.

(Received for publication December 4, 2014)