

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305014

研究課題名(和文) アジアを中心としたインフルエンザウイルスのグローバルな進化と薬剤耐性株の伝播追跡

研究課題名(英文) Influenza virus transmission, evolution and appearance of drug resistant viruses in Asia.

研究代表者

齋藤 玲子 (SAITO, Reiko)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30345524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミャンマー、マレーシア、ベトナム、レバノンにおいてインフルエンザのサーベイランスを行った。3年間で合計1820件のインフルエンザ疑い検体から、456件のインフルエンザウイルスを分離した(A/H1N1pdm09 136件、A/H3N2 169件、B型 151件)。A/H1N1pdm09は、日本/ミャンマーを含めたアジアと、レバノンに代表されるヨーロッパをウイルスが双方向に行き来する傾向があり、A/H3N2は、ミャンマーで、日本やレバノンより半年早く新しい遺伝子型の株が出現していた。B型は変異が少なく伝播方向の推定が難しかった。3年間を通じ4ヶ国でノイラミニダーゼ阻害剤耐性株は検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：During the fiscal three years from 2013 to 2015, we conducted influenza virus surveillance in four countries, that is, Myanmar, Malaysia, Vietnam, and Lebanon. We collected 1820 nasopharyngeal samples from influenza-like illness patients and isolated 456 influenza virus (136 of A/H1N1pdm09, 169 of A/H3N2, and 151 of B). We estimated transmission patterns, and it turned out A/H1N1pdm09 shuttles between Asian side (Myanmar and Japan) and Europe side (Lebanon). In contrast, a new genotype in A/H3N2 appears in Myanmar a half year earlier than in Japan and Lebanon, that suggested A/H3N2 had one way transmission direction from Myanmar to Japan or to Lebanon. Type B did not show a certain geographical tendency due to fewer genetic diversity within Yamagata or Victoria lineages. We analyzed appearance of drug resistant influenza virus by the genetic marker assay for NA-H275Y and drug susceptibility test, but there was no appearance of resistant strains against neuraminidase inhibitors.

研究分野：公衆衛生

キーワード：インフルエンザウイルス サーベイランス ミャンマー レバノン マレーシア ベトナム 遺伝子解析 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、ウイルス遺伝子の変化により、ほぼ毎年新しい抗原性のウイルスが生まれる。温帯では、寒い冬に流行し、熱帯・亜熱帯アジアでは主に雨期に患者が増加して1年中患者がみられる。ヒトからヒトへと速いスピードで伝播感染し、同じ遺伝子型のウイルスが、世界的にほぼ同時期(1-2年以内)に流行する特徴がある。

近年、世界保健機関(WHO)の解析により、新しいインフルエンザA型H3N2が、アジアから発祥することが明らかになった。WHOは、インフルエンザウイルスの進化と、パンデミックを起こす可能性がある新種のインフルエンザの監視のために、サーベイランスの強化の重要性を強調している。

2. 研究の目的

本研究では、これまでアジアのなかでインフルエンザの情報ほとんど無かったミャンマー、マレーシア、ベトナム、レバノンの4カ国に焦点をあて、以下の項目を目的とした。

(1) 現地でフィールド調査を行い、インフルエンザの検体を採取する。分離株からウイルス遺伝子を解析し、薬剤耐性株を検出する。

(2) 地理情報システム(GIS)を組み合わせ分子マーカーによる地理的追跡(Spatial Molecular tracking)を行い、グローバルなインフルエンザの伝播経路を時空間的に明らかにする。

(3) 小児の重症呼吸器感染の原因サーベイランスにより入院の原因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各国のインフルエンザ株の調査解析

アジアの4カ国へ日本人研究者が渡航、または、各国から研究者を招聘して、検体の採取とインフルエンザの分析を行った。

ミャンマー3都市(ヤンゴン、ネピドー)、マレーシア1都市(クアラルンプール)、レバノン1都市(ベイルート)、ベトナム1都市(ハノイ)へ渡航して相手側研究協力者に調査を依頼した。または、現地の研究者を招聘して調査を依頼した。

現地の医療機関を受診した急性上気道炎患者に、十分なインフォームドコンセントを取った後に、インフルエンザ迅速診断キットでスクリーニングを行い、インフルエンザA型またはB型が陽性の場合、臨床検体を採取した。同時に、患者の性、年齢、発症日、症状などの臨床情報を聴取し、登録用紙に記載した。

インフルエンザ陽性検体は、新潟大学または各国の協力研究所にて、ウイルス培養およびPCRを用いてインフルエンザウイルスを検

出した。

ウイルス輸送培地上清をMDCK細胞に接種し、37℃で3-5日間観察し細胞変性効果(CPE)が見られた場合は、インフルエンザウイルスが分離されたと判断した。

培養上清からRNAを抽出し(Extragen II, Kainos、東京)、インフルエンザセグメント特異プライマーを使ってcomplementary DNAを作成した。

研究代表者が開発したインフルエンザ検出用のリアルタイムPCR法(サイクリングブロープ法)を用いて、インフルエンザA/H1N1pdm09、A/H3N2、B型山形系、ピクトリア系を判定した。

検出されたインフルエンザの型亜型と採取日から、疫学曲線を作成し、各国のインフルエンザ流行時期や流行型を決定し、4ヶ国と日本の間で比較した。

抗原決定に重要な遺伝子であるHA、NA遺伝子のシーケンスをサンガー法により行い(ABI 3100)、Neighbor-joining法による系統樹解析を行い、日本で採取された株とあわせ、各国の遺伝子近縁性や出現時期を比較した。

インフルエンザ株の薬剤耐性検査:

NA阻害剤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)に対する薬剤感受性試験をMUNANAを用いた蛍光法によって行った。WHOの基準株と比較した場合の感受性の低下度により耐性が感受性を判定した。また、NA阻害剤耐性を示す遺伝子変異から探るために、責任部位が存在するNA遺伝子に対してリアルタイムPCRまたはシーケンスによりアミノ酸変異部位の確認を行った。

その結果から各国の薬剤耐性頻度を算出した。

次世代シーケンスを使い、インフルエンザの8本のセグメント全てのフルゲノムシーケンス(HA、NA、M、PB2、PB1、PA、NP、NS)を行い、抗原蛋白と内部蛋白をあわせて解析することで各国のインフルエンザの進化を統合的に評価した。

(2) GISを使った地理的追跡は、分子マーカーが明確な薬剤耐性株が出現した場合に行う予定であったが、4ヶ国で3年間の調査期間中に耐性株は出現しなかったため、施行しなかった。

(3) 小児重症肺炎サーベイランス

調整に難航し、ミャンマーのみで小児重症肺炎サーベイランスの準備に着手したが、課題期間中に開始することができなかった。

4. 研究成果

課題期間中にインフルエンザ疑いの患者の検体 1820 件を 4 ヶ国にて採取し、合計 456 件のインフルエンザウイルスが分離された。国別と年度別のインフルエンザウイルス分離件数は以下に示すとおりである。

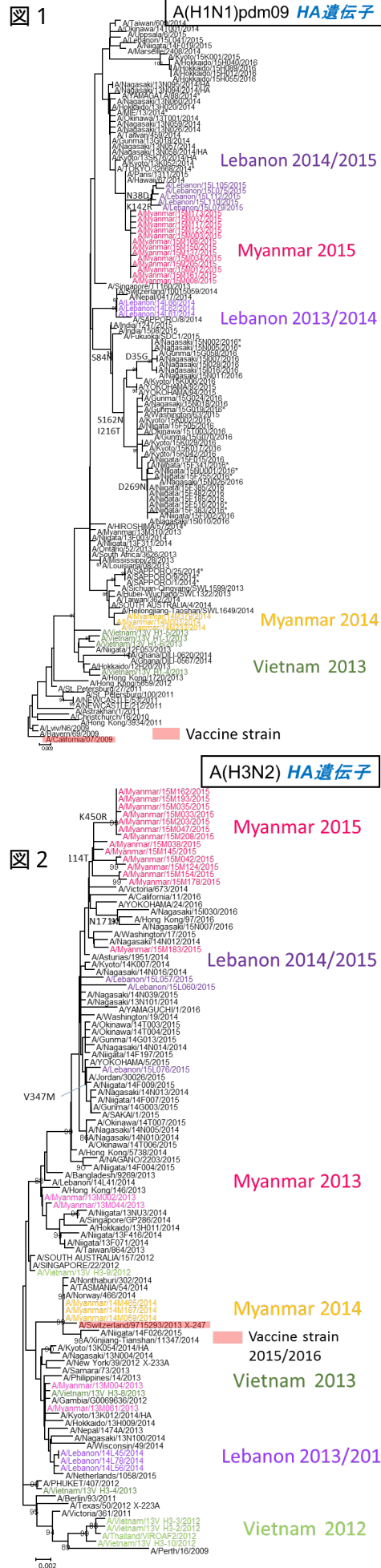
国	年度	型・亜型		
		A/H1pdm	A/H3	B
ミャンマー	H25	1	62	0
	H26	89	55	114
	H27	31	30	0
マレーシア	H25			
	H26			16
	H27			0
レバノン	H25		12	
	H26	11	3	15
	H27			
ベトナム	H25	4	7	6
	H26			
	H27			
合計		136	169	151

最も分離数が多く、継続的に検体を採取できたのは、ミャンマーであり、382 件のインフルエンザウイルスが分離できた。マレーシアは臨床検体が 425 件採取できたものの、分離できたウイルスは僅かに 16 件であり、現地での臨床検体の保存温度が低温に保たれていないことが原因と考えられた。レバノンも継続的にサンプルは採取されたのだが、輸送が毎回半年以上遅れるために課題の終了後に輸送をする形になるため平成 27 年度はサンプル採取を行わなかった。

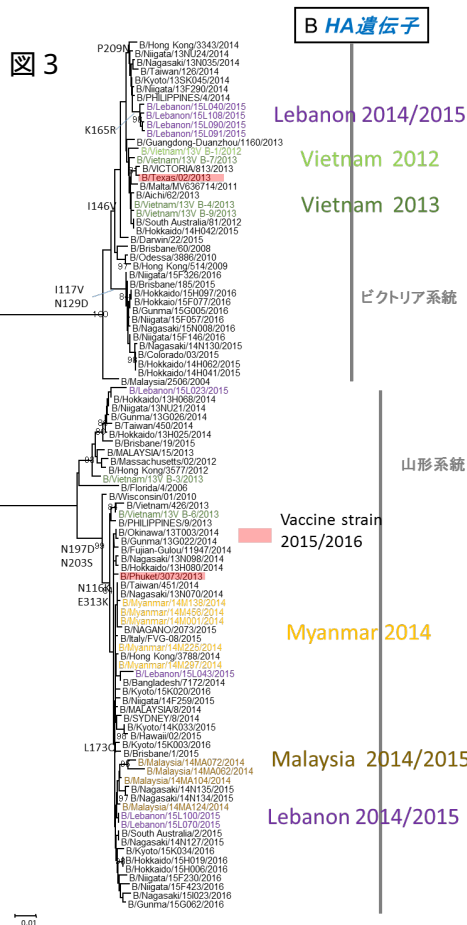
各国のインフルエンザの流行時期はそれぞれ異なり、ミャンマーは、5-11 月の雨期にインフルエンザが流行し、マレーシアは 12-2 月の雨期に、ベトナムは 5-10 月雨期と 12-3 月の寒い冬の 2 回の流行が有り、熱帯亜熱帯では雨期にインフルエンザが流行することが判明した。レバノンは温帯にあたるため 12-3 月にインフルエンザが流行し日本と流行時期は一致していた。

採取されたインフルエンザの遺伝子の樹形図解析の結果、A/H1N1pdm09 の HA 遺伝子に関して、ベトナムで 2012 年に採取された株は 2012/2013 年シーズンにアジアで採取された株に類似していた。ミャンマーで 2014 年に採取された株は、2013/2014 年に中国で採取された株と非常に近縁であった。一方、レバノンで 2013/2014 年シーズンに採取された株は 2015/2016 年の日本の株と近縁であった。2014/2015 年に、ミャンマーで 2015 年に採取された株については、日本で 2013/2014 年シーズンに採取された株と近縁であった（図 1）。A/H1N1pdm09 については伝播の方向性（レバノンに代表されるヨーロッパ株とミャンマーや日本に代表されるアジア）に一定の伝播方向性を見いだすことができなかった。

A/H3N2 について、全体的に A/H3N2 はミヤ



ンマーで流行した株に類似したが半年後に日本やレバノンで流行する傾向にあった。ベトナムとミャンマーで 2013 年に採取された株は、2013/2014 年に日本やレバノンで採取された株と類似していた。ミャンマーで 2014 年に採取された株は日本株との類似は少なかった。レバノンで 2014/2015 年に採取された株は同時期の日本株とよく似ていた。ミャンマーで 2015 年に流行した株に近い株が 2015/2016 年の日本で採取された(図 2)。



B 型は山形系、ビクトリア系双方のウイルスが各国で見られていた。B 型は遺伝子変異が少ないため、流行時期と地域での傾向をみるのが困難であったが、2014/2015 年に採取されたレバノンの株とマレーシアの株が近縁であった(図 3)。

抗インフルエンザ剤であるノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) について、4 ケ国で採取された株から耐性株は検出されなかった。オセルタミビル・ペラミビル耐性となる A/H1N1pdm09 株の NA 遺伝子の H275Y 変異株はみられなかった。また、株を選択し、ノイラミニダーゼ阻害試験を行ったが、薬剤耐性株は検出されなかった。2013/2014 年と 2015/2016 年には日本で H275Y 変異による耐性株が 2-4%程度検出されたため、海外の株でも検出されることが予測していたが、結果的には海外株で耐性株は出現していなかった。

4 ケ国で採取された A/H3N2 について日本の株とあわせ 100 株のフルゲノムシーケンス解析をしたところ、遺伝子再集合が頻繁に起こり、特に 2013-2014 年シーズンに顕著であった。今回の網羅的検討により、新しい変異 (セリン アスパラギン酸、S31D) によるアマンタジン耐性株が日本の株から見つかった。海外からの検出はなかった。

GIS 解析と、リバースジェネティクス解析は本課題期間中には着手できなかった。

インフルエンザ重症入院者解析については、研究代表者が中心となり、ミャンマーで AMED 感染症国際展開戦略プログラムが採択と成り、その課題の一つの小児重症肺炎として、今後調査を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Zaraket H, Kondo H, Hibino A, Yagami R, Odagiri T, Takemae N, Tsunekuni R, Saito T; Japanese Influenza Collaborative Study Group, Myint YY, Kyaw Y, Oo KY, Tin HH, Lin N, Anh NP, Hang N le K, Mai le Q, Hassan MR, Shobugawa Y, Tang J, Dbaibo G, Saito R, Full Genome Characterization of Human Influenza A/H3N2 Isolates from Asian Countries Reveals a Rare Amantadine Resistance-Confering Mutation and Novel PB1-F2 Polymorphisms, *Frontiers in Microbiology*, 査読有、7(7)巻、2016、262、DOI: 10.3389/fmicb.2016.00262

Hassan Zaraket, Clyde Dapat, Soha Ghanem, Zainab Ali, Mireille Lteif, Hiroki Kondo, Isolde C. Dapat, Kousuke Saito, Ghazi Kayali, Hiroshi Suzuki, Ghassan Dbaibo, Reiko Saito, Characterization of Human Influenza Viruses in Lebanon during 2010-2011 and 2011-2012 Post-Pandemic Seasons, *Intervirology*, 査読有、57 巻、2014、344-352、DOI: 10.1159/000365758

Reiko Saito, Yadanar Kyaw, Yi Yi Myint, Clyde Dapat, Go Hasegawa, Makoto Naito, Influenza Project in Myanmar, *Journal of Disaster Research*, 査読有、9 巻、2014、842-847

Dapat C, Kondo H, Dapat IC, Baranovich T, Suzuki Y, Shobugawa Y, Saito K, Saito R, Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of pandemic and seasonal influenza viruses during the 2009-2010 and 2010-2011

influenza seasons in Japan, Antiviral Research, 査読有、99 巻、2013、261-269、DOI:10.1016/j.antiviral.2013.06.003

Dapat C, Saito R, Kyaw Y, Myint YY, Oo HN, Oo KY, Naito M, Hasegawa G, Dapat IC, Suzuki H, Delayed emergence of oseltamivir-resistant seasonal influenza A (H1N1) and pandemic influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Myanmar, Influenza and Other Respiratory Diseases, 査読有、7 巻、2013、766-771、DOI:10.1111/irv.12030

〔学会発表〕(計 10 件)

Hibino A, Shobugawa Y, Saito R, Molecular Epidemiology of Human Respiratory Syncytial Virus in Japan, 2012-2015, US/Japan Cooperative Medical Science Program: Acute Respiratory Panel. (国際学会) 2016 年 01 月 12 日~2016 年 01 月 13 日、ワシントン DC (米国)

齋藤玲子、RS ウイルスの分子疫学ー日本と東南アジアの流行を追う、教育セミナー 11、第 64 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第 62 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 (招待講演) 2015 年 10 月 21 日~2015 年 10 月 23 日、ロイトン札幌(北海道札幌市)

齋藤玲子、インフルエンザの治療と薬剤耐性ー日本の流行とアジア地域の分子疫学を含めて、ランチョンセミナー1、第 56 回日本臨床ウイルス学会 (招待講演) 2015 年 06 月 13 日~2015 年 06 月 14 日、岡山大学鹿田キャンパス(岡山県岡山市)

齋藤玲子、日常診療に直結するサーベイランス体制を! 「RS ウイルスの分子疫学」第 56 回日本臨床ウイルス学会(招待講演) 2015 年 06 月 13 日~2015 年 06 月 14 日、岡山大学鹿田キャンパス(岡山県岡山市)

Dapat Clyde, Genetic Analysis of Influenza A Viruses in Lebanon, Myanmar, and Japan, Asia African Research Forum, 2014 年 01 月 20 日~2014 年 01 月 22 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

Reiko Saito, Makoto Naito, Yadanar Kyaw, Yi Yi Myint, Khin Yi Oo, Go Hasegawa, Clyde Dapat, Isolde C. Dapat, Yugo Shobugawa, Kousuke Saito, and Hiroshi Suzuki, Epidemiology of Influenza in Myanmar-Working Group Meeting on Specific Diseases "Influenza", Asia African Research Forum, 2014 年 01 月 20 日~2014 年 01 月 22 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

Dapat Clyde, Comparison of the Evolutionary Dynamics of Influenza A Viruses from Lebanon, Myanmar, and Japan, 2009-2013, 東北大学 新潟大学エクステンジミーティング インフルエンザと呼吸器ウイルスセミナー、2013 年 12 月 06 日~2013 年 12 月 07 日、新潟大学医学部 (新潟県新潟市)

Mohd Rohaizat Hassan, Molecular and Spatial Distribution of Influenza & Influenza-Like Illness in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia, 東北大学 新潟大学エクステンジミーティング インフルエンザと呼吸器ウイルスセミナー、2013 年 12 月 06 日~2013 年 12 月 07 日、新潟大学医学部 (新潟県新潟市)

Nguyen Phuong Anh, National Influenza Surveillance in Vietnam, 2006-2012, 東北大学 新潟大学エクステンジミーティング インフルエンザと呼吸器ウイルスセミナー、2013 年 12 月 06 日~2013 年 12 月 07 日、新潟大学医学部 (新潟県新潟市)

Dapat Clyde, Dapat Isolde, 近藤大貴、齋藤孔良、齋藤玲子、鈴木宏、Evolutionary Dynamics of Influenza A Viruses in Japan, Lebanon, and Myanmar, 2009-2013, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 12 日~2013 年 11 月 14 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

齋藤玲子(分担執筆者) 日本医事新報社、インフルエンザ診療ガイド 2015-2016 「ノイラミニダーゼ阻害剤の耐性」、2015、240

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健
学教室

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/pub/welcome.htm>

AMED 感染症国際展開戦略プログラム 新潟
大学ミャンマー感染症研究拠点

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/idm/>

グエン・レ・カン・ハン

(Nguyen Le Khanh Hang)

グエン・フオン・アイン

(Nguyen Phuong Anh)

レ・キン・マイ (Le Quynh Mai)

ザラケット・ハッサン (Zaraket Hassan)

ドバイボ・ガッサン (Dbaibo Ghassan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 玲子 (SAITO, Reiko)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30345524

(2) 研究分担者

齋藤 昭彦 (SAITOH, Akihiko)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30531389

藤井 雅寛 (FUJII, Masahiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30183099

菑蒲川 由郷 (SHOBUGAWA, Yugo)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30621198

長谷川 剛 (HASEGAWA, Go)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：90251800

齋藤 孔良 (SAITO, Kosuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30460356

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

日比野 亮信 (HIBINO, Akinobu)

近藤 大貴 (KONDO, Hiroki)

小田切 崇 (ODAGIRI, Takashi)

鈴木 宏 (SUZUKI, Hiroshi)

田村 務 (TAMURA, Tsutomu)

ダバット・クライド (Dapat Clyde)

ヤデナ・チャー (Yadanar Kyaw)

イーイーミン (Yi Yi Myint)

ネイ・リン (Nay Lin)

テーテーティン (Htay Htay Tin)

キン・イー・ウー (Khin Yi Oo)

ラ・ラ・チャー (Latt Latt Kyaw)

ロハイザ・マフッド・ハッサン

(Rohaizat Mohd Hassan)

シャムスル・アズハー・シャー

(Shamsul Azhar Shah)