

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22406013
 研究課題名（和文） ミャンマーの地理的特性に着目したインフルエンザ監視：多剤耐性と新型重症化
 研究課題名（英文） Influenza surveillance in Myanmar: investigations on emergence of drug resistant strains and clinical pictures of H1N1pdm09
 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

研究成果の概要（和文）：ミャンマーで2010～2012年度にヤンゴン市とネピドー市でインフルエンザの流行調査を行い、インフルエンザ株の特徴と薬剤耐性の解析を行った。3年間に643株のインフルエンザウイルスを分離し、A/H1N1pdm09 257株、A/H3N2 182株、B 204株が検出された。流行時期は5～11月の雨期であった。A/H3N2とB型は日本の冬の流行に半年先駆けて新しい遺伝子型の株がミャンマーで先行して流行した。薬剤耐性に関してはA/H1N1pdm09にオセルタミビル耐性株の出現は無かった。B型は2株がザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビルに耐性を示し、NA遺伝子248位に変異（I248G）が認められた。

研究成果の概要（英文）：We investigated influenza viruses circulated in the community in Yangon and Nay Pyi Taw in Myanmar during FY 2010-2012. In total we isolated 643 influenza viruses during three years, and 257 were A/H1N1pdm09, 182 A/H3N2, and 204 B. Epidemic season in Myanmar was from May to November during the rainy season. For A/H3N2 and B, new genetic variants appeared a half year earlier than in Japan. Drug resistant surveillance showed that there was no oseltamivir resistant H274Y mutated strains during the years. We identified two drug resistant influenza B that conferred resistance to zanamivir and lanaimivir, and possessed I248G mutation in the NA gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ、ミャンマー、流行時期、ウイルス遺伝子解析、ウイルス進化、薬剤耐性、新型インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景 | 世界大流行（パンデミック）を予測し、エピセンターとなる中国周辺地域に着目して、アジア
- 我々は、これまで、インフルエンザの世

アのインフルエンザ・サーベイランス基盤の整備を重点的に行ってきた。ベトナムにおいて、平成 16～19 年の科学研究費補助金・基盤研究・海外 (A)「ベトナムにおけるウイルス急性気道感染症の疫学研究—新型インフルエンザに注目して」により、ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) のインフルエンザ診断の技術援助を行い、それがベトナムの SARS や高病原性鳥インフルエンザ検出など、インフルエンザ・サーベイランスの礎となった。

次の段階として、我々は、世界の、どの国も入り込めなかった、ミャンマーに着目した。ミャンマーは、地理的や物流的に中国の大きな影響を受けているが、インフルエンザの実態については全く不明であった。我々は、これまで 6 年間にわたり日本留学者 (Dr. Yadanar Kyaw 呼吸器内科医) と連携して、インフルエンザの調査を行ってきた。豊富な人脈を生かし、ついにミャンマー保健省の信頼を勝ち取り、平成 17 年には、インフルエンザ調査に関する協定 (MOU) を締結し、調査が容易に遂行できる素地を作った。さらに、平成 19 年—21 年度 科学技術振興調整費事業「ミャンマーのインフルエンザ研究拠点形成」にて、ヤンゴン市の国立衛生研究所に、最新のインフルエンザ検出技術の導入と現地研究者に対する指導を行い、WHO インフルエンザセンターに認定された。新首都ネピドーでは、医学研究所 (Department of Medical Research) と協力し、インフルエンザ検体の採取を開始した。

2. 研究の目的

(1) ミャンマーにおける新型インフルエンザ H1N1pdm09 の動向や新しい薬剤耐性株の出現の監視

新型インフルエンザ H1N1pdm09 をはじめ、課題期間の 3 年間にミャンマー国内での流行したインフルエンザウイルスの特徴を明らかにする。日本で流行するインフルエンザと比較し、出現時期やウイルス遺伝子の特徴を解明する。

(2) 新型インフルエンザや、薬剤耐性ウイルスの解析

ミャンマーでは NA 阻害剤が全く使用されていないため、薬剤耐性インフルエンザが検出されれば、耐性株が人から人への伝播をはじめた証拠となるため、耐性モニタリングは重要である。

課題期間中に新しい薬剤耐性株が見つかった場合は、薬剤耐性の機序を NA 蛋白の立体構造から推測し、リバースジェネティクス法で再構築を試みる。さらに、アミノ酸配列から構築された NA 蛋白立体構造を下に、耐性部位と薬剤との相互作用部位を解明する。

新型インフルエンザ (H1N1)pdm09 及び季節性インフルエンザにおける HA 蛋白の構造や他の遺伝子部位から、抗原性変異や重症化に寄与する部位の検証を行う。

(3) 重症化の病理所見とウイルス学の双方向的解析。ミャンマーの新型インフルエンザの重症・死亡患者から、病理検体を採取し、細菌学的マーカーも含めた肺病変や、全身臓器変化について、途上国の重症化像についてウイルス学と双方向的に比較して病理学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ヤンゴン市内と、ネピドー市 (首都) の医療機関を受診した発熱患者から、インフルエンザキットを用いてスクリーニングを行い、患者の承諾後、咽頭・鼻腔ぬぐい液を採取し、患者情報を記録する。

(2) 採取した臨床検体はミャンマー側でいったん冷凍保存し、その後新潟に輸送する。

(3) 新潟大学で、インフルエンザのウイルス分離・同定を行う。HAI 法や、HA 遺伝子シーケンスより、ウイルス抗原性の変化を日本のインフルエンザ株と比較し解析する。

(4) 分離されたインフルエンザウイルス株を用い NA 阻害剤に対する感受性試験を行う。使用する薬剤はオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルの 4 剤を用いる。薬剤感受性試験の結果から、外れ値 (耐性) と判定されたウイルスに対して NA 遺伝子シーケンスにより耐性に関与するアミノ酸変異を同定する。M2 阻害剤であるアマンタジンに対する、薬剤耐性も調査を行う。

(5) 薬剤耐性株や新しい抗原性が疑われる株に対して、インフルエンザウイルス遺伝子の全長解析 (16,000 塩基長) を行い、ウイルス遺伝子全体での関与部位の推定を行う。

(6) 年間 1—2 回、ミャンマーへ渡航し、現地協力者と調整をしながら、プロジェクトの進行状況を確認し、ヤンゴン市、ネピドー市のサーベイランス拠点でインフルエンザウイルスの検出や同定法を指導する。

(7) インフルエンザにより重症例・死亡例から採取した生検、剖検組織標本と細胞診標本を、現地で作製し、肺や全身臓器の病理学的診断を共同で行う。

4. 研究成果

(1) ミャンマーにおけるインフルエンザウイルスの分離状況と流行時期

2010 年から 2012 年度の 3 年間でヤンゴン市とネピドー市の二都市の外来を受診した急性上気道炎患者のうち、1659 人がインフルエンザ迅速診断キットで陽性であった (1 年目 694 人、二年目 444 人、3 年目 521 人)。A

型陽性は1020人（1年目474人、2年目376人、3年目170人）、B型陽性は59人（1年目220人、2年目26人、3年目351人）であった。

新潟大学にて MDCK 細胞を用いてインフルエンザウイルスの分離同定を HAI 法とリアルタイム PCR 法を用いて行ったところ、3年間で643株のインフルエンザウイルスが分離され、A/H1N1pdm09 257株、A/H3N2 182株、B 204株であった。

2010年は、A/H1N1pdm09が232株、A/H3N2が17株、B型が114株分離され、A/H1N1pdm09がミャンマーで地域流行を起こしていたことが判明した。A/H1N1pdm09は、2009年に世界的に新型インフルエンザとして大流行をおこし、日本でも多くの罹患者が出た。しかし、ミャンマーでは2009年には散発例が8月の終わりに見られたのみで、本格的な地域流行は2010年となった。これは、ミャンマーが半鎖国状態で人の行き来が少ないため結果的に地域流行が1年遅れたと考えられた。B型はビクトリア系のウイルスが流行した。

2011年は、A/H1N1pdm09は検出されず、A/H3N2が165株、B型が10株検出され、A/H3N2が流行の主流であった。

2012年は、A/H1N1pdm09が25株、B型が80株とB型が優位の流行を示した。世界的にはA/H1N1pdm09はアジア大陸で局所的に流行したものの、日本では半年後の冬にはA/H1N1pdm09はほぼ検出されず、ミャンマーの流行とは違いがみられた。しかし、ミャンマーで流行したB型インフルエンザの山形系のウイルスは、半年後の日本で冬に流行したウイルスと類似していた。

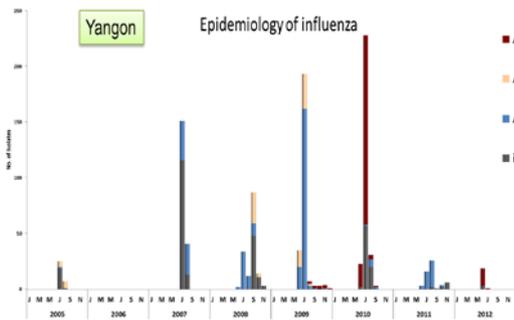


図 1-A ヤンゴン市のインフルエンザ流行曲線

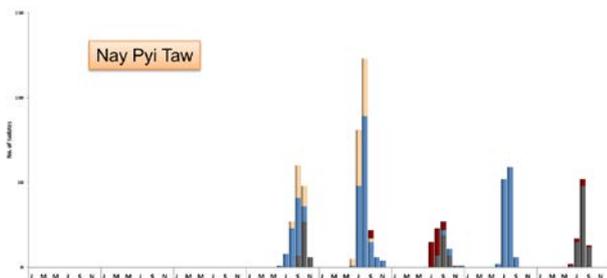


図 1-B ネピドー市のインフルエンザ流行曲線

ミャンマー最大都市のヤンゴン市と首都のネピドー市では、主に6-10月の雨期にインフルエンザ流行が見られ、二つの都市の流行時期は同じであった(図1-A, 1-B)。流行のピークは二都市とも6-8月であった。また、流行したインフルエンザの型・亜型も二つの都市で同じであった。これは、ネピドーは首都で政府機関の官吏が従事しているが、週末には家族のいるヤンゴンに帰っているため、人の交流が密で有り二都市で流行するインフルエンザの型・亜型は同じであると考えられた。

(2) インフルエンザの分子疫学 (遺伝子特徴)

①インフルエンザ A/H1N1pdm09 の遺伝子解析
ミャンマーで採取された A/H1N1pdm09 は、2010年に採取された株がクレード4 (WHO分類)、2012年に採取された株がクレード6に属した(図2)。2011年は検出されなかったため解析できなかった。遺伝子解析のうえでは、クレード6は複数の遺伝子変異があるものの、WHOの報告では、クレード4と共にワクチン株 A/California/07/2009 と同等の抗原性を持つと考えられる。今後、HAI 試験を行い、抗原性を新潟大学で確認する予定である。なお、新潟大学の調査により、2012-2013年シーズンに日本で採取された A/H1N1pdm09 もミャンマー株と同じクレード6に属したことが判明した。日本の流行の半年前に新しい株が見られたことが判明した。

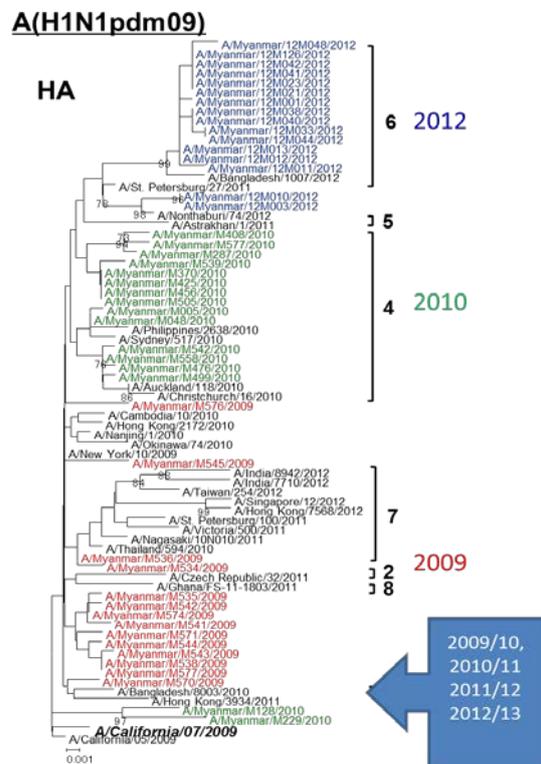


図 2 A/H1N1pdm09 の HA 遺伝子解析

②インフルエンザ A/H3N2 の遺伝子解析
 ミャンマーで 2010 年に流行した A/H3N2 は、Victoria/208 系のクレード 5 とクレード 8 (WHO 分類) の双方に属し、さらに 2011 年のウイルスはクレード 3C に進化していた (図 3)。特に 2011 年に流行したクレード 3C は、日本においても半年後の 2011-2012 年シーズンに同様のウイルスが流行し、その年のワクチン株である Perth16 系統の A/Victoria/210/2009 と抗原性が異なっていたことが判明している。このため、2012/2013 年シーズンの日本のワクチン株はクレード 3C に属する A/Victoria/361/2011 に変更になった。やはり、ミャンマーでは日本に半年先駆けて新しい抗原性の株が観察された。

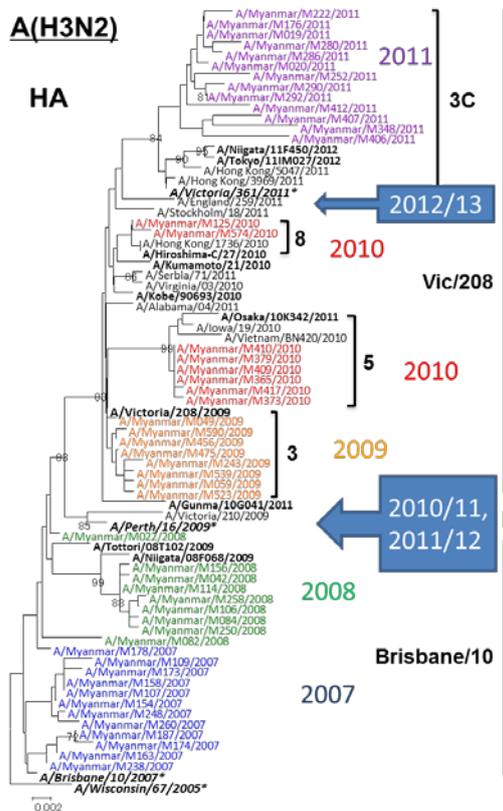


図 3 A/H3N2 の HA 遺伝子解析

(青枠は各シーズンの日本のワクチン株を示す)

③B 型インフルエンザ
 B 型インフルエンザは、2010 年、2011 年は Brisbane/60 系のビクトリア系のウイルスが流行し、日本の流行も同様で、ワクチン株とも一致していた (図 4)。2012 年は、ビクトリア系と山形系の双方のウイルスが混合流行し、採取された 80 株の B 型インフルエンザのうちビクトリア系 10 株 (12.5%)、山形系 70 株 (87.5%) と山形系が主流の流行であった。ミャンマーで流行した山形系はクレード 2

に属した。2012-2013 年シーズンには世界的な山形系ウイルスの趨勢をうけて、ワクチン株が山形系の B/Wisconsin/01/2010 (クレード 3) に変更となった。

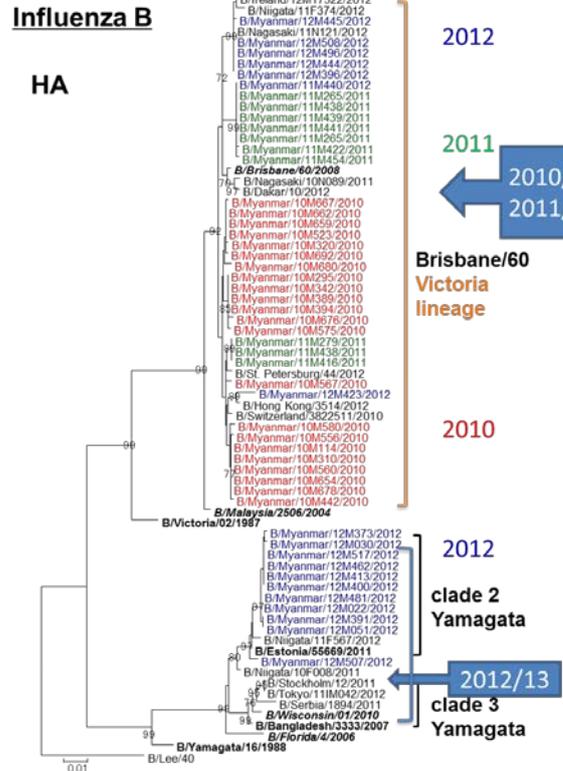


図 4 B 型の HA 遺伝子解析

(青枠は各シーズンの日本のワクチン株を示す)

(3) 薬剤感受性試験

①2010 年と 2012 年の 2 カ年に採取された A/H1N1pdm09 248 株に対して NA 蛋白 274 位の変異の検索をリアルタイム PCR を使って行った。同部位の一塩基置換 (His→Tyr) により、オセルタミビルとペラミビルの相互耐性となる。結果は、ミャンマーの H1N1pdm09 は全て感受性株であり、H274Y 変異株はみられなかった。

②2011 年に採取された A/H3N2 41 株と B 型 8 株について 4 剤の NA 阻害剤に対する感受性試験を行った。結果は、A/H3N2 の阻止濃度の平均値はペラミビル 0.17nM, オセルタミビル 1.12nM, ザナミビル 0.91nM, ラニナミビル 0.67nM であった。A/H3N2 の 3 株がオセルタミビルに軽度の外れ値を示したが NA 遺伝子の変異部位は現在確認中である。B 型の薬剤阻止濃度の平均値はペラミビル 1.43nM, オセルタミビル 28.37nM, ザナミビル 12.91nM, ラニナミビル 4.17nM であった。

B/Myanmar/11M440/2011 (ペラミビル 1.05nM, オセルタミビル 45.59nM, ザナミビル 76.07nM, ラニナミビル 24.13nM) と B/Myanmar/11M454/2011 (ペラミビル 1.10nM, オセルタミビル 58.18nM, ザナミビル 57.47nM, ラニナミビル 17.53nM) の 2 株は、ザナミビル、ラニナミビルで外れ値を示し軽度の耐性株であった。

シークエンスの結果 NA 遺伝子 248 位の変異 (I248G) が 2 株共に認められた。この部位は、ザナミビルやラニナミビルと直接コンタクトする部位ではないが、273 位という NA 蛋白の活性部位の重要な枠組みアミノ酸に近接するため、248 位変異が間接的に活性部位の形状を変化させている可能性がある。今後、リバーシジェネティクス法等を用いて変異を再生できるか試みる予定である。

(4) リバーシジェネティクス法による耐性ウイルスの確認

インフルエンザウイルスを再構築して耐性変異が再現されるか確かめるため、リバーシジェネティクス法による遺伝子組みかえを予定していたが、新潟大学の承認の他に大臣申請が必要で、2012 年に文科省に申請を行ったが 2013 年 5 月現在まだ許可がおりていないため実験が開始できていない。大臣申請の承認の連絡を待つて実験を開始する予定である。

(5) 病理学的検索

課題期間中 H1N1pdm09 による剖検体が無かったため病理学的な検索を行えなかった。

(6) ミャンマー訪問による現地との調整

課題期間中、以下の合計 5 回ミャンマーを訪問し、現地での進行状況の確認と調整を行った。ミャンマー保健大臣に二回謁見し、プロジェクトの進行状況を報告したところ、結果に満足しているという言葉いただいた。

主な訪問場所：国立衛生研究所（以下ヤンゴン）、サンピュア病院、国立小児病院、第一医科大学、第二医科大学、ヤンゴン総合病院、JICA ミャンマーオフィス、パラミ病院、ミャンマー保健省（以下ネピドー）、国立医科学研究所

期間：

- ①2010 年 9 月 27 日～10 月 1 日
- ②2011 年 1 月 23 日～1 月 29 日
- ③2011 年 9 月 20 日～9 月 23 日
- ④2012 年 2 月 5 日～2 月 8 日
- ⑤2012 年 9 月 17 日～9 月 22 日



ミャンマー保健大臣と謁見 (写真人物左)

国立衛生研究所 (ヤンゴン市) で実験の指導



ヤンゴン第二医科大学学部長と面談 (写真人物右)



国立医科学研究所 (ネピドー)

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 6 件)

- (1) 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 Other Respi Viruses. Nov 5. doi: 10.1111/irv.12030, 2012 査読有

(2) Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, Dapat C, Caperig-Dapat I, Baranovich T, Suzuki T, Suzuki H. Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. J Clin Microbiol. 49(1):125-30, 2011 査読有

(3) Zaraket H, Saito R, Suzuki Y, Baranovich T, Dapat C, Caperig-Dapat I, Suzuki H. Genetic makeup of amantadine-resistant and oseltamivir-resistant human influenza A/H1N1 viruses. J Clin Microbiol. 48(4) 1085-92., 2010 査読有

(4) Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H, Dapat C, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. J Clin Microbiol. 48(9) 3423-7, 2010 査読有

(5) Saito R, Sato I, Suzuki Y, Baranovich T, Matsuda R, Ishitani N, Dapat C, Dapat IC, Zaraket H, Oguma T, Suzuki H. Reduced effectiveness of oseltamivir in children infected with oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses with His275Tyr mutation. Pediatr Infect Dis J. 29(10) 898-904, 2010 査読有

(6) Dapat C, Suzuki Y, Saito R, Kyaw Y, Myint YY, Lin N, Oo HN, Oo KY, Win N, Naito M, Hasegawa G, Dapat IC, Zaraket H, Baranovich T, Nishikawa M, Saito T, Suzuki H. Rare influenza A (H3N2) variants with reduced sensitivity to antiviral drugs. Emerg Infect Dis. 16(3) 493-6. 2010 査読有

[学会発表] (計4件)

(1) Reiko Saito, Makoto Naito, Yadanar Kyaw, Yi Yi Myint, Khin Yi Oo, Go Hasegawa, Clyde Dapat, Isolde Dapat, Yugo Shobugawa, Kousuke Saito, Hiroshi Suzuki. Epidemiology of Influenza in Myanmar. 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム AARF2013 2013年01月23日~2013年01月24日 東京都

(2) Clyde Dapat, 齋藤 玲子, 齋藤 孔良, Isolde Dapat, 近藤 大貴, 鈴木 宏. Genetic

Characterization of Human Influenza A (H3N2) Virus in Myanmar, 2007-2011. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13日~2012年11月15日. 大阪市

(3) Clyde Dapat, Reiko Saito, Isolde Dapat, Yasushi Suzuki, Makoto Naito, Yadanar Kyaw, Yi Yi Myint, Hiroshi Suzuki. Prevalence of antiviral drug-resistant influenza in Myanmar from 2007 to 2010. XV International Congress of Virology. 2011年9月15日. 札幌市

(4) 齋藤 玲子. 薬剤耐性インフルエンザとその臨床. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7日. 徳島市

[図書] (計1件)

内藤 眞. 黄金のパゴダ ミャンマーの光と影. 新潟日報事業所. 2013年 231頁

[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実験病理学(第二病理)

ミャンマー訪問記録

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/pa2/katudouhoukoku.htm>

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

内藤 眞 (NAITO MAKOTO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30045786
長谷川 剛 (HASEGAWA GO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90251800
藤井 雅寛 (FUJII MASAHIRO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30183099
大家 正泰 (OOIE MASAYASU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：70108017

(3) 連携研究者

大橋 瑠子 (OOHASHI RIUKO)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：20447600
西藤 岳彦 (SAITO TAKEHIKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・上席研究員
研究者番号：00263393