
原 著

2013 年から 2015 年にマレーシアで流行した インフルエンザ B 型山形系統の分子疫学的特徴および ノイラミニダーゼ阻害剤に対する感受性に関する研究

モハド ロハイザ ハッサン
新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際保健学分野
(主任教授：齋藤玲子)

Characteristics of Circulating Influenza B Yamagata in Malaysia from 2013 to 2015

Mohad Rohaizat HASSAN

*Division of International Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University, Graduate School of Medical and Dental Sciences*

要 旨

【目的】マレーシアにおける B 型インフルエンザの分子疫学的特徴およびノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) に対する薬剤感受性については今まで十分調査されてこなかったため、それらを解明することを目的とした。

【方法】2013 年 8 月～2015 年 5 月に、マレーシア国セランゴール州においてインフルエンザ様症状の患者 302 名から、迅速診断キットを用いて A 型及び B 型インフルエンザをスクリーニングした。ウイルス分離培養とリアルタイム PCR を用いてウイルス系統を判別した。分離株よりヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子のシーケンスを行った。遺伝子系統樹解析を用い、インフルエンザワクチン株や、同時期にアジア周辺諸国で採取された株と比較した。さらに、4 種の NAI に対する IC₅₀ (50% 阻害濃度) を蛍光法により測定することにより薬剤感受性を判定した。

【結果】ウイルス分離およびリアルタイム PCR 法により 19 件が B 型と診断できた。A 型インフルエンザは検出できなかった。このうちウイルス分離できた 16 株は、HA および NA 遺伝子の系統樹解析から、全て B 山形系統のクレード 3 に属しており、東南アジア、日本、香港お

Reprint requests to: Mohad Rohaizat HASSAN
Division of International Health, Graduate School
of Medical and Dental Sciences,
Niigata University, Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先: 〒 951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際保健学分野

モハド ロハイザ ハッサン

よびオセアニア諸国で流行していたB型株と近縁であった。これらの株は、2014年にWHOが推奨した南半球のB型ワクチン株とは一致していなかったが、2015年に推奨されたワクチン株と一致していた。HAとNA遺伝子の組み合わせが異なるクレード内遺伝子再集合体が2株検出された。分離したマレーシアのB型は、オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビルおよびペラミビルの4種類のNAI全てに対して感受性であった。

【結語】マレーシアで流行したB型インフルエンザウイルスはアジアの周辺諸国と一致していた。今回の我々の調査は、マレーシアのインフルエンザ流行疫学を把握するには調査期間が限定されていたため、今後も継続的な調査が必要である。

キーワード：B型インフルエンザ、B山形系統、遺伝子系統樹解析、サーベイランス、マレーシア

緒 言

インフルエンザは主要な呼吸器感染症であり、特に小児において罹患率が高い。インフルエンザはオルソミクソウイルス科に属するRNAウイルスであり、A型、B型、C型が知られているが¹⁾²⁾、A型とB型がインフルエンザ感染症の大部分を占める。一般に、小児では20%、成人では5%が毎年インフルエンザに罹患すると推計されている³⁾。インフルエンザの抗原性は、ウイルス粒子の脂質二重膜層(エンベロープ)に局在するヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)の2種類のタンパクにより決まる。ヒトでは通常、A型はH1N1とH3N2の亜型が流行する。B型インフルエンザは、1983年から世界中で流行しているB/Victoria/2/87-like(Bビクトリア系統)およびB/Yamagata/16/88-like(B山形系統)の抗原特異性および遺伝学的に異なる2つの系統に分けられる⁴⁾。世界保健機関(WHO)は、各国の流行の時期に合わせ北半球ワクチンと南半球ワクチンの二つのワクチンを推奨し、年々と変わる抗原性にあわせ、半年ごとにワクチン株を選びなおしている⁵⁾⁶⁾。マレーシアでは5月頃に接種する南半球ワクチンを使用することが推奨されている²⁾⁵⁾。

過去に、マレーシアにおいて、B型インフルエンザの調査は詳細な分子疫学的研究を含め既に複数報告されている⁷⁾⁻¹⁰⁾。しかしながら、全体的な数が限られることと、ノイラミニダーゼ阻害剤(NAI: Neuraminidase Inhibitor)に対する感受性に関しての報告はまだ無い。本研究では2013年

から2015年にマレーシアで流行したB型インフルエンザの分子疫学的特徴とNAIに対する感受性を明らかにする。

対象と方法

1. 臨床検体の収集

2013年8月から2015年5月までの期間にマレーシア国セランゴール州にある6ヶ所の診療所において臨床検体を収集した。WHO基準に基づき、インフルエンザ様症状と38℃以上の発熱があった患者を対象とした¹¹⁾。患者または保護者に対しインフォームドコンセントを得た上で臨床検体を採取した。患者から同時に2本のスワブを用いて鼻咽頭拭い液を採取し、一方の拭い液はインフルエンザA、B型およびRSウイルスを判別可能な迅速診断キットであるクイックナビFlu+RSV(デンカ生研)を用いて調べた。もう一方の拭い液は-20~-80℃の冷凍庫に保管した後、新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学へ移送し、詳細なウイルス学的検査に用いた。本研究は、マレーシア国民大学医学研究倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号FF-096-2013)。

2. インフルエンザウイルス検出方法

i) B型インフルエンザウイルスの分離と培養

ウイルス分離を行うために、インフルエンザ患者の鼻咽頭拭い液を犬腎臓細胞由来MDCK(Madin Darby canine kidney)細胞に接種し、5%CO₂の存在下で34℃で3~7日間培養し、ウ

ウイルス感染による細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を観察した。CPE が観察された細胞の培養上清中のウイルスを、継代を2回繰り返すことで、実験に十分なウイルス量を確保した¹²⁾。

ii) RNA の抽出と cDNA の合成

Extragen II kit (カイノス社) を用いて臨床検体およびウイルス培養上清から RNA を抽出した。抽出した RNA からの cDNA 合成は、ユニバーサルプライマー (Uni-11 および Uni-12) を用いて、モロニーマウス白血病ウイルス由来逆転写酵素 (Invitrogen 社) により行った^{12) 13)}。

iii) B 型インフルエンザウイルスの系統判別のための PCR およびシーケンス

B 型インフルエンザの型別および系統判別にはリアルタイム PCR 法を用いた。リアルタイム PCR は先行論文に準じたサイクリングプローブとプライマーを用いて実施した^{14) -16)}。B 型の HA および NA 遺伝子は PCR により増幅した後、エチジウムブロマイド含有 3% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認した。PCR 産物はプライマー除去キット (キアゲン社) を用いてプライマーを除去し、BigDye terminator (version 3.1) cycle sequencing kit (ABI 社) によりシーケンス用に標識した。DNA シークエンサー ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (ABI 社) を用いてウイルスの遺伝子配列を決定した。

iv) 遺伝子系統樹解析

Lasergene SeqMan Pro package version 12.2.0 (DNASTAR 社) および BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) を用いて、B 型の HA および NA の遺伝子配列を編集した。HA と NA 遺伝子配列は、インフルエンザ専用の遺伝子データベースである GISAID (<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend>) に登録した。次に、遺伝子解析ソフト MEGA6 (<http://www.mega-software.net/>) を用いて近隣結合法により B 型の HA および NA 遺伝子の遺伝子系統樹を作成した。1,000 回計算をくり返して信頼性のあるブートストラップ値が 70% 以上の場合、遺伝子系統樹上に表示し独立したグループと判定した。遺伝子系統樹解析には以前報告された参照ウイルス株の遺

伝子を含めた¹⁷⁾。参照ウイルス株としては、WHO の推奨するワクチン株と、マレーシアの株に近縁な株を BLAST を用いてサーチし遺伝子データベースの GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) GISAID からダウンロードした。B 山形系統内のクレード分類は WHO の方法に従った¹⁸⁾。

v) IC₅₀ [50% 阻止濃度] 分析を用いた NAI に対する薬剤感受性試験

2'-(4-メチルルンペリフェリル)-a-D-N-アセチルノイラミン酸 (MUNANA; Sigma 社) を用いた蛍光法により、4 種類の NAI (ペラミビル, オセルタミビル, ザナミビル, ラニナミビル) の存在下における B 型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ活性を測定した¹⁹⁾。ノイラミニダーゼ活性の測定値を元に各 NAI の IC₅₀ 値を XLfit software を用いて算出した。マレーシアで採取された B 型インフルエンザウイルスの薬剤感受性を比較検討するために、2014-2015 年シーズン中に日本で流行した 43 株の B 山形系統 (未公表データ) および WHO の標準 B 型株 (B/Perth/211/2001) の IC₅₀ 値を対照として箱ひげ図で示した。薬剤感受性の判定は、WHO 標準感受性株の IC₅₀ と比較して 5 倍未満を感受性株、5 倍から 50 倍を抵抗性株、50 倍以上を耐性株とした¹¹⁾。

vi) 記述疫学

インフルエンザ陽性患者と陰性患者 (迅速キット A 型陽性, RSV 陽性を含む) について、年齢 (平均値と年齢層別)、性別、発熱日数 (37.5℃ 以上)、受診時の体温、症状 (咳嗽、鼻汁、咽頭痛) の基本属性表を作成した。検体採取日に基づき、月別の検体採取数と、インフルエンザ陽性数の疫学曲線を作成した。

vii) 倫理的配慮

対象者に対して研究の内容について説明し、同意が得られた場合にのみ研究への協力を得た。本研究はマレーシア国民大学医学研究倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号; FF-096-2013)。

結 果

研究期間中に計302件の検体を収集した。迅速診断キットによるスクリーニングで、A型インフルエンザ陽性が37件(12.2%)、B型インフル

エンザ陽性29件(9.6%)、RSウイルス陽性3件(1.0%)で、残りの233件(77.2%)は陰性であった。リアルタイムPCR法による系統判別の結果、B型山形系統のみ19件検出され、そのうち16件はウイルス分離株を用いた診断で、3件は臨床

表1 インフルエンザウイルスB型陽性および陰性患者の基本情報および臨床症状

患者の基本情報および臨床症状	インフルエンザ ウイルス B 型陽性** (N=19) n(%)	インフルエンザ 陰性*** (N=283) n(%)
年齢 (歳)		
平均 (±SD)	27.4(±18.3)	33.6(±18.0)
年齢層 (歳)		
0-4	1 (5.3)	6 (2.1)
5-14	5 (26.3)	42(14.8)
15-24	3 (15.8)	51(18.0)
25-34	5 (26.3)	53(18.7)
35-44	1 (5.3)	52(18.4)
45-54	2 (10.5)	37(13.1)
55-64	1 (5.3)	26(9.2)
65 以上	1 (5.3)	16(5.7)
性別		
男性	11(57.9)	190(67.1)
年齢	8 (42.1)	93(32.9)
発熱日数 (日) *		
平均 (±SD)	1.8(±0.6)	1.9(±1.1)
受診時の体温 (°C) *		
平均(±SD)	38.2(±0.6)	38.0(±0.4)
症状 (有り)		
咳嗽 (n=302)*	13(68.4)	200(70.7)
鼻汁 (n=302)	17(89.5)	257(90.8)
咽頭痛 (n=114)	7(53.8)	40(39.6)

* WHO 規定のインフルエンザ症状および急性呼吸器感染症の定義に基づく (2014)。

** ウイルス分離培養及び臨床検体からリアルタイム PCR により B 型インフルエンザを検出した症例。

*** 迅速診断キットによる A 型インフルエンザ陽性と RSV 陽性を含む。

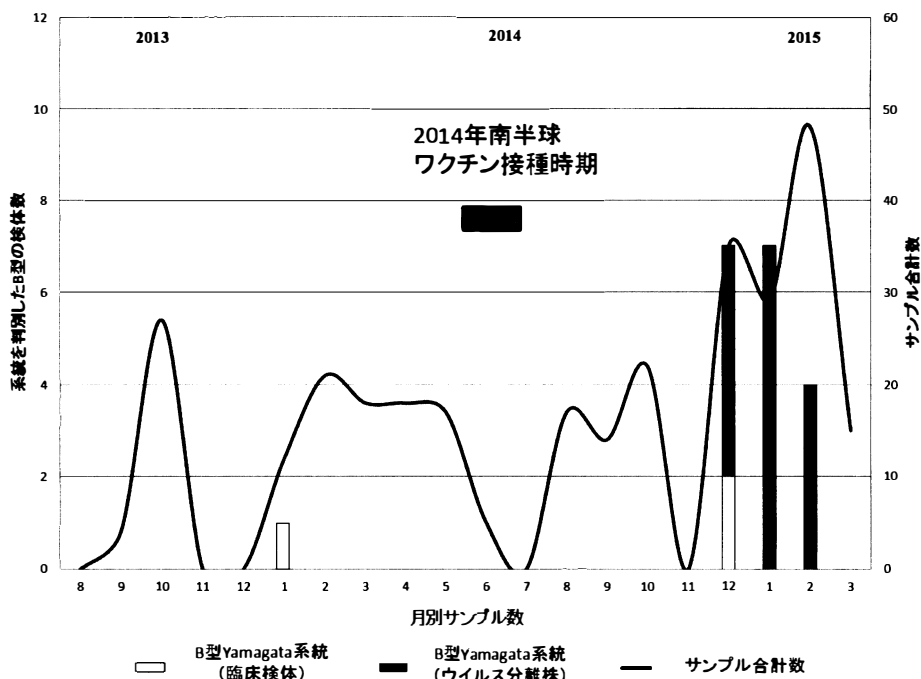


図1 月別検体数と実験室的診断により検出されたインフルエンザの件数

2013年8月～2015年3月まで302件のインフルエンザ様症状の患者から検体が採取され、B山形系統のインフルエンザウイルスのみ19件検出された。うち16件はウイルス分離で検出され、残りの3件は臨床検体からリアルタイムPCRを使って検出された。

表2 インフルエンザウイルスB型山形系統の16株のHAおよびNA遺伝子の遺伝子データベース(GISAID)の登録番号

株名	検体収集日	GISAID	GISAID
		HA 遺伝子	NA 遺伝子
B/ Malaysia/14MA061/2014	04/12/2014	EPI629307	EPI629306
B/ Malaysia/14MA062/2014	06/12/2014	EPI629309	EPI629308
B/ Malaysia/14MA089/2014	10/12/2014	EPI629316	EPI629317
B/ Malaysia/14MA112/2014	22/12/2014	EPI629328	EPI629329
B/ Malaysia/14MA097/2014	29/12/2014	EPI629318	EPI629319
B/ Malaysia/14MA114/2015	02/01/2015	EPI629330	EPI629331
B/ Malaysia/14MA072/2015	07/01/2015	EPI629310	EPI629311
B/ Malaysia/14MA098/2015	09/01/2015	EPI629320	EPI629321
B/ Malaysia/14MA116/2015	09/01/2015	EPI629332	EPI629333
B/ Malaysia/14MA118/2015	12/01/2015	EPI629334	EPI629335
B/ Malaysia/14MA100/2015	14/01/2015	EPI629322	EPI629323
B/ Malaysia/14MA104/2015	23/01/2015	EPI629324	EPI629325
B/ Malaysia/14MA084/2015	04/02/2015	EPI629312	EPI629313
B/ Malaysia/14MA106/2015	05/02/2015	EPI629326	EPI629327
B/ Malaysia/14MA124/2015	06/02/2015	EPI629336	EPI629337
B/ Malaysia/14MA086/2015	07/02/2015	EPI629314	EPI629315

イタリック体；WHO 推奨南半球向け
ワクチン株
太字；本研究においてマレーシア
で分離した B 型株

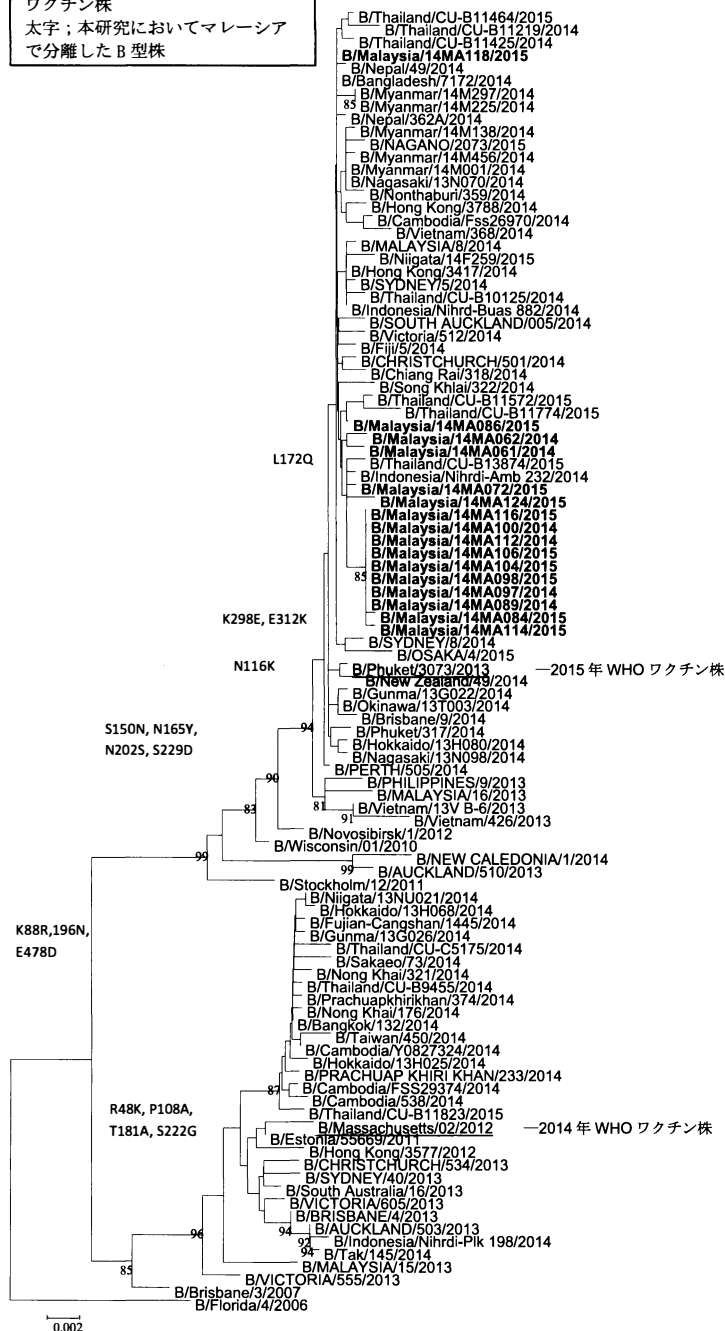


図2 インフルエンザウイルス B 型山形系統の HA 遺伝子の系統樹解析

2014, 2015 年にマレーシアで採取された全ての B 型の HA 遺伝子は山形系統クレード3に属し, 2014 年の WHO 推奨の南半球のインフルエンザワクチン株 (B/Massachusetts/02/2012, クレード2) とは遺伝子配列が異なっていた。これらマレーシアで採取された B 型は, タイおよびインドネシア等東南アジア諸国で発生した B 型と近縁であった。2014, 2015 年の 10 株が 85% の高いブートストラップ値をしめし, 独立したグループを形成した。

ック体；WHO 推奨南半球向け
ン株
本研究においてマレーシア
した B 型株

B/NAGANO/2073/2015
B/Nagasaki/13N070/2014
93 B/Cambodia/Fss26970/2014
B/Vietnam/368/2014
B/Myanmar/14M001/2014
B/Myanmar/14M138/2014
B/Malaysia/14MA106/2015
B/Malaysia/14MA084/2015
B/Malaysia/14MA086/2015
B/Malaysia/14MA118/2015
B/Myanmar/14M456/2014
B/Nonthaburi/359/2014
B/SYDNEY/8/2014
B/Victoria/512/2014
B/Bangladesh/7172/2014
B/OSAKA/4/2015
82 B/Malaysia/14MA072/2015
B/Malaysia/14MA116/2015
B/Malaysia/14MA100/2015
B/Malaysia/14MA104/2015
B/Malaysia/14MA098/2015
B/Malaysia/14MA114/2015
B/Malaysia/14MA112/2014
B/Malaysia/14MA097/2014
B/Malaysia/14MA089/2014
B/Fiji/5/2014
B/Nepal/49/2014
B/SYDNEY/5/2014
B/Hong Kong/3417/2014
B/Myanmar/14M225/2014
B/Myanmar/14M297/2014
B/Indonesia/Nihrd-Buas 882/2014
B/SOUTH AUCKLAND/005/2014
B/Thailand/CU-B10125/2014
B/New Zealand/49/2014
B/Chiang Rai/318/2014
B/Phuket/3073/2013
B/Thailand/CU-B11425/2014 — 2015 年 WHO ワクチン株
B/MALAYSIA/8/2014
B/Thailand/CU-B13874/2015
94 B/Malaysia/14MA061/2014
B/Malaysia/14MA062/2014
B/Hong Kong/3788/2014
B/Song Khai/322/2014
B/CHRISTCHURCH/501/2014
B/Nigata/14F259/2015
B/Malaysia/14MA124/2015
B/Thailand/CU-B11572/2015
B/Nepal/362A/2014
B/Thailand/CU-B11774/2015
B/Hokkaido/13H080/2014
B/Nagasaki/13N098/2014
95 B/PERTH/505/2014
B/Gunma/13G022/2014
B/Okinawa/13T003/2014
B/Brisbane/9/2014
88 B/Indonesia/Nihrd-Amb 232/2014
B/Thailand/CU-B11219/2014
75 B/Thailand/CU-B11464/2015
B/NEW CALEDONIA/1/2014
99 B/Stockholm/12/2011
B/AUCKLAND/510/2013
94 B/Vietnam/426/2013
B/Vietnam/13V B-6/2013
93 B/MALAYSIA/16/2013
B/PHILIPPINES/9/2013
75 B/Novosibirsk/1/2012
B/Wisconsin/01/2010
B/Cambodia/Fss29374/2014
B/Bangkok/132/2014
B/Cambodia/Y0827324/2014
B/Nong Khai/176/2014
B/Nong Khai/321/2014
B/Taiwan/450/2014
B/Thailand/CU-B9455/2014
B/Hokkaido/13H025/2014
B/Julian-Cangshan/1445/2014
B/PRACHIN/PHIRI KHAN/233/2014
B/Sakaeo/73/2014
B/Gunma/13G026/2014
B/Thailand/CU-B11823/2015
B/Thailand/CU-C5175/2014
B/SYDNEY/40/2013
B/South Australia/16/2013
B/Prachuapkhirkhan/374/2014
81 B/VICTORIA/555/2013
B/VICTORIA/605/2013
80 B/Hokkaido/13H088/2014
B/Nigata/13NU021/2014
B/Hong Kong/3577/2012
B/BRISBANE/4/2013
B/Tak/145/2014
95 B/Indonesia/Nihrd-Plk 198/2014
B/AUCKLAND/503/2013
B/CHRISTCHURCH/534/2013
86 B/MALAYSIA/15/2013
B/Cambodia/538/2014
B/Estonia/5566/2011
B/Massachusetts/02/2012 — 2014 年 WHO ワクチン株
B/Brisbane/3/2007
B/Florida/4/2006
0.002

2

NA 遺伝子は、HA 遺伝子と同様に全てクレード 3 に属し、2014 年の WHO 推奨の南半球向けのインフルエンザワクチン株 (B/Massachusetts/02/2012, クレード 2) とは遺伝子配列が異なっていた。2014 年の NA 遺伝子は、香港、タイおよび日本で発生した B 型と近縁であった。2015 年の NA 遺伝子は、ミャンマー、タイ、ネパールおよび日本と近縁であった。2014、2015 年に採取された 9 株が 82% のブートストラップ値を示し独立したグループを形成した。HA 遺伝子と NA 遺伝子で独立したグループを形成するウイルスの内容が数株異なっており、リアソータンが起こったと考えられる。

検体を用いた診断であった。A型インフルエンザはウイルス分離検体から全く検出されなかったため、臨床検体を使って再度検出を試みたが検出できなかった。このため以降の解析はB型インフルエンザのみで行った。

B型インフルエンザ患者の平均年齢は27.4歳(標準偏差18.3歳)で、57.9%が男性であった。年代別では、5～14歳(26.3%)、15～24歳(15.8%)、25～34歳(26.3%)の若い世代で多かった。受診時の体温と発熱期間はB型インフルエンザ群と陰性群の間に差がなかった(表1)。

臨床検体の推移からは、インフルエンザ様疾患患者の季節性ははっきりとしなかった(図1)。実験室的診断によるB山形系統ウイルスが検出されたのは12月から2月にかけての期間のみであった。2014年1月に1件、2014年12月に7件、2015年1月に7件、2015年2月に4件が検出された。分離された16株の、遺伝子配列の遺伝子データベースへの登録番号および検体の採取日を示した(表2)。臨床検体から検出された3件のB山形系統ウイルスは、2014年1月に1件と12月に2件検出されたが、RNA量が少なく遺伝子解析できなかったため樹形図解析には用いなかった。

検出された全てのB山形系統のHAおよびNA遺伝子はWHOが2015年の南半球ワクチン株(2015年5月以降接種開始)として指定したB/Phuket/3073/2013に代表されるクレード3に属していた(図2、図3)。しかし、WHOが2014年に南半球のワクチン株として指定したB/Massachusetts/02/2012はクレードに2に属しており、検出されたマレーシアの株とは遺伝子的に離れていた。2014年の南半球ワクチン接種は5月から開始され、我々のB型が採取された時期も2014年ワクチンによりカバーされる時期であった。HA遺伝子の大半は、遺伝子系統樹において、タイやインドネシアのB山形系統クレード3の株の周辺に集まっていた。特にB/Malaysia/14MA116/2015に代表される10株は、ほぼ同一配列を持ち、ブートストラップ値が85%を示して独立したグループを形成した。

NA遺伝子に関しては、HA遺伝子と同様に流行株はクレード3であり2015年の南半球ワクチン株であるB/Phuket/3073/2013と同じグループに属していたが、2014年のB型ワクチン株(B/Massachusetts/02/2012、クレード2)とは異なっていた。検出されたB山形系統のNA遺伝子は、タイ、ミャンマー、タイ、ネパール、香港、日本およびオセアニアの株と近縁であった。B/Malaysia/14MA072/2015に代表される2014年の3株と2015年の6株が、遺伝子系統樹上で独立したクラスターを形成し、82%と高いブートストラップ値を示した(図3)。興味深いことに、HA遺伝子の同一グループ10株のうち、8株はNAも同じグループに属していたが、2株(B/Malaysia/14MA084/2015、B/Malaysia/14MA106/2015)は少し異なる配列をもち別のマレーシアの株と集簇していた(図2、3)。これは、マイナーではあるものの、クレード内の遺伝子再集合(リアソータント)がHA遺伝子とNA遺伝子の間で起こったことを示している。なお、今回のマレーシアの分離株中には、Bビクトリア系統との系統間リアソータントや、クレード2と3の間で起こるクレード間リアソータントなどのメジャーな遺伝子再集合株は見られなかった。

マレーシアで採取されたB山形系統株は、日本の株43株同様に4種類全てのNAIに対して感受性であった。マレーシアのB型株におけるIC₅₀の中央値(四分位範囲)は、ペラミビル、オセルタミビル、ザナミビルおよびラニナミビルの4種類のNAIに対し、それぞれ0.37(0.1)、8.96(2.53)、4.50(1.65)、1.27(0.27)であった。日本のB型株のIC₅₀の中央値(四分位範囲)は、2.02(0.58)、16.81(6.01)、27.52(10.44)、5.75(1.27)であった。WHO標準B型株(B/Perth/211/2001)のIC₅₀の中央値は、0.52、24.85、11.02、2.59であり、マレーシア株、日本株、WHO標準株はほぼ同様の値を示し、NAI耐性株の出現はなかった(図4)。

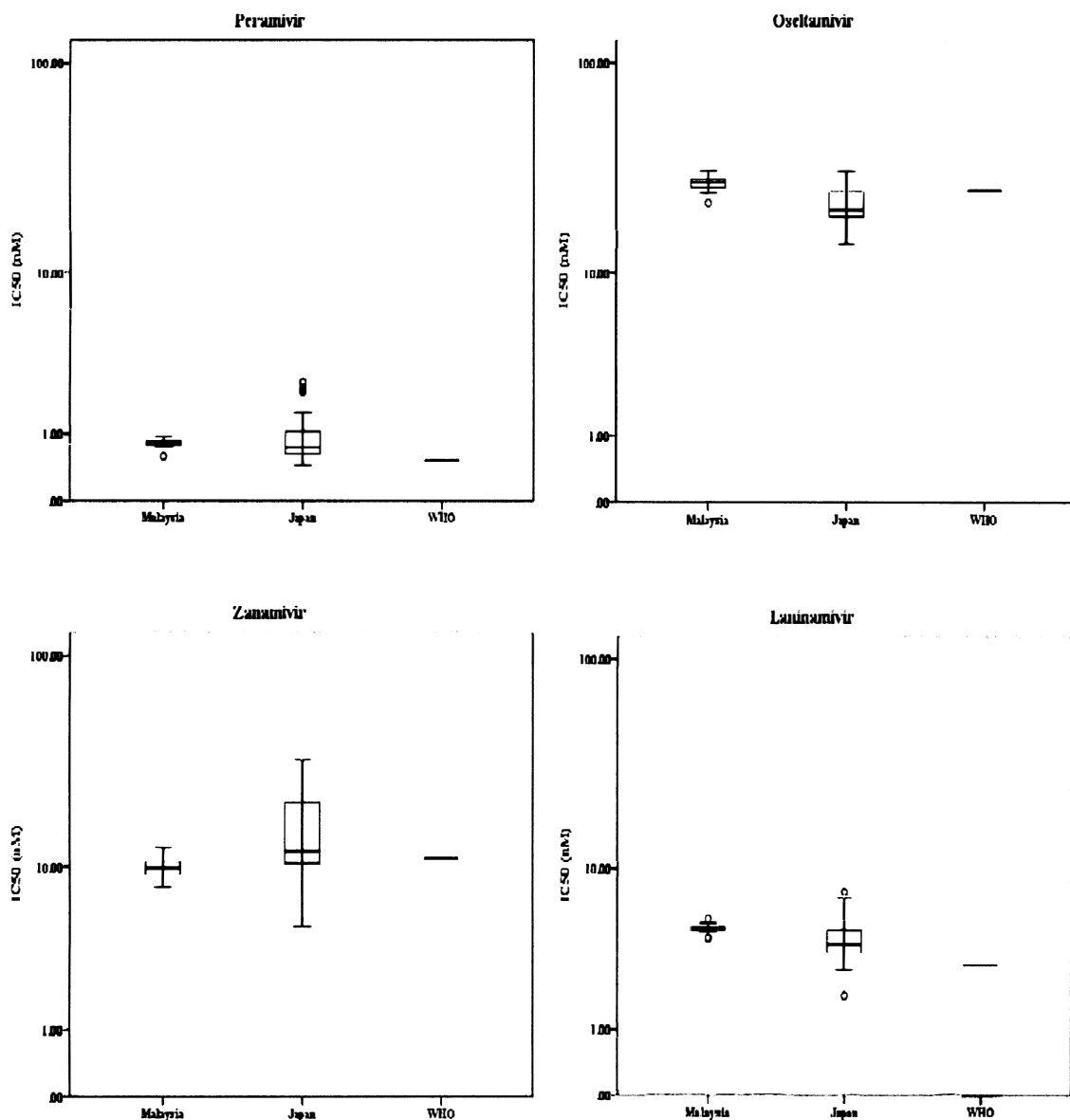


図4 本研究で分離したマレーシアのインフルエンザウイルス B 型山形系統株のノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) に対する薬剤感受性

本研究で分離したマレーシアの B 型株は、対照である薬剤感受性の日本の B 型 43 株および WHO の標準株と同様に 4 種類全ての NAI に対して感受性であった。各 NAI に対する IC_{50} の中央値 (四分位範囲) は、ペラミビル、オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビルの順に、マレーシアの B 型株が 0.37 (0.1), 8.96 (2.53), 4.50 (1.65), 1.27 (0.27), 日本の薬剤感受性の B 型株が 2.02 (0.58), 16.81 (6.01), 27.52 (10.44), 5.75 (1.27), WHO 標準の薬剤感受性の B 型株が 0.52, 24.85, 11.02, 2.59 であった。

考 察

本研究では、2013年～2015年まで1年8ヶ月にわたりマレーシアでインフルエンザの疫学研究を行った。マレーシアのB型インフルエンザは同時期の東南アジアの周辺国や日本、香港、オセアニアとの相関性が高いこと、HAとNA遺伝子間でわずかながら遺伝子再集合が起こっていることが判明した。NAIに対する薬剤耐性株の出現はなかった。

2004年から2008年に日本で流行したインフルエンザに関する過去の研究では、A型とB型ともに5～9歳の小児で最も罹患率が高かった²⁰⁾。本研究では、B型インフルエンザ患者の年齢分布は、5～14歳の小児に次いで、25～34歳の青年層が多かった。この違いにはマレーシアの受療行動が影響している可能性がある。マレーシアの小児のほとんどは医療受診の機会は成人と同様である。例としてマレーシアの私立診療所における各年齢層別の受診率は、10歳未満で13.8%、10-19歳で10.5%、20-59歳で12.9-17.1%であったというデータがあり、本研究の結果と一致していた²¹⁾。逆にインフルエンザの検出率が全体的に少なかったのは、成人患者が比較的多かったことも影響しているかもしれない。

本研究では、11月から2月の期間にインフルエンザ陽性検体が多かったが、マレーシアにおけるインフルエンザウイルスの流行の時期は必ずしも一定していない。昨今の研究では、インフルエンザの流行は降雨量、湿度、降雨日数と有意な相関があり、流行のピークは5月から8月の間にあったと報告している¹⁰⁾。一方で、他の研究ではウイルス培養陽性件数は9月から12月の間にピークがあったとしている⁷⁾⁹⁾。その他にも、インフルエンザの流行のピークは10月から翌年5月の間にあり、6月から9月に最も少なかったという報告がある¹⁰⁾。世界的に見た場合、熱帯亜熱帯では、雨期にインフルエンザ流行が起こりやすく、地域によっては一年に二回(5～6月頃と12～2月頃)流行することもある²²⁾。雨量との関係も大きく、地域により気候条件と流行状況が大

きく異なる可能性もある。今回、われわれは2年弱と短期間の調査に留まり、さらにインフルエンザの検出率も低かったため、マレーシアにおける気候とインフルエンザの流行との関連についてはさらなる検討が必要である。

同じくタイの研究において、2015年にはB山形系統(77.5%)が優勢であったのが、2016年にはBビクトリア系統が優勢になった(62.3%)と報告している¹⁸⁾。2015年にタイでB山形系統が優勢であったことは、マレーシアの状況とよく似ており、二つの国で頻繁に人の行き来による伝播が起こっていることを示唆している。

本研究で検出されたB型株のほとんどは近隣の東南アジア諸国、日本や香港およびオセアニアで流行したB型株と近縁であった。WHOのWeekly Epidemiological Recordによると、世界的に2014年～2015年には、Bビクトリア系統とB山形系統が同時に流行し、B山形系統が優勢であったと報告している⁵⁾⁶⁾。B山形系統のHA遺伝子はクレード2と3に分かれ、この時期には世界的に大部分がクレード3に属した⁵⁾。マレーシアでは、B型の流行株は、2012～2013年にはビクトリア系統から山形系統への変化があり、さらに2013～2014年にはB山形系統の中でクレード2からクレード3へ変化したことが報告されている²⁾。2014～2016年にタイで行われた研究では、73件のB型インフルエンザのHA遺伝子の系統樹解析の結果、B山形系統のクレード3が最多で61.6%、B山形系統クレード2は17.8%、Bビクトリア系統クレード1は20.6%であった²³⁾。2015年にはB山形クレード3が優勢でマレーシアとよく似ており、2016年にはBビクトリアクレード1に推移していた。

マレーシアを含む東南アジア諸国では、南半球ワクチンの接種が推奨されている²⁾¹⁸⁾。我々が分離したB山形系統ウイルスは、2014年の南半球ワクチン株であるB/Massachusetts/2/2012(クレード2)とは明らかに抗原性が異なり、B/Phuket/3073/2013様(クレード3)ウイルスに近縁である。B/Massachusetts/2/2012はB山形系統クレード2のウイルスに対し抗HA抗体を効

果的に誘導するが、クレード3のウイルスに対してはGMT (Geometric Mean Titer: 幾何平均抗体価) が有意に減弱するため、ワクチンが有効ではない可能性がある⁵⁾。このように、流行株にあわせるために2015年の南半球のワクチン株はB/Phuket/3073/2013株に変更された⁵⁾⁶⁾。

B型は、三価ワクチンとして従来B山形かBビクトリアのどちらか一つが選択されていたため、ワクチン株と流行株が一致しないことがしばしばみられた。さらに、B山形系統はクレード2とクレード3で抗原性が異なるため、ワクチン株との不一致が起きやすい。2000～2013年に行われた世界的なB型インフルエンザ研究においても約25%のシーズンにおいてワクチン株の不一致が認められた²⁴⁾。マレーシアにおいては、1995年から2008年の間にB型インフルエンザのワクチン株と流行株との不一致が37.5%の高い頻度で起こっている²⁾。東南アジアを巻き込んだWHOのサーベイランスが不十分であることが原因の1つである。B型インフルエンザのワクチン不一致によるワクチン効果への影響を最小限に抑えるために、WHOは2013年に加盟国に対し、従来の三価ワクチンまたは、B/Brisbane/60/2008様ウイルスを加えた2つのB型インフルエンザウイルスを含む四価ワクチンを推奨することを決定した⁵⁾²⁵⁾。アメリカ、日本、イギリス、オーストラリアといった限られた国では、流行株とワクチン株の不一致の問題を克服するために既に四価ワクチンを使い始めている。

我々は、HA遺伝子とNA遺伝子でグループが異なる非常にマイナーなクレード内遺伝子再集合株を見いだした。一般的にB型インフルエンザは遺伝子再集合が起こりやすく、B山形とBビクトリアでの系統間や、B山形系統のクレード間遺伝子再集合が知られている。我々の分離株からはそのようなメジャーな遺伝子再集合株はいずれも検出されなかった。タイの報告では2014～2016年にB山形とBビクトリア系統で交雑した遺伝子再集合(リアソータント)株が5株(6.8%)報告された¹⁸⁾。マレーシアからも2012～2014年にB型でクレード間やクレード内の様々な遺伝

子再集合株が多数報告された¹⁰⁾。B型はアミノ酸のポイント変異によって生じる変化より、遺伝子再集合を繰り返して進化している。今後も新たな遺伝子再集合により新しい抗原性の株が出現する可能性があるため監視が必要である。

我々がマレーシアで分離したB型インフルエンザはNAIであるペラミビル、オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビルに対して全て感受性であった⁵⁾。薬剤耐性B型インフルエンザウイルス株は市中に拡がっているわけではない。大部分のB型の耐性株は散発的に報告されているのみである²⁶⁾。2014～2015年に世界的な薬剤耐性株をWHOが調査した結果、B山形系統の耐性株は1%程度であった²⁶⁾。2012～2014年にマレーシアより、オセルタミビルとペラミビルに耐性を示すH273Y変異(H1ナンバリングではH275Y変異)がBビクトリア系統で2株(2.9%)見つかった¹⁰⁾。しかしながら、遺伝子変異の確認をしたのみで我々のようなNAIを使った薬剤感受性試験を行っていない。このためマレーシアの流行株への本格的なインフルエンザの薬剤感受性調査としては本報告が初である。シンガポールからペラミビルに対する感受性が減弱したBビクトリア系統株が1株、報告された⁶⁾。この株にはN151Tのアミノ酸変異があった。マレーシアでは通常、インフルエンザの治療にNAIを用いていない。しかし、今後NAIの処方がマレーシアで増えた場合や輸入による耐性株の増加はあり得る。このため、日常のサーベイランスで感受性を監視する必要がある。

本研究の限界は、迅速診断B型陽性の29症例中、ウイルス培養できた症例が16例(55.2%)と少なかったことがあげられる。さらに、迅速診断キットでA型陽性であった29件から、全くA型インフルエンザウイルスが検出できなかった。いくつかの研究によると、インフルエンザの培養陽性率は9.1～31.6%である⁷⁾¹⁰⁾²⁷⁾²⁸⁾。培養陽性の数が少なかったことにはいくつかの要因がある。マレーシアの高い気温が検体に影響を与え、培養率が下がった可能性がある。マレーシアの年間を通じた平均の最高気温は34.7～35.8度と高

く、検体採取や検体輸送の際に常温(高温)にさらされてしまったことがウイルス検出低下に影響したと思われる。採取技術が未熟であった点も培養陽性率が低かった原因の一つと考えられる。マレーシアでは日常的に迅速診断キットが使われていないため検体採取の訓練をしたものの、結果的にはウイルス量や状態が十分確保できなかった。A型インフルエンザが全く検出できなかった理由は不明である。A型とB型インフルエンザウイルスでは温度に対する感受性が異なり、B型の方が高温に強い可能性があるが検証が必要である。

結 論

本研究において調査したマレーシアのB型インフルエンザは全て山形系統であり、クレード3に属していた。これらの流行株はマレーシアに近接した南アジアおよびオセアニア諸国で流行していたB型株と遺伝子的に近縁であった。2014年WHO推奨の南半球のB型ワクチン株とは異なっていた。HA遺伝子とNA遺伝子でグループが異なる、マイナーなクレード内遺伝子再集合体が2株見つかった。本研究において調査した全てのB型株は4種類のNAIに対して感受性であった。マレーシアで流行するB型インフルエンザの発生動向、ウイルスの遺伝学的特徴および薬剤感受性を明らかにするために今後も継続的な調査が必要である。

謝 辞

本研究は、文部科学省の日本学術振興会研究拠点形成事業 B. アジア・アフリカ学術基盤形成型および科研費による研究補助を受けた。また、日本医療開発機構(AMED)感染症研究国際展開戦略プログラム(J-GRID)から一部研究補助を受けた。

研究遂行と論文作成に当たり、新潟大学大学院医歯学総合研究科・国際保健・齋藤玲子教授、菖蒲川由郷准教授、齋藤孔良助教、小田切崇助教(現・岩手医大)、日比野亮信先生、近藤大貴先生、八神鍊先生に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ and Oxford J: The burden of influenza B: a structured literature review. *American journal of public health* 103: e43-51, 2013.
- 2) Sam IC, Su YC, Chan YF, Nor ES, Hassan A, Jafar FL, Joseph U, Halpin RA, Ghedin E, Hooi PS, Fourment M, Hassan H, AbuBakar S, Wentworth DE and Smith GJ: Evolution of Influenza B Virus in Kuala Lumpur, Malaysia, between 1995 and 2008. *Journal of virology* 89: 9689-9692, 2015.
- 3) Turner D, Wailoo A, Nicholson K, Cooper N, Sutton A and Abrams K: Systematic review and economic decision modelling for the prevention and treatment of influenza A and B. *Health technology assessment (Winchester, England)* 7: iii-iv, xi-xiii, 1-170, 2003.
- 4) Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP and Nerome K: Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 175: 59-68, 1990.
- 5) World Health Organization: Recommended Composition Of Influenza Virus Vaccines For Use In The 2015 Southern Hemisphere Influenza Season. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 89: 441-452, 2014.
- 6) World Health Organization: Recommended Composition Of Influenza Virus Vaccines For Use In The 2015-2016 Northern Hemisphere Influenza Season. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 90: 97-108, 2015.
- 7) Saat Z, Abdul Rashid TR, Yusof MA, Kassim FM, Thayan R, Kuen LS, Othman KA and Saraswathy TS: Seasonal influenza virus strains circulating in Malaysia from 2005 to 2009. *The Southeast Asian journal of tropical*

- medicine and public health 41: 1368-1373, 2010.
- 8) Sam IC, Abdul-Murad A, Karunakaran R, Rampal S, Chan YF, Nathan AM and Ariffin H: Clinical features of Malaysian children hospitalized with community-acquired seasonal influenza. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases 14 Suppl 3: e36-40, 2010.
- 9) Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF and Chan YF: Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. BMC pediatrics 12: 32, 2012.
- 10) Oong XY, Ng KT, Lam TT, Pang YK, Chan KG, Hanafi NS, Kamarulzaman A and Tee KK: Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Influenza B Viruses in Malaysia, 2012-2014. PloS one 10: e0136254, 2015.
- 11) World Health Organization: Meetings Of The Who Working Group On Surveillance Of Influenza Antiviral Susceptibility-Geneva, November 2011 and June 2012. Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations 87: 369-374, 2012.
- 12) Dapat C, Saito R, Kyaw Y, Naito M, Hasegawa G, Suzuki Y, Dapat IC, Zaraket H, Cho TM, Li D, Oguma T, Baranovich T and Suzuki H: Epidemiology of human influenza A and B viruses in Myanmar from 2005 to 2007. Intervirology 52: 310-320, 2009.
- 13) Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG and Perez DR: Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Archives of virology 146: 2275-2289, 2001.
- 14) Suzuki Y, Saito R, Zaraket H, Dapat C, Caperig-Dapat I and Suzuki H: Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method. Journal of clinical microbiology 48: 57-63, 2010.
- 15) Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, Dapat C, Caperig-Dapat I, Baranovich T, Suzuki T and Suzuki H: Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. Journal of clinical microbiology 49: 125-130, 2011.
- 16) Dapat IC, Dapat C, Baranovich T, Suzuki Y, Kondo H, Shobugawa Y, Saito R and Suzuki H: Genetic characterization of human influenza viruses in the pandemic (2009-2010) and post-pandemic (2010-2011) periods in Japan. PloS one 7: e36455, 2012.
- 17) Hillis DM and Bull JJ: An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. Systematic Biology 42: 182-192, 1993.
- 18) Tewawong N, Suntronwong N, Korkong S, Theamboonlers A, Vongpunsawad S and Poovorawan Y: Evidence for influenza B virus lineage shifts and reassortants circulating in Thailand in 2014-2016. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 47: 35-40, 2017.
- 19) Dapat C, Kondo H, Dapat IC, Baranovich T, Suzuki Y, Shobugawa Y, Saito K, Saito R and Suzuki H: Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of pandemic and seasonal influenza viruses during the 2009-2010 and 2010-2011 influenza seasons in Japan. Antiviral research 99: 261-269, 2013.
- 20) Kimura Y, Saito R, Tsujimoto Y, Ono Y, Nakaya T, Shobugawa Y, Sasaki A, Oguma T and Suzuki H: Geodemographics profiling of influenza A and B virus infections in community neighborhoods in Japan. BMC infectious diseases 11: 36, 2011.
- 21) Mimi O, Tong S, Nordin S, Teng C, Khoo E, Abdul-Rahman A, Zailinawati A, Lee V, Chen W, Shihabudin W, Noridah M and Fauziah Z: A comparison of morbidity patterns in public and

- private primary care clinics in malaysia. Malaysian family physician: the official journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia 6: 19-25, 2011.
- 22) Bloom-Feshbach K, Alonso WJ, Charu V, Tamerius J, Simonsen L, Miller MA and Viboud C: Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review. PloS one 8: e54445, 2013.
- 23) Horthongkham N, Athipanyasilp N, Pattama A, Kaewnapan B, Sornprasert S, Srisurapanont S, Kantakamalakul W, Amaranond P and Sutthent R: Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014. PloS one 11: e0158244, 2016.
- 24) Caini S, Huang QS, Ciblak MA, Kuszniarz G, Owen R, Wangchuk S, Henriques CMP, Njouom R, Fasce RA, Yu H, Feng L, Zambon M, Clara AW, Kosasih H, Puzelli S, Kadjo HA, Emukule G, Heraud J-M, Ang LW, Venter M, Mironenko A, Brammer L, Mai LTQ, Schellevis F, Plotkin S, Paget J and on behalf of the Global Influenza BS: Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. Influenza and other respiratory viruses 9: 3-12, 2015.
- 25) Barberis I, Martini M, Iavarone F and Orsi A: Available influenza vaccines: immunization strategies, history and new tools for fighting the disease. Journal of Preventive Medicine and Hygiene 57: E41-E46, 2016.
- 26) Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetat B, Fry A, Gubareva L, Huang W, Lackenby A, Lee RT, Lo J, Maurer-Stroh S, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Tilmanis D, Wang D, Zhang W and Meijer A: Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015. Antiviral research 132: 178-185, 2016.
- 27) Ayob A, Selviendran N, Hampson AW, Barr IG, Kumarasamy V and Chua KB: Outbreak of influenza amongst residential school students in Malaysia. The Medical journal of Malaysia 61: 168-172, 2006.
- 28) Rahman MM, Wong KK, Isahak I, Rashid Z, Z and Alfizah H: Identification of genotypes of Influenza A virus in Malaysia. Pakistan journal of medical sciences 30: 1068-1071, 2014.

(平成31年1月15日受付)
