

福岡市におけるインフルエンザウイルスのゲノム解析

讃井武蔵・松平美咲・宮本道彦

福岡市保健環境研究所保健科学課

Genome Analysis of Influenza Virus in Fukuoka City

Musashi SANUI, Misaki MATSUDAIRA and Michihiko MIYAMOTO

Health Science Section, Fukuoka city Institute of Health and Environment

要約

A 型及び B 型インフルエンザウイルスのゲノムは、8 分節化したマイナス鎖 RNA であり、そのゲノムを利用した様々な解析が行われている。福岡市保健環境研究所では次世代シーケンサーから得られたデータについて、ゲノム解析を実施するため Linux 系 OS である Ubuntu を利用した情報解析環境（仮想マシン）を構築した。令和 5 年度（2023 年度）福岡県結核・感染症発生動向調査事業において分離した季節性のインフルエンザウイルス（A 型（H1N1）pdm09, A 型（H3N2）及び B 型ビクトリア系統）について、収集した参照配列に対してマッピングし、結果について評価を行った。さらにゲノム解析によって得られた HA 遺伝子を利用して型別毎に系統樹解析を実施し、国内ワクチン参照株を含めた標準株との比較を行った。また、得られた NA 遺伝子に基づくアミノ酸配列を確認したが、抗インフルエンザ薬 NA 阻害剤オセルタミビル及びペラミビルに対する耐性変異 H275Y は検出されなかった。

Key Words : インフルエンザウイルス influenza virus, 次世代シーケンサー next generation sequencer, 情報解析 data analysis, ゲノム解析 genome analysis, HA 遺伝子系統樹解析 HA gene phylogenetic analysis, NA 阻害剤耐性 NA inhibitor resistance

1 はじめに

インフルエンザウイルスは、発熱、咳嗽、頭痛、筋肉痛、関節痛を主症状とする感染症を起こすウイルスである。インフルエンザウイルスは、A 型～D 型に分類されるが、その中でも A 型及び B 型が季節的な流行を引き起こしている。A 型についてはさらに抗原性の違いから HA（ヘマグルニチン）タンパク 16 種類及び NA（ノイラミニダーゼ）タンパク 9 種類を組み合わせた亜型に分類される。現在 A 型（H1N1）pdm09, A 型（H3N2）、B 型ビクトリア系統及び B 型山形系統の 4 種類が季節性インフルエンザとして、冬季になると世界各地で流行がみられており、国内では 4 価インフルエンザワクチンの参照型とされている。

A 型及び B 型インフルエンザウイルスのゲノムは 8 分節化したマイナス鎖 RNA である。インフルエンザウイルスのゲノム解析を行うことで、HA 遺伝子及び NA 遺伝子による系統樹解析、抗インフルエンザ薬耐性変異の検出等が可能になる。国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸

器系ウイルス研究センター（以下、「感染研」とする。）が作成したインフルエンザ診断マニュアル（第 5 版）¹⁾を参考にすることで、次世代シーケンサーを活用したインフルエンザウイルスのゲノム解析のためのライブラリー調製までは行うことができるが、塩基配列取得後の情報解析については、情報解析環境を独自に構築する必要があった。

本稿では、令和 5 年度（2023 年度）福岡県結核・感染症発生動向調査事業における検査で分離・同定したインフルエンザウイルスについて、独自に構築した情報解析環境（仮想マシン）を利用し、ゲノム解析を実施して得られた結果等について報告する。

2 実験方法

2.1 解析対象

福岡県結核・感染症発生動向調査事業において、2023 年 9 月以降にインフルエンザ病原体定点等から搬入され

た検体（鼻咽頭ぬぐい液等）について、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。分離株のうちモルモット血球を用いた HI（赤血球凝集抑制）試験で型別（A 型（H1N1）pdm09, A 型（H3N2）, B 型ビクトリア系統）が同定された 15 件のインフルエンザウイルス分離株（表 1）について、ゲノム解析の対象とした。

表 1 解析の対象としたインフルエンザ分離株

株名	型別 (系統)	採取年月
A/Fukuoka city/1/2023	H1N1pdm09	Sep-2023
A/Fukuoka city/2/2023	H1N1pdm09	Oct-2023
A/Fukuoka city/3/2023	H3N2	Oct-2023
A/Fukuoka city/4/2023	H3N2	Oct-2023
A/Fukuoka city/5/2023	H3N2	Oct-2023
A/Fukuoka city/6/2023	H1N1pdm09	Nov-2023
A/Fukuoka city/7/2023	H1N1pdm09	Dec-2023
A/Fukuoka city/8/2023	H1N1pdm09	Dec-2023
A/Fukuoka city/9/2023	H1N1pdm09	Dec-2023
A/Fukuoka city/10/2023	H1N1pdm09	Dec-2023
B/Fukuoka city/1/2023	ビクトリア系統	Dec-2023
B/Fukuoka city/1/2024	ビクトリア系統	Jan-2024
B/Fukuoka city/2/2024	ビクトリア系統	Jan-2024
B/Fukuoka city/3/2024	ビクトリア系統	Jan-2024
A/Fukuoka city/1/2024	H3N2	Feb-2024

2.2 試薬・装置等

インフルエンザウイルス分離株からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA mini kit（QIAGEN）を用いて行った。以降の操作は、インフルエンザ診断マニュアル（第 5 版）を参考にした。すなわち、Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase（Thermo Fisher Scientific）により抽出した RNA の逆転写及び PCR 反応を行い、逆転写産物の増幅には、感染研が設計した A 型及び B 型のプライマーセットをそれぞれ用いた。ライブラリー調製は、QIAseq FX DNA Library Kit（QIAGEN）により、断片化反応及びアダプター付加反応を行い、ライブラリーの精製は、Agencourt AMPure XP（BECKMAN COULTER）を用いた。調製したライブラリーは、次世代シーケンサー iSeq 100（illumina）を使用し、塩基配列情報（fastq ファイル）を取得した。

2.3 情報解析

2.3.1 ゲノム解析

次世代シーケンサーから得られたデータは、仮想マシン上で解析を行った。Windows10（OS）を搭載した PC 上に、VMware WorkStation 16 Player にて仮想マシンを作成し、後述するコマンドを実行するために、仮想マシン上の OS は Linux 系 OS である Ubuntu 22.04 LTS を用いた。

作成した仮想マシン上に「bwa」、「samtools」及び「bcftools」コマンドをインストールした。インストールしたコマンドは、図 1 のとおり分節毎に実行し、それぞれゲノム解析（マッピング）及び得られた結果について評価を行った。マッピング用の参照配列は A 型（H1N1）pdm09, A 型（H3N2）及び B 型ビクトリア系統について、それぞれ表 1 のとおり NCBI（National Center for Biotechnology Information : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>>）を通して塩基配列（fasta ファイル）を取得した。

2.3.2 HA 遺伝子による系統樹解析

インフルエンザウイルスは、遺伝子的に多様化が進んでおり、HA 遺伝子系統樹内の集団に対し命名法が検討されている（Github<<https://github.com/influenza-clade-nomenclature>>）。

2.3.1 で得られた各系統の HA 遺伝子配列について、塩基配列解析ソフトウェア MEGA（Molecular Evolutionary Genetics Analysis）version10 を用いて系統樹を作成した。系統樹作成に用いる標準株は、感染研が作成している HA 遺伝子系統樹解析結果²⁾を参考に GISaid（Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data : <<https://gisaid.org>>）を通してワクチン参照株等の HA 遺伝子配列を取得した。なお、系統樹作成は近隣結合法により行い、Boot Strap 値は 1000 とした。

2.3.3 NA タンパクアミノ酸変異の確認

季節性インフルエンザに対する抗インフルエンザ薬 NA 阻害剤オセルタミビル（商品名：タミフル）及びペラミビル（商品名：ラピアクタ）について、H1N1 の場合、NA タンパクの 275 番目のアミノ酸であるヒスチジンがチロシンに変異する（以下、「H275Y」とする。）と耐性に関わることが報告されている³⁾。

2.3.1 で得られた A 型（H1N1）pdm09 の NA 遺伝子配列について、Web アプリケーション Nextclade<<https://clades.nextstrain.org>>にアップロードし、NA タンパクの H275Y 変異を確認した。得られた結果は、薬剤耐性サーベイランス（H275Y スクリーニング PCR）結果と比較した。

なお、Nextclade 解析で選択した「reference dataset」（参照株）は、A/Wisconsin/588/2019 としており、H275Y は有していない。

```
$ bwa index [Nucleotide Accession].fasta
$ bwa mem [Nucleotide Accession].fasta [検体名(R1)].fastq [検体名(R2)].fastq > [検体名-分節番号].sam
$ samtools view -bS [検体名-分節番号].sam > [検体名-分節番号].bam
$ samtools sort [検体名-分節番号].bam -o [検体名-分節番号].bam
$ samtools index [検体名-分節番号].bam
$ samtools mpileup -uf [Nucleotide Accession].fasta [検体名-分節番号].bam | bcftools call -c | vcfutils.pl vcf2fq > [検体名-分節番号]consensus.fasta
$ samtools depth [検体名-分節番号].bam > [検体名-分節番号]coverage.txt
$ awk 'if($3 >= 30) count++' END{printf("%.2f%%\n", (count/NR)*100)} [検体名-分節番号]coverage.txt
```

図1 ゲノム解析（マッピング）実行コマンド

表2 マッピングに用いた各系統8分節の Nucleotide Accession

分節番号 (遺伝子名)	A 型 (H1N1)pdm09	A 型 (H3N2)	B 型 ビクトリア系統
1	NC_026438.1	NC_007373.1	NC_002204.1
2	NC_026435.1	NC_007372.1	NC_002205.1
3	NC_026437.1	NC_007371.1	NC_002206.1
4(HA)	NC_026433.1	NC_007366.1	NC_002207.1
5	NC_026436.1	NC_007369.1	NC_002208.1
6(NA)	NC_026434.1	NC_007368.1	NC_002209.1
7	NC_026431.1	NC_007367.1	NC_002210.1
8	NC_026432.1	NC_007370.1	NC_002211.1

3 実験結果及び考察

3.1 ゲノム解析

ゲノム解析を実施した15件の分離株について、分節毎のマッピング結果を表2に示す。結果は参照配列に対してマッピングされたリードが30以上あった領域の割合(%)を集計した。以降の解析に用いる分節4(HA

遺伝子)、分節6(NA遺伝子)については、いずれの型別においても95%以上の領域で30以上のリードが確保されており、精度良くマッピングされていた。型別によってはマッピングの精度が低い傾向にある分節も確認されたため、参照配列の変更、de novo assemble法の活用等も今後検討していく必要がある。

表3 A型(H1N1)pdm09分離株のゲノム解析結果

A型(H1N1)pdm09	分節番号							(%)
	1	2	3	4(HA)	5	6(NA)	7	
A/Fukuoka city/1/2023	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
A/Fukuoka city/2/2023	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	100.00	100.00
A/Fukuoka city/6/2023	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	100.00	100.00
A/Fukuoka city/7/2023	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
A/Fukuoka city/8/2023	89.21	81.13	100.00	100.00	100.00	99.93	100.00	100.00
A/Fukuoka city/9/2023	64.30	75.42	100.00	100.00	100.00	99.93	100.00	100.00
A/Fukuoka city/10/2023	76.18	80.87	100.00	100.00	100.00	99.93	100.00	100.00

表 4 A 型 (H3N2) 分離株のゲノム解析結果

A 型(H3N2)	分節番号							(%)
	1	2	3	4(HA)	5	6(NA)	7	8
A/Fukuoka city/3/2023	89.28	83.04	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
A/Fukuoka city/4/2023	66.89	73.75	96.28	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
A/Fukuoka city/5/2023	100.00	85.18	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
A/Fukuoka city/1/2024	75.05	82.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表 5 B 型ビクトリア系統分離株のゲノム解析結果

B 型ビクトリア系統	分節番号							(%)
	1	2	3	4(HA)	5	6(NA)	7	8
B/Fukuoka city/1/2023	50.53	84.04	58.77	95.94	100.00	100.00	100.00	98.36
B/Fukuoka city/1/2024	86.15	86.67	80.71	96.54	100.00	100.00	100.00	98.27
B/Fukuoka city/2/2024	96.41	93.00	87.94	97.07	100.00	100.00	100.00	97.81
B/Fukuoka city/3/2024	96.62	96.93	88.17	96.53	100.00	100.00	100.00	94.89

3.2 HA 遺伝子による系統樹解析

3.1 で得られた A 型 (H1N1) pdm09, A 型 (H3N2) 及び B 型ビクトリア系統による HA 遺伝子について, 系統樹の結果をそれぞれ図 2~図 4 に示す。

A 型 (H1N1) pdm09 は, A/Fukuoka city/1/2023 (2023 年 9 月採取) が 2023/24 シーズン (3 月 21 日時点) に感染研で系統樹解析された分離株の 28.6% 程度を占めている「6B.1A.5a.2a」に分類された²⁾。一方で 2023 年 10 月以降に採取されたその他の株については,

「6B.1A.5a.2a」からさらに複数変異 (「P137S」, 「K142R」, 「D260E」, 「T277A」, 「E356D」, 「I418V」及び「N451H」) を獲得した「6B.1A.5a.2a.1」に分類された。本系統は, 2023/24 シーズン (3 月 21 日時点) に感染研で系統樹解析された分離株の 71.4% を占めている系統であり²⁾, 国内ワクチン参照株と同系統であった。

A 型 (H3N2) は, 解析を行った全ての分離株について「3C.2a1b.2a.2a.3a.1」に分類され, 2023/24 シーズンの国内ワクチン参照株の系統である「3C.2a1b.2a.2a」からさらに複数の変異 (「D53N」, 「N96S」, 「I192F」, 「N378S」, 「E50K」, 「I140K」, 及び「I223V」) を獲得した下位系統であったが, 福岡市保健環境研究所で行った HI 試験における HI 価は抗血清力価から 2 倍以内であったことから, 本系統は国内のワクチンが比較的有効であったと考えられた。また, 本系統は感染研で系統樹解析された分離株の 95.3% を占めていたが, 同研究所にお

ける抗原性解析において, 90% 以上の株がワクチン参照株抗血清との反応性が 2 倍以内又は 4 倍であった²⁾。

B 型ビクトリア系統は, 解析した全ての分離株において, 国内ワクチン参照株である「V1A.3a.2」と同系統のものに分類された。

A 型 (H1N1) pdm09, A 型 (H3N2), B 型ビクトリア系統はいずれもさらに詳細な分類である「subclade」が検討されている。subclade は, 定期的に新規系統が追加されており, 今後は分離株遺伝子情報の収集方法も確立していく必要がある。

3.3 NA タンパクアミノ酸変異の確認

3.1 で得られた A 型 (H1N1) pdm09 の NA 遺伝子について, 解析を行った分離株からオセルタミビル及びペラミビルに対する耐性 H275Y 変異は検出されなかった。また, 薬剤耐性サーベイランスとして実施している H275Y スクリーニング PCR 結果と結果に相違はなかった。

アミノ酸変異の確認による解析は, その他の抗インフルエンザ薬の耐性変異にも同様の解析が行えると推測される。NA タンパク及び PA タンパクに作用する薬剤の既知の代表的な耐性変異は, WHO の Publications^{3, 4)} にまとめられているため, 今後さらなる薬剤耐性情報を収集し, 応用を検討していく。

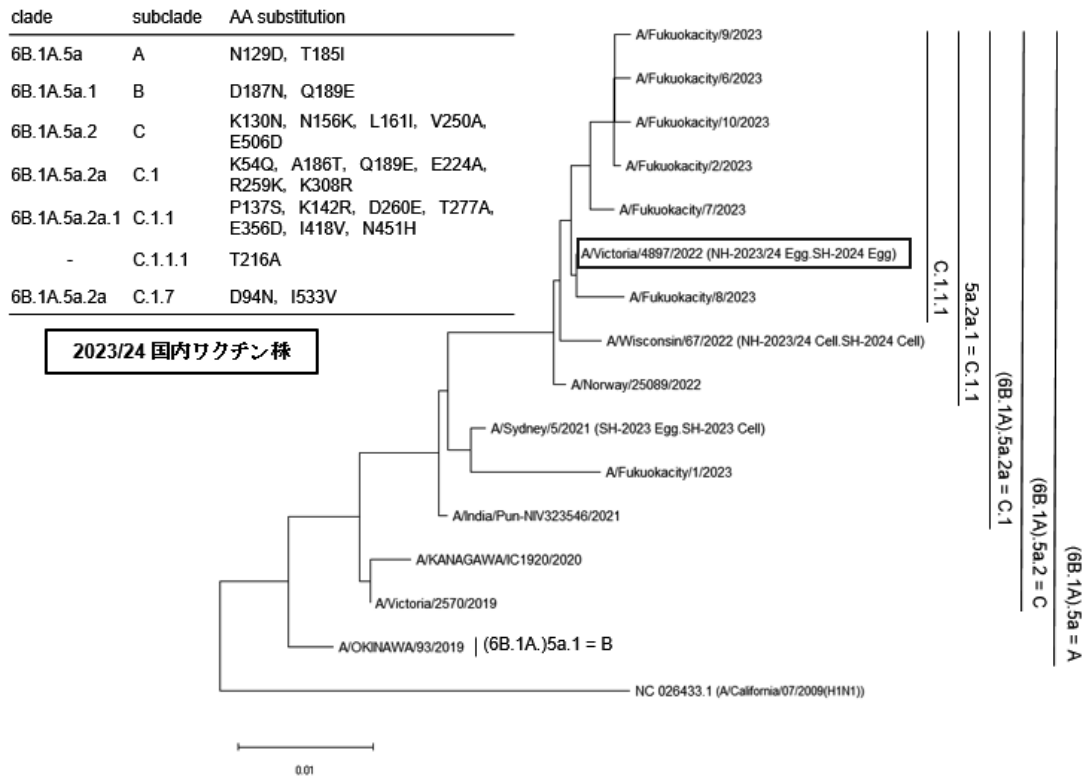


図2 A型 (H1N1) pdm09 の HA 遺伝子系統樹

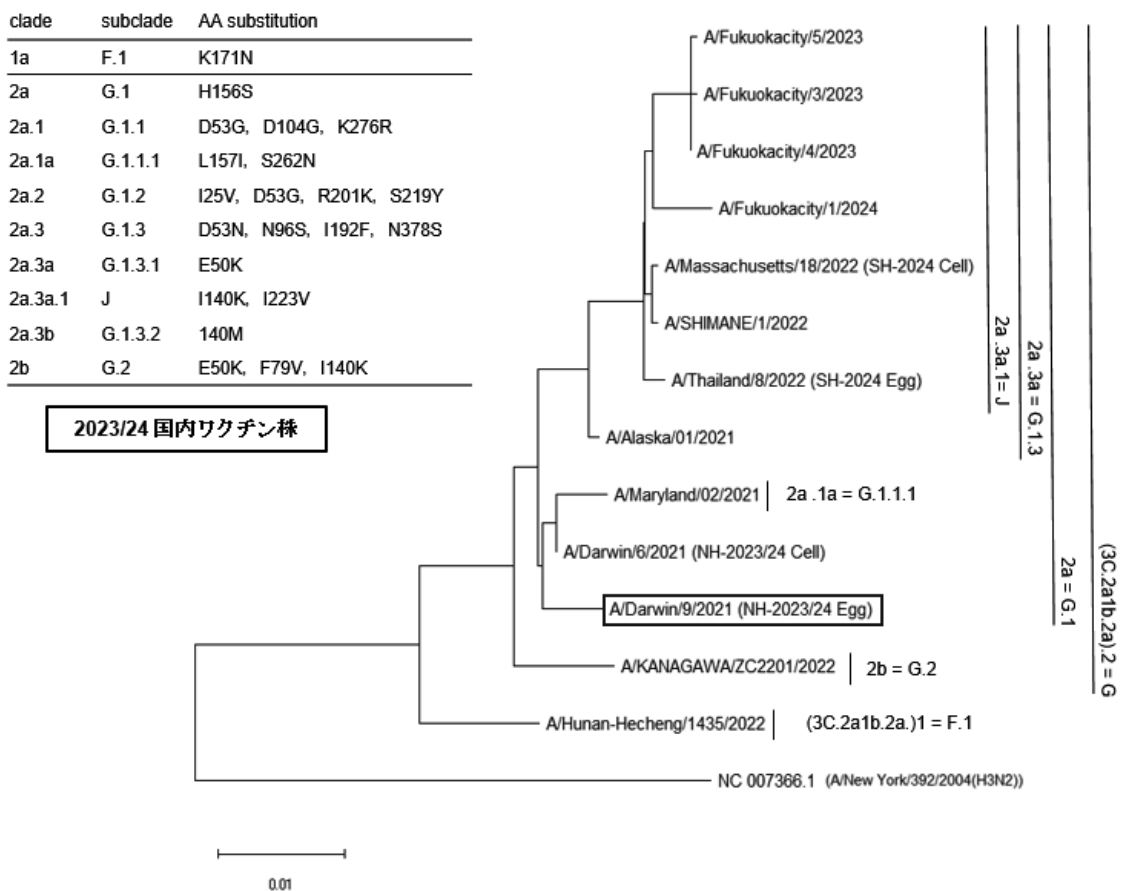


図3 A型(H3N2)のHA遺伝子系統樹

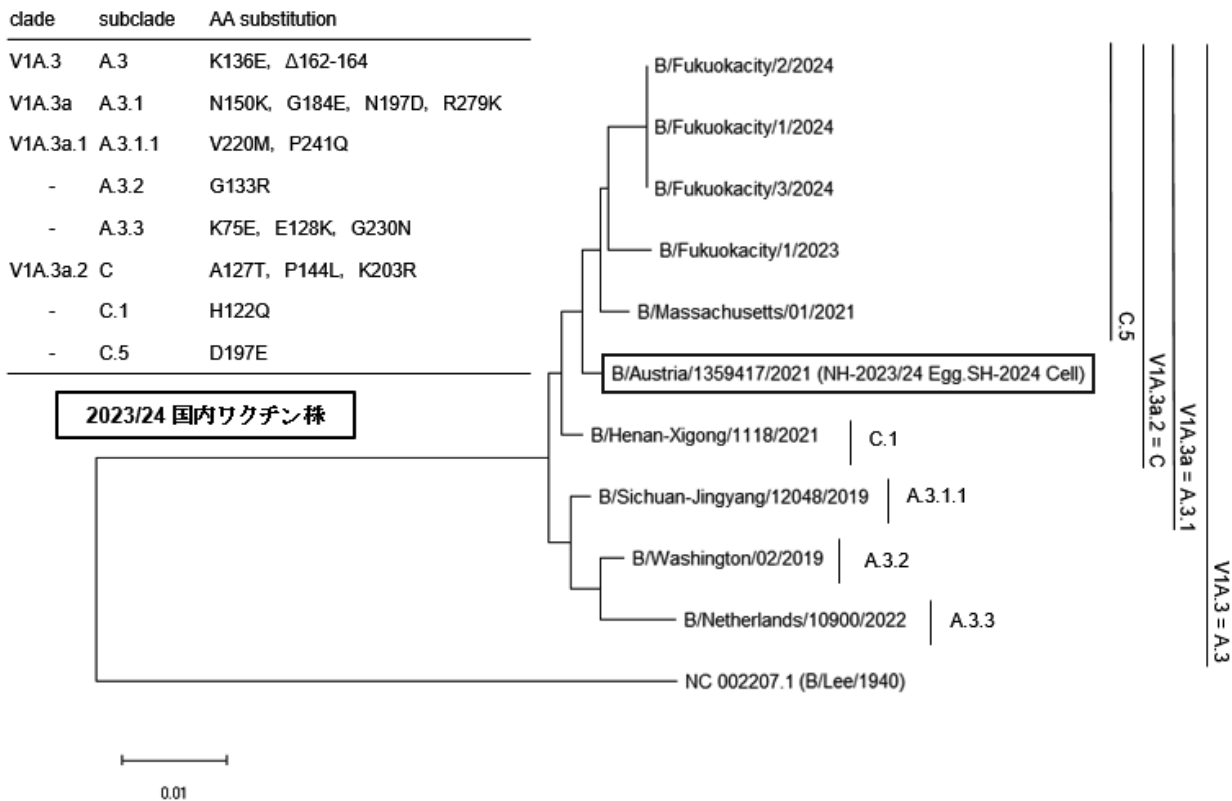


図4 B型ビクトリア系統のHA遺伝子系統樹

4 まとめ

当所では、次世代シーケンサーを活用するため、情報解析環境を構築し、インフルエンザウイルス分離株15件について、ゲノム解析を実施し、全ての分離株についてリード等を確認することができた。しかし、ゲノム解析に関して、「ホスト（MDCK細胞）ゲノム配列の除去」、「低品質な配列の除去」等さらなる情報解析精度の向上に努めていくとともに、ゲノム解析結果の新たな評価法も検討していく必要がある。今回構築した情報解析環境はインフルエンザウイルスに限らず、他のウイルス分離株についても応用していきたい。

得られたゲノム配列を利用してHA遺伝子を用いた系統樹作成を行った。本稿では当所で分離したインフルエンザウイルス及び2023/24におけるワクチン株を含む標準株のみで系統樹解析を行ったところ、A型（H3N2）ではワクチン株の系統からさらに変異を獲得した下位系統が確認された。他にも感染研により定期的に登録される国内で発生したインフルエンザウイルス及び海外において登録されるインフルエンザウイルスのHA遺伝子情報は、GISAIDを通じて収集することが可能であるため、今後は福岡市内で流行している季節性インフルエンザウイルスとの地域関連性の解析等に活かしていきたい。

い。また、得られたゲノム配列をNextcladeにアップロードすることで、参照株に対するアミノ酸変異を確認することができ、本稿ではNA阻害剤オセルタミビル及びペラミビルに対する耐性変異H275Yの有無を確認した。

今後インフルエンザウイルスのゲノムを活用した解析等を、保健所、市民、医療機関等へ情報発信することで本市の感染症サーベイランスに広く貢献していく。

文献

- 1) 国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター：インフルエンザ診断マニュアル（第5版），令和5年（2023年）8月
- 2) 国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター：インフルエンザウイルス流行株抗原性解析と遺伝子系統樹，2024年3月21日
- 3) WHO：Summary of neuraminidase (NA) amino acid substitutions assessed for their effects on inhibition by neuraminidase inhibitors (NAIs), 2023年3月7日
- 4) WHO：Summary of polymerase acidic protein (PA) amino acid substitutions assessed for their effects on PA inhibitor (PAI) baloxavir susceptibility, 2023年3月7日