

原 著

## 2009 年に発生した A/H1N1pdm09 インフルエンザウイルスにおける Hemagglutinin 遺伝子系統樹解析によるアミノ酸変異の変遷 -三重県 (2008/09~2019/20 シーズン) -

矢野 拓弥, 北浦 伸浩, 中井 康博

Changes in Amino Acid Mutations in A/H1N1pdm09 Influenza Virus in 2009 Analyzed with  
a Hemagglutinin Gene Phylogenetic Analysis - Mie Prefecture (2008/09-2019/20 seasons) -

Takuya YANO, Nobuhiro KITAURA and Yasuhiro NAKAI

三重県内において2008/09~2019/20シーズンに分離されたA/H1N1pdm09インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09ウイルス) について, Hemagglutinin (HA) 遺伝子系統樹解析を実施し, そのアミノ酸変異の変遷と流行状況との関連性を調べた.

今回, 調査期間中にHA遺伝子系統樹解析を行ったA/H1N1pdm09ウイルスの特徴を以下に示す. 2013/14シーズン以降に解析したAH1pdm09ウイルスは, Clade6B (アミノ酸置換: K163Q, A256T) に属し, その後, Subclade6B.1 (アミノ酸置換: S84N, S162N, I216T) への派生がみられた. さらに近年のA/H1N1pdm09ウイルスは, HAアミノ酸置換 (S74R, S164T, I295V) を有するSubclade6B.1Aに属した. このSubclade6B.1A内は, HAアミノ酸置換 (S183P) を含む7つの群 (183P-1~183P-7) に細分化されているが, 2018/19シーズン以降, 三重県内においては, Subclade6B.1A (183P-5A群) が確認されている.

A/H1N1pdm09ウイルスのHAアミノ酸変異と流行状況との関連性は, 2012/13~2016/17シーズンは隔年での流行が認められ, 2015/16~2016/17シーズンにSubclade 6B.1に属するアミノ酸置換 (S84N, S162N, I216T) を有するA/H1N1pdm09ウイルスが確認された. 以後は隔年流行から, 毎年, 冬季にウイルスが一定数確認されるようシフトした. その後も, 異なるHAアミノ酸置換を有する複数の群が形成され多様化の傾向がみられていることは, 今後の本ウイルスの流行規模への影響が懸念される.

キーワード: A/H1N1pdm09 インフルエンザウイルス, Hemagglutinin(HA),  
遺伝子系統樹解析, アミノ酸変異

### はじめに

20 世紀以降に発生した新型インフルエンザウイルスには, A/H1N1 インフルエンザウイルス (スペインかぜ; 1918 年), A/H2N2 インフルエンザウイルス (アジアかぜ; 1957 年), A/H3N2 インフルエンザウイルス (香港かぜ; 1968 年), A/H1N1 インフルエンザウイルス (ソ連かぜ; 1977 年) が挙げられ, 4 度のパンデミックを経験した<sup>1-3)</sup>. その後, 21 世紀には 2009 年にパンデミックを引き起こした豚由来の A/H1N1pdm2009 インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09 ウイルス) は, 記憶に新しく, 発生からはや 11 年余りを経過し

た. 現在は季節性 A 型インフルエンザウイルスとして, 1968 年に発生した A/H3N2 インフルエンザウイルスとともに小児を中心に流行を繰り返している. A/H1N1pdm2009 ウイルスは A/H1N1 インフルエンザウイルス (ソ連かぜ) や A/H2N2 インフルエンザウイルス (アジアかぜ) と同様に消滅<sup>1-3)</sup>に至るのか, あるいは軽微な抗原変異を繰り返して, 今後も季節性インフルエンザウイルスとして定着し, 継続的な流行を維持するのかは未知数である.

そこで, 我々はインフルエンザウイルス流行動態や流行規模に密接な関係があるウイルス遺伝

Table1 Number of Influenza viruses positive patients (2008/2009 ~ 2019/2020 seasons)

Influenza virus	Number of positive patients												
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Total (%)
Influenza virus (A/H1N1 subtype)	22	10	4								1	2	39(3.0)
Influenza virus (A/H1N1pdm09)	85	49	30	4	3	7	30	46	36	47	54	70	461(35.2)
Influenza virus (A/H3N2 subtype)	127	75	36	16	16	7	3	8	7	17	28	71	411(31.4)
Influenza virus B	56	70	64	32	21	6	2		2	6	3	19	281(21.5)
Influenza virus A and B	5	1	1										7(0.5)
Negative	18	9	8	1	20	12	1	8	3	9	10	10	109(8.3)
Total	313	214	143	53	60	32	36	62	48	79	96	172	1308

子の変化について、本県において分離された A/H1N1pdm09 ウイルスのヘマグルチニン (Hemagglutinin : HA) 遺伝子解析を実施し、HA のアミノ酸変異の変遷が及ぼす同ウイルスの流行状況への影響について考察したので以下に報告する。

## 対 象

### 1. 調査対象

三重県感染症発生動向調査事業において、2009年9月～2020年4月に県内の医療機関を受診し、主としてインフルエンザと診断された患者1308名から採取した呼吸器由来の臨床検体を用いてインフルエンザウイルス分離および検出を実施した。

なお、調査対象者の臨床情報および臨床検体の使用に関しては三重県感染症発生動向調査事業における病原体検査指針に従い、調査対象者または保護者による承諾書への署名を得た。検査依頼医療機関記入の調査票(患者情報)の使用にあたっては、倫理的配慮として、個人情報保護等に留意し実施した。

## 方 法

### 1. インフルエンザウイルスの分離

インフルエンザウイルス分離には MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を用いた。分離のために同細胞を24ウエルの培養用プレートを用いて CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 34℃、3～4日間単層培養した後、臨床検体 0.1 ml を接種し 60分間吸着後にトリプシン添加分離用培地を 1 ml 加えた。その後、6～7日間のウイルス培養を行い、倒立顕微鏡下において細胞変性効果の有無を観察した<sup>4)</sup>。

### 2. インフルエンザウイルスの検出および亜型同定試験

インフルエンザウイルスの亜型同定には、分離株および臨床検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Conventional RT-PCR 法および Real-Time RT-PCR 法による HA 遺伝子検査<sup>4)</sup>にてインフルエンザウイルスの亜型同定を行った。

### 3. HA 遺伝子系統樹解析

分離あるいは検出された A/H1N1pdm09 ウイルスについて、HA 遺伝子の塩基配列を決定し遺伝子系統樹解析を実施した<sup>4)</sup>。遺伝子系統樹解析には、塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5 を用いた。遺伝子系統樹作成には、近隣結合法 (Neighbor-Joining : NJ 法) により行った。Bootstrap test は 1,000 回行った。

## 結 果

### 1. インフルエンザウイルスの分離・検出数

調査期間中に採取された臨床検体を用いてインフルエンザウイルスの分離・検出を実施したところ、患者 1308 名中 1199 名が陽性となった (Table1)。インフルエンザウイルスの亜型内訳は、A/H1N1pdm09 ウイルス 461 名 (35.2%) で最も多く、次いで AH3 亜型ウイルス 411 名 (31.4%)、B 型インフルエンザウイルス 281 名 (21.5%)、A/H1N1 ウイルス (A/ソ連型) 39 名 (3%)、A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスの両方が陽性となった者が 7 名 (0.5%) の順であった。なお、陰性は 109 名 (8.3%) であった。

月別のインフルエンザウイルス陽性数は、1 月が 295 名で最も多く、次いで 2 月 205 名、12 月 162 名、3 月 135 名、11 月 86 名の順であった。

### 2. A/H1N1pdm09 ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析

各シーズンに分離された A/H1N1pdm09 ウイル

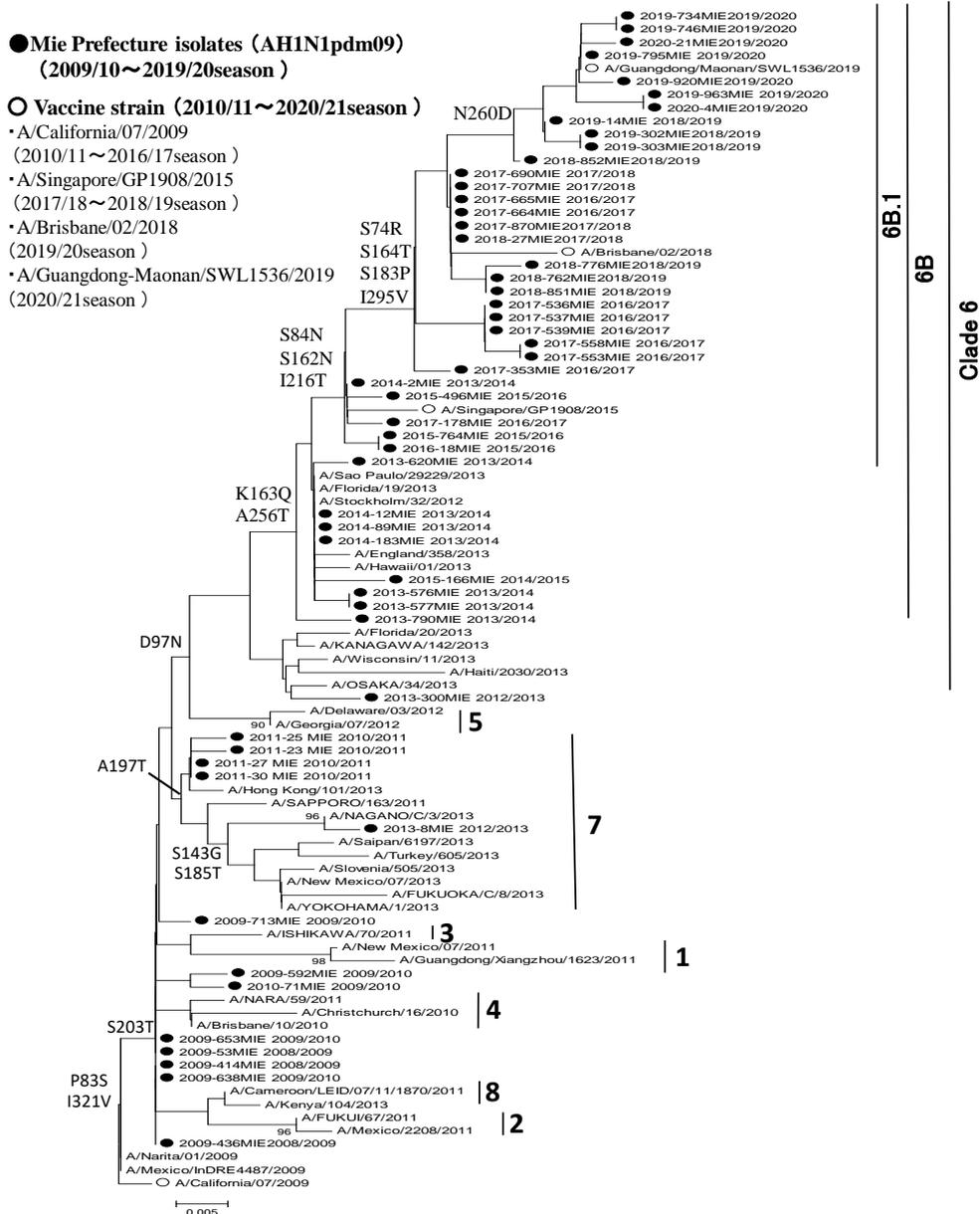


Fig1. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H1N1pdm09 viruses (2008/09~2019/20season)

スの HA 遺伝子系統樹解析を実施し、本ウイルスの特徴的なアミノ酸置換あるいは Clade 分類を以下に示した (Fig.1, 2, Table2) .

## 2.1 2008/09~2012/13 シーズン

HA 遺伝子系統樹解析により、2008/09~2009/10 シーズンに県内で分離された株は、アミノ酸置換 (P83S, I321V) を有するワクチン株である A/California/7/2009 株と近縁で、さらにアミノ酸置換 (S203T) を保有するウイルスが主流であった (Fig.1, Table2) . 本ウイルスは 2009/10 シーズン以降、HA 遺伝子系統樹上で 8 つの Clade (1~8) に区分される。2010/11 シーズンの分離

株はアミノ酸置換 (A197T) を有する Clade 7 に分類され、さらにアミノ酸置換 (S143G) を有するウイルスが主流であった (Fig.1, Table2) .

なお、2011/12 シーズンは、AH3 亜型ウイルスが流行の主流であったため、A/H1N1pdm09 ウイルスの分離はなく (Table2) , 国内においても、同様に流行はほとんどみられなかった<sup>5)</sup> .

2012/13 シーズンにおいても流行は小規模であった<sup>6)</sup> . 県内で分離された A/H1N1pdm09 ウイルスは Clade 6 および Clade 7 に属していた (Fig.1, Table2) .

● Mie Prefecture isolates (AH1N1pdm09)  
(2018/19~2019/20season)

○ Vaccine strain

• A/California/07/2009  
(2010/11~2016/17season)

• A/Singapore/GP1908/2015  
(2017/18~2018/19season)

• A/Brisbane/02/2018  
(2019/20season)

• A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019  
(2020/21season)

(S183P群)

183P-1: S183P + N451T

183P-2: S183P+L233I

183P-3: S183P+T120A

183P-4: S183P+N129D+A141E

183P-5: S183P+N260D

• 183P-5A: 183P-5+N129D+T185I

• 183P-5B: 183P-5+K130N+K160M

+T216K+E235D+H296N+V520A

183P-6: S183P+T120A

183P-7: S183P+K302T+I404M

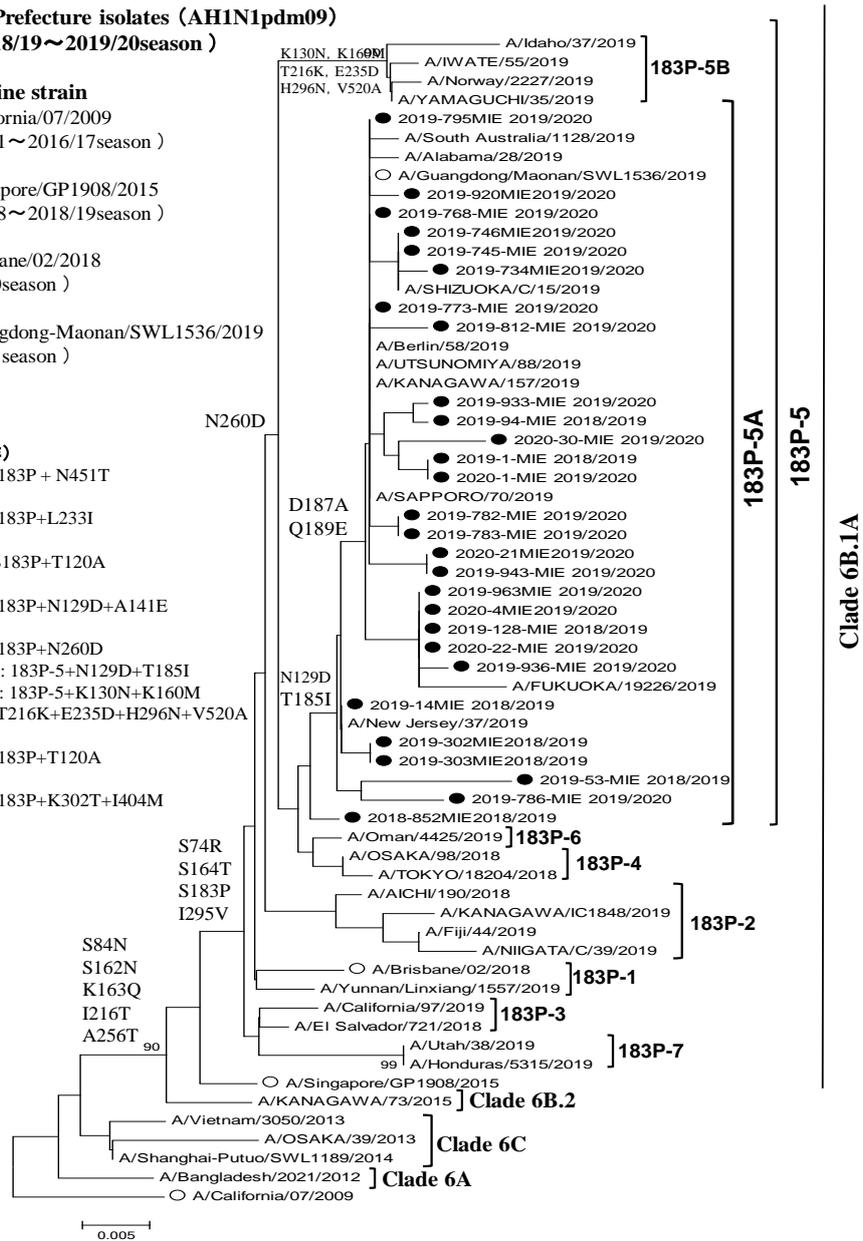


Fig2. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H1N1pdm09 viruses (Clade 6)

## 2.2 2013/14~2017/18シーズン

HA遺伝子系統樹上でClade6はさらにSubclade 6A, 6B, 6Cに細分化されるが、2013/14~2014/15シーズンの本県での分離株はSubclade6B (アミノ酸置換: K163Q, A256T) に属していた (Fig.1, Table2) .

2015/16 ~ 2016/17シーズンに解析したA/H1N1pdm09ウイルス株はすべてSubclade6B (アミノ酸置換: K163Q, A256T) に属し、このSubclade6B内には、さらに6B.1 (S84N, S162N, I216T) と6B.2 (V152T, V173I, E491G, D501E) が形成され、県内の解析株はSubclade 6B.1に分類された (Fig.1, Table2) .

## 2.3 2018/19~2019/20シーズン

2018/19~2019/20シーズンのA/H1N1pdm09ウイルス株はSubclade 6B.1 (S84N, S162N, I216T) 群内の6B.1A (S74R, S164T, I295V) 群に属していた (Fig.2, Table2) . 近年、6B.1A内にS183Pをもつ7つの群、183P-1 (N451T/R45G, P282A, I298V) , 183P-2 (L233I) , 183P-3 (T120A) , 183P-4 (N129D, A141E) , 183P-5 (N260D) , 183P-6 (T120A) , 183P-7 (K302T, I404M) 群が存在する (Fig.2, Table2) .

2018/19~2019/20シーズンはアミノ酸置換 (N260D) を有する183P-5群のウイルスが主流であった (Table2) . この183P-5内には、さらに183P-

Table2 A/H1N1pdm09 viruses isolated in Mie prefecture (2008/09~2019/20 season)

Season	HA Amino acid substitution	Clade	Vaccine strain
2008/09	S203T	—	A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)
2009/10	S203T	—	A/Brisbane/59/2007 (A/H1N1)
2010/11	S203T, A197T, S143G	Clade7	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2011/12	Virus not isolated	Virus not isolated	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2012/13	A197T, S143G	Clade6, Clade7	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2013/14	K163T, A256T	Clade6B	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2014/15	K163T, A256T	Clade6B	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2015/16	K163T, A256T, S84N, S162N, I216T	Clade6B.1	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2016/17	K163T, A256T, S84N, S162N, I216T	Clade6B.1	A/California/07/2009 (A/H1N1pdm09)
2017/18	K163T, A256T, S84N, S162N, I216T, S74R, S164T, I295V	Clade6B.1	A/Singapore/GP1908/2015 (A/H1N1pdm09)
2018/19	K163T, A256T, S84N, S162N, I216T, S74R, S164T, I295V, S183P, N260D	Clade6B.1A	A/Singapore/GP1908/2015 (A/H1N1pdm09)
2019/20	K163T, A256T, S84N, S162N, I216T, S74R, S164T, I295V, N129D, T185I, S183P, N260D, D187A, Q189E	Clade6B.1A (S183P-5A)	A/Brisbane/02/2018 (A/H1N1pdm09)

5A (N129D, T185I, N260D), 183P-5B(K130N, K160M, T216K, E235D, H296N, V520A)が集団を形成するが、解析した2018/19~2019/20シーズンのウイルス株は183P-5A内のアミノ酸置換(D187A, Q189E)を有する集団に分類された(Fig.2, Table2)。

### 3. A/H1N1pdm09ウイルスの流行状況とHAアミノ酸変異との相関

各シーズン別の県内におけるA/H1N1pdm09ウイルスの分離状況の推移をFig3に示した。

A/H1N1pdm09ウイルスが発生した2008/09シーズンから2009/10シーズンの本県でのウイルス分離数は最多であったが、翌2010/11シーズンの分離数は減少に転じた。本県では2011/12シーズンは分離されておらず、翌2012/13シーズンにおいても、僅かな分離数に留まり、この2シーズンの流行はほとんど見られなかった。一方で2013/14シーズンの分離数は増加したが、翌2014/15シーズンには、分離数は減少した。2015/16シーズンは再び分離数は増加したが、翌シーズンは分離数が

減少に転じ、2012/13~2016/17シーズンは隔年での流行が認められた。しかし、2016/17シーズンには夏季にA/H1N1pdm09ウイルスが分離され、その後のシーズンは、一定数の同ウイルスが毎年のように分離されている。各シーズンのA/H1N1pdm09ウイルスの分離状況とHAアミノ酸変異との関連性は、2015/16~2016/17シーズンにSubclade 6B.1に属するアミノ酸置換(S84N, S162N, I216T)を有するウイルスが確認されはじめた頃より、隔年流行から、毎年冬季に同ウイルスが一定の規模で継続的に確認されている。

### 考 察

季節性インフルエンザウイルスは急性呼吸器感染症のため老若男女幅広い年齢層で罹患する。他のウイルス感染症と比較しても毎年流行を引き起こし、その流行規模は大きい。特に若年層と比較し、高齢者では罹患時の重症化リスクが高く、肺炎などの合併症により重篤な経過をとり、死因となりうるということが報告されている<sup>7-11)</sup>。我々は、検体の収集が課題であるなかで、本ウイルスの遺

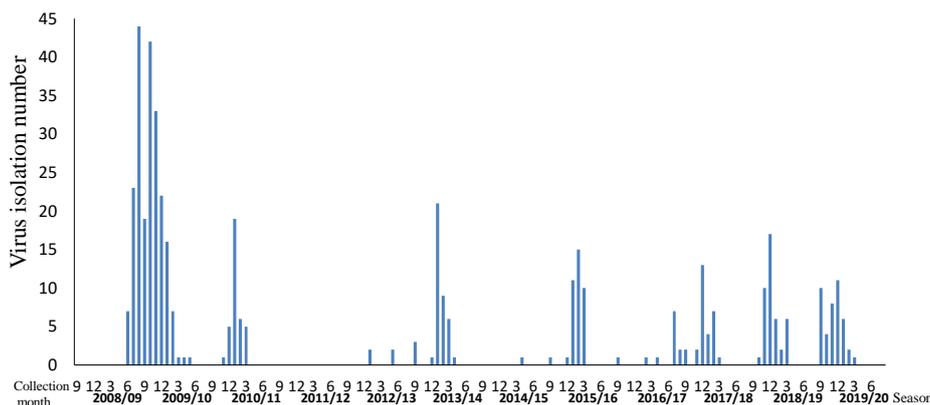


Fig3. Number of A/H1N1pdm09 virus isolates by influenza virus season

伝子解析結果や夏季などの非流行期に積極的な調査を実施し、本県のインフルエンザ感染症対策のため、迅速な情報発信に努めてきた<sup>12-18)</sup>。平成28年度の感染症法の改正より、季節性インフルエンザサーベイランス体制の確立のため、検体収集の充実を図ることが規定<sup>19)</sup>されたことは、行政的な観点における感染予防対策においても公衆衛生の向上に有益である。

本調査では2009年にパンデミックを引き起こしたA/H1N1pdm09ウイルスについて、2008/09～2019/20シーズンに本県で分離されたHA遺伝子系統樹解析を実施し、その特徴的なHAアミノ酸置換によりClade分類を実施した。これらのアミノ酸の変遷がインフルエンザ流行状況に与える影響について、以下の知見を得た。

各シーズンに患者から分離され、A/H1N1pdm09ウイルスのHA遺伝子系統樹解析により2008/09～2009/10シーズンに県内で分離された同ウイルスは、アミノ酸置換(P83S, S203T, I321)を有していた。以降、このアミノ酸変異を起点に、さらに異なるアミノ酸置換により派生した本ウイルスによる流行が2019/20シーズンまで確認されている。A/H1N1pdm09ウイルスは2009/10シーズン以降、HA遺伝子系統樹上で8つのCladeに区分されたが、2010/11シーズンにはアミノ酸置換(S143G, A197T)を有するClade7が主流であった。翌2011/12シーズンは流行が認められず、2012/13シーズンにおいても流行は小規模であったが2つのClade(Clade6およびClade7)が確認された。A/H1N1pdm09ウイルスは2013/14シーズン以降を境にClade6が主流となり、2013/14シーズンが分岐点となったことを伺うことができる。その後はClade6B(アミノ酸置換:K163Q, A256T), Subclade6B.1(アミノ酸置換:S84N, S162N, I216T), Subclade6B.1A

(S74R, S164T, I295V)への派生がみられた。近年ではSubclade6B.1A内は、HAアミノ酸置換(S183P)を含む7つの群(183P-1～183P-7)に細分化され、2018/19シーズン以降、Subclade6B.1A(183P-5A群)が三重県内で主流行していた。A/H1N1pdm09ウイルスはワクチン株と国内での流行株は概ね一致している傾向がみられているが、本ウイルスのSubclade6B.1A(183P-5A群)内で抗原性の変異に関わるアミノ酸置換(N156K, K130N, L161I, V250A, E506D)を有するウイルスが報告<sup>20)</sup>されており、今後の積極的な動向把握が必要であると考えられる。

A/H1N1pdm09ウイルスのHAアミノ酸変異と流行状況との関連性に関心がもたれるが、本ウイルスは2012/13～2016/17シーズンは隔年での流行であった。しかし2015/16～2016/17シーズンにSubclade6B.1が確認された頃より、隔年流行から流行の間隔が短縮され、毎年、冬季にA/H1N1pdm09ウイルスが一定数確認されるようシフトした。その後においても、異なるHAアミノ酸置換を有する複数の群が形成され多様化の傾向がみられたことは、今後の流行規模の分岐となり得る可能性があり、本ウイルスの動向に関心がもたれる。

### 謝 辞

本調査研究を行うにあたり、三重県感染症発生動向調査事業で検体採取を担当された医療機関の諸先生方および保健所等、関係各位にお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 清水一史：インフルエンザ流行史とインフルエンザウイルス発見史，日本臨床，**55**，2505-2511(1997)。

- 2) 西村秀一：新型インフルエンザ・パンデミックインフルエンザの歴史と2009年のパンデミック，*仙台医療センター医学雑誌*，**1**，9-16 (2011).
- 3) 紺野昌俊：インフルエンザの歴史と疫学，*小児内科*，**45**，1920-1926 (2013).
- 4) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第3版）平成26年9月．(2020.0810 access)
- 5) 国立感染症研究所：2011/12シーズンのインフルエンザ分離株の解析，*病原微生物検出情報*，**33**，288-294 (2012).
- 6) 国立感染症研究所：2012/13シーズンのインフルエンザ分離株の解析，*病原微生物検出情報*，**34**，328-334 (2013).
- 7) Goodman RA, Orenstein WA, Munro TF, Sikes KS: Impact of influenza A in a nursing home. *JAMA*; **247**，1451-1453 (1982).
- 8) 加地正郎：高齢者におけるかぜ症候群，*臨床とウイルス* **15**，296-299 (1987).
- 9) Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J et al. : An outbreak of influenza A (H3N2) in a hospital for the elderly with emphasis on pulmonary complications, *Jpn J Med* **27**，177-182 (1988).
- 10) 山腰雅宏，山本俊信，鈴木幹三，他：急性筋炎を認めた高齢者インフルエンザ(A型)の4例，*感染症誌* **69**，752-756 (1995).
- 11) 鍋島篤子，池松秀之，山家 滋，他：高齢者におけるインフルエンザについての研究：1992年度院内流行の解析，*感染症誌* **69**，801-806 (1996).
- 12) 矢野拓弥，前田千恵，赤地重宏 他：2013年9月に分離されたA(H1N1)pdm09ウイルスの性状-三重県，*病原微生物検出情報*，**34**，343-345 (2013).
- 13) 矢野拓弥：オセルタミビル投与の小児患者から検出された耐性A (H1N1) pdm09ウイルスの検討，*小児感染免疫* **25**(3)，289-296 (2013).
- 14) 矢野拓弥，高下恵美，江島美穂 他：家族内感染が疑われたオセルタミビル投与前の小児患者から検出された抗インフルエンザ薬耐性A (H1N1) pdm09ウイルス，*三重保環研年報* 第16号（通巻第59号），35-41 (2014).
- 15) 矢野拓弥，原 有紀，植嶋一宗 他：インフルエンザ非流行期に高齢者福祉施設内における集団感染事例から検出されたAH3亜型インフルエンザウイルスのウイルス学的解析-三重県 (2014年)，*三重保環研年報* 第17号（通巻第60号），34-40 (2015).
- 16) 矢野拓弥，前田千恵，赤地重宏 他：2015年9月上旬に上海への渡航歴のある患者から分離されたA (H1N1) pdm09ウイルスの遺伝子解析-三重県，*病原微生物検出情報*，**36**，223-224 (2015).
- 17) 矢野拓弥，前田千恵，楠原 一 他：2016年9月上旬にシンガポールへの渡航歴のある患者から分離されたA/H3亜型インフルエンザウイルス-三重県，*病原微生物検出情報*，**37**，233-234 (2016).
- 18) 矢野拓弥，赤地重宏，松村義晴 他：2019/20シーズン初め (2019年9月上旬) に分離されたA (H1N1) pdm09ウイルス、AH3亜型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルス (ビクトリア系統) の性状-三重県，*病原微生物検出情報*，**40**，216-220 (2019).
- 19) 厚生労働省：感染症発生動向調査事業実施要項の一部改正について(健発0212第4号平成28年2月12日)．(2020.0810 access)
- 20) 国立感染症研究所：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 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-antigen-phylogeny.html> (2020.0810 access)

## **Changes in Amino Acid Mutations in A/H1N1pdm09 Influenza Virus in 2009 Analyzed with a Hemagglutinin Gene Phylogenetic Analysis - Mie Prefecture (2008/09-2019/20 seasons) -**

Takuya YANO, Nobuhiro KITAURA and Yasuhiro NAKAI

**Keywords:** A/H1N1pdm09 influenza virus, Gene phylogenetic analysis, Hemagglutinin(HA), Amino acid mutation

We performed Hemagglutinin (HA) gene phylogenetic analyses on the A/H1N1pdm09 influenza virus isolated in the 2008/09-2019/20 seasons in Mie Prefecture, and examined the associations between the changes to the amino acid mutations and situations of influenza epidemics.

The characteristics of the A/H1N1pdm09 virus analyzed with the HA gene phylogenetic analyses during the survey period are shown below. In particular, the A/H1N1pdm09 virus analyzed after the 2013/14 season belonged to Clade 6B (amino acid substitutions: K163Q, A256T) and subsequently derived into Subclade 6B.1 (amino acid substitutions: S84N, S162N, I216T). Furthermore, the recent A/H1N1pdm09 virus belonged to Subclade 6B.1A with HA amino acid substitutions (S74R, S164T, I295V).

This Subclade 6B.1A is subdivided into seven groups (183P-1 to 183P-7) that contain HA amino acid substitutions (S183P); since the 2018/19 season, Subclade 6B.1A (group 183P-5A) has been confirmed. Regarding the association between the HA amino acid mutations of A/H1N1pdm09 viruses and the epidemic situations, although biennial epidemics were observed during the 2012/13 to 2016/17 seasons, from the time when the A/H1N1pdm09 virus with amino acid substitutions (S84N, S162N, I216T) belonging to Subclade 6B.1 began to be detected during the 2015/16-2016/17 season, the situation shifted, and a certain number of viruses have now been constantly detected every winter rather than biennially. Even after that, multiple groups with different HA amino acid substitutions were formed, and the tendencies of their diversification were observed, which is a concern for the future scale of epidemics of these viruses.