

## A/H3N2 インフルエンザウイルスにおける Hemagglutinin 遺伝子解析による Subclade 分類について (2014/15~2022/23 シーズン) -三重県

矢野拓弥, 川合秀弘, 下尾貴宏

Subclade classification of influenza virus A/H3N2 based on Hemagglutinin gene analysis  
Mie Prefecture (2014/15-2022/23 seasons)

Takuya YANO, Hidehiro KAWAI and Takahiro SHIMOO

三重県内において2014/15~2022/23シーズンに分離・検出されたA/H3N2インフルエンザウイルス (A/H3N2ウイルス) について, Hemagglutinin (HA) 遺伝子系統樹解析によるSubclade 分類を実施した. 今回の調査で, A/H3N2ウイルスは遺伝子的に多様化が進み, 3~4シーズン内で複数の異なるSubcladeによる集団を形成し, その中から派生したウイルスが, 次の流行へとシフトする傾向がみられた. インフルエンザウイルスのワクチン株との抗原性状の差違, あるいは新たなSubcladeに属する流行ウイルスの出現傾向を捉えることは, 感染拡大防止の予防啓発等のインフルエンザ予防対策に活用が可能である. このことは高齢者等への重症化予防策の1つであるワクチン接種の方向性を明示でき, 県内の医療体制の連携強化および先進的な感染予防対策の推進に繋がることを期待される.

キーワード: A/H3N2 インフルエンザウイルス, Hemagglutinin(HA), Subclade 分類, 遺伝子系統樹解析, アミノ酸変異

### はじめに

季節性インフルエンザウイルスは, ウイルス粒子の抗原性状が頻繁に変異する特性を有しており, 流行を繰り返している. この抗原性状の変化は, 流行動態および流行規模に密接な関係がある. 2020年1月以降のCOVID-19パンデミックにより国内外で移動制限等の防疫措置と組織や個人において感染抑制対策が講じられた. この防疫措置の期間中, 国内における季節性インフルエンザウイルスの流行は, 2シーズンにおいて明らかなインフルエンザの流行を示唆する傾向は認められなかった<sup>1,2)</sup>. その後, 防疫措置等が緩和され2022/23シーズンは, 3シーズンぶりにA/H3N2インフルエンザウイルス (A/H3N2ウイルス) の検出報告がされ, インフルエンザの流行が全国各地で認められた<sup>3,4)</sup>. そこで, 我々は, 新型コロナウイルス流

行前と流行後に三重県で分離・検出されたA/H3N2ウイルスについて, ヘマグルチニン (Hemagglutinin : HA) 遺伝子の Subclade 分類 (2014/15~2022/23 シーズン) を明らかにし, 流行ウイルスとインフルエンザワクチン株との相関性を探り, 公衆衛生の向上に繋がる知見を得ることを目的とした.

### 対 象

#### 調査対象

三重県感染症発生動向調査事業において, 2014年第36週~2023年第35週 (2014/15~2022/23シーズン) の間に県内の医療機関を受診し, インフルエンザと診断された患者から採取した呼吸器由来の臨床検体を用いた. このうち分離あるいは遺伝子検査で検出されたA/H3N2ウイルスをHA遺伝子解析の対象とした.

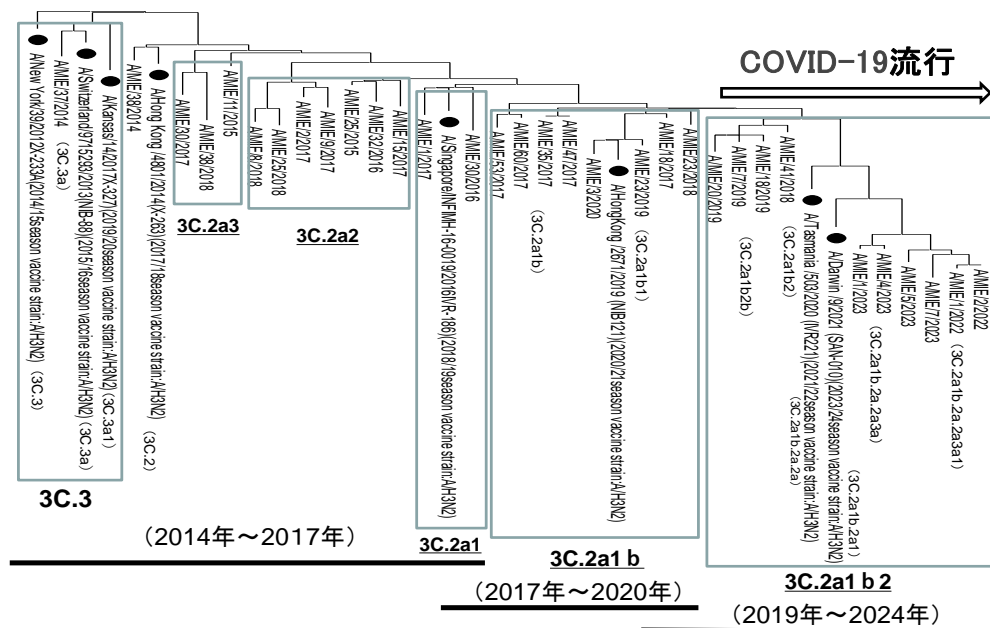


図1 A/H3N2インフルエンザウイルスのHA遺伝子系統樹解析(2014/15～2023/24シーズン)

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 ウェルの培養用プレートをを用いて CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 34 °C, 3～4 日間単層培養した。その後、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、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>5)</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>5)</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/H3N2 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>5)</sup>。

HA 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 11 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. A/H3N2 インフルエンザウイルスの HA 遺伝子系統樹解析

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、患者検体より確認された A/H3N2 ウイルス 288 件の遺伝子系統樹解析を行った。

各シーズンに分離・検出された A/H3N2 ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析結果により、Subclade 分類を実施し、図 1 に代表的な Subclade と表 1 に主な流行ウイルスを示した。

### 2. シーズン別の Subclade 分類

#### 2.1 2014/15 シーズン～2017/18 シーズン

2014/15 シーズンは、Subclade 3C.2a と 3C.3a に属するウイルスが確認された。2015/16 シー

表1 ワクチン株と主な流行ウイルスのSubclade

流行シーズン	A/H3N2インフルエンザウイルス		主な流行ウイルス (Subclade)
	ワクチン株名	Subclade	
2014/2015シーズン	A/New York/39/2012	3C.3a	3C.2a, 3C.3a
2015/2016シーズン	A/Switzerland/9715293/2013	3C.3a	3C.2a
2016/2017シーズン	A/Hong Kong/4801/2014	3C.2	3C.2a, 3C.2a1
2017/2018シーズン	A/Hong Kong/4801/2014	3C.2	3C.2a1a, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a3
2018/2019シーズン	A/Singapore/INF1M1H-16-0019/2016	3C.2a1	3C.2a1b, 3C.2a2
2019/2020シーズン	A/Kansas/14/2017	3C.3a1	3C.2a1b
2020/2021シーズン	A/HongKong/2871/2019	3C.2a1b.1b	流行なし
2021/2022シーズン	A/Tasmania/503/2020	3C.2a1b.2a.1	流行なし
2022/2023シーズン	A/Darwin/9/2021	3C.2a1b.2a.2a	3C.2a1b.2a.2b, 3C.2a1b.2a.2a.1b, 3C.2a1b.2a.2a.3a, 3C.2a1b.2a.2a.3a.1

ズンは前シーズンの流行ウイルスと類似の Subclade3C.2a に属するウイルスが主流であった。

2016/17 シーズンは、Subclade3C.2a および 3C.2a1 が主流であったが、2017/18 シーズンの流行ウイルスは、Subclade3C.2a1a, 3C.2a1b, 3C.2a2 および 3C.2a3 の混在が確認された。

## 2.2 2018/19 シーズン～2022/23 シーズン

2018/19 シーズンは、Subclade3C.2a1b が主流であったが、同時に少数であるが Subclade 3C.2a2 が確認された。

2019/20 シーズンは、2020 年 1 月に分離された A/H3N2 ウイルスは Subclade3C.2a1b に分類されたが、その後は、COVID-19 の流行開始による防疫措置等の影響で、翌シーズンの 2020/21 シーズンと 2021/22 シーズンは、国内流行が確認されず、本県においても、同ウイルスは検出されていない。

2022/23 シーズンの Subclade 分類を表 2 に示した。Subclade3C.2a1b.2a.2b, 3C.2a1b.2a.2a.1b, 3C.2a1b.2a.2a.3a, 3C.2a1b.2a.2a.3a.1 の 4 種の A/H3N2 ウイルスが確認された。シーズンの前半は Subclade3C.2ab.2a.2a.3a.1 と 3C.2ab.2a.2a.3a が主に検出されたが、春先以降から夏季には、Subclade3C.2a1b.2a.2b と 3C.2a1b.2a.2a.1b が検出された。その後、2023 年 8 月にはシーズンの流行の前半に検出された Subclade3C.2ab.2a.2a.3a.1 が再び確認された。しかし、2023 年 8 月に検出された A/H3N2 ウイルスはシーズン前半に検出されたウイルスと比較し、異なる HA アミノ酸変異 (I25V、V347M、I418L) を有していた。

## 3. ワクチン株と流行ウイルスのSubclade

シーズン別のワクチン株と主な流行ウイルスの Subcladeを表1に示した。

2014/15 シーズンは、Subclade3C.2aと3C.3aが流行したことから、3C.2aはワクチン株とは異なり、2015/16シーズンもワクチン株 (3C.3a) と相違していた。2016/17シーズン、2017/18シーズンは同じワクチン株 (3C.2) が使用されているが、流行株はSubclade 3C.2aの複数の派生株が流行に関与していた。2019/20シーズンのワクチン株はSubclade3C.3a1であるが、流行株の 3C.2a1bとは一致していない。その後、COVID-19の流行による防疫措置等の余波で2シーズン (2020/21シーズン、2021/22シーズン) の流行がなく、Subclade分類に至らなかった。しかし、2022/23シーズンにおけるA/H3N2ウイルスの流行株は、複数のSubcladeに属するウイルスが確認され、ワクチン株のSubclade3C.2a1b.2a.2aと異なり、表2に示した3C.2a1b.2a.2bが多数確認された。

## 考 察

本調査では 2014/15～2022/23 シーズンに本県において分離・検出された A/H3N2 ウイルスについて、インフルエンザウイルスの流行動態や流行規模に密接な関係がある HA 遺伝子の変遷を探った。今回の調査前の 2012/13 シーズンには Subclade3C が流行<sup>6)</sup>していた。その後、2014/15 シーズンには Subclade3C.2a と 3C.3a に属するウイルスが確認され、以後は Subclade3C の派生ウイルスが関与した流行が継続的にみられている。2015/16 シーズンと 2016/17 シーズンは Subclade3C.2a に属するウイルスが主流であったが、この 2016/17 シーズンは、さらに派生した Subclade 3C.2a1 への流行へシフトした。特に 2017/18 シーズンは Subclade3C.2a1a, 3C.2a1b,

表2 A/H3N2インフルエンザウイルスの採取月別クレード分類

採取月	Subclade 3C.2a1b.				計
	2a.2a.3a.1	2a.2a.3a	2a.2b	2a.2a.1b	
2022年11月	1				1
12月	3	2			5
2023年1月		5			5
2月	1	1	2		4
3月			4		4
4月			3	5	8
5月			3		3
6月			4	2	6
7月			4	3	7
8月	4				4
計	9	8	20	10	47

\*2023年8月：HAアミノ酸変異 (I25V、V347M、I418L)

3C.2a2 および 3C.2a3 が混在し、遺伝子学的に複数の Subclade が流行に関与し、以後は Subclade 3C.2a1b の流行にシフトしたが、2020年1月以降の新型コロナウイルスの流行禍による防疫措置等の影響でインフルエンザウイルスの流行が抑制され、インフルエンザ流行史に残る非常に特異な事象であった。しかし 2022/23 シーズンは、3 シーズンぶりに国内流行が確認され A/H3N2 ウイルスによる小規模ながらインフルエンザ流行が各地で認められた<sup>1,4,7)</sup>。今回は特殊な事情により流行抑制となった背景から、再流行となった A/H3N2 ウイルスの動向とその Subclade は非常に関心がもたれた。2022/23 シーズンの Subclade は Subclade 3C.2a1b.2a.2b, 3C.2a1b.2a.2a.1b, 3C.2a1b.2a.2a.3a および 3C.2a1b.2a.2a.3a.1 の 4 種に属するウイルスが確認され、その検出時期により、異なる Subclade による流行で、遺伝子的に多様化の傾向がみられた。また、シーズンの前半に検出されていた Subclade 3C.2a1b.2a.2a.3a.1 が再びシーズン後半に、アミノ酸配列は異なっていたが同じ Subclade のウイルスが検出される等の興味深い特徴がみられた。今回の調査より、近年の A/H3N2 ウイルスは遺伝子的に多様化が進み、3~4 シーズン内で複数の異なる Subclade による集団を形成し、その中から派生したウイルスが関与した流行へとシフトする傾向がみられた。また 2023/24 シーズンの最新の流行株は、ワクチン株と比較し抗原領域のアミノ酸に変異がみられていたことから、今後の流行ウイルスの動向とワクチン株との相同性に関心がもたれる。

今後はインフルエンザウイルスと新型コロナウイルスの同時流行が懸念されるなかで、インフルエンザウイルスのワクチン株と流行ウイルスの抗原性状の差違、あるいは新たな Subclade に分類されるウイルスの動向を捉えることは、感染拡大防止の予防啓発等のインフルエンザ予防対策に活用する上で有用である。このことは高齢者等への重症化予防策の 1 つであるワクチン接種

の方向性を明示でき、県内の医療体制の連携強化と先進的な感染予防対策の推進に繋がることが期待される。

### 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) 国立感染症研究所：インフルエンザ 2020/21 シーズン。病原微生物検出情報，**42**，239-241 (2021)。
- 2) 国立感染症研究所：インフルエンザ 2021/22 シーズン。病原微生物検出情報，**43**，243-245 (2022)。
- 3) 国立感染症研究所：インフルエンザ 2022/23 シーズン。病原微生物検出情報，**44**，165-167 (2023)。
- 4) 湊山亜未，田村恒介，新保孝治他：COVID-19 パンデミック発生後の季節性インフルエンザ発生動向の特徴-富山県。病原微生物検出情報，**44**，64-66 (2023)。
- 5) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル (第 5 版) 令和 5 年 8 月。  
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20230829.pdf>(2024.11.4 access)
- 6) 矢野拓弥，赤地重宏：過去 5 シーズンにおけるインフルエンザ非流行期と流行期に分離された AH3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子学的相関性 -三重県 (2012/13~2016/17 シーズン)，三重保環研年報 第**19**号 (通巻第 62 号)，27-33 (2017)。
- 7) 矢野拓弥，川合秀弘，下尾貴宏：3 シーズンぶりに流行した季節性インフルエンザウイルスの遺伝子系統樹解析および薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出状況 (2022/23 シーズン) -三重県，三重保環研年報 第**25**号 (通巻第 68 号)，34-40 (2023)。