

**厚生労働行政推進調査事業費補助金
(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
総括研究報告書**

【研究名】2023/2024 年シーズンにおける COVID-19 ワクチン被接種者を対象とした免疫調査研究
(23HA2021)

【研究者名】

研究代表者	高橋 宜聖	国立感染症研究所
研究分担者	森山 彩野	国立感染症研究所
研究分担者	上滝 隆太郎	国立感染症研究所
研究分担者	五十川 正記	国立感染症研究所
研究分担者	寺原 和孝	国立感染症研究所

【研究要旨】

COVID-19 ワクチンは、本邦にて 2022 年 2 月から接種が開始された従来株一価ワクチンによる初回接種シリーズに始まり、追加接種が進められてきた。中和抗体を始めとする免疫の減衰及び抗体逃避変異を獲得した新たなオミクロン変異株の出現に対応すべく、2022/2023 年秋冬シーズンからはオミクロン対応二価ワクチン (BA.1 もしくは BA.4/5) が導入され、2023/2024 年秋冬シーズンからは XBB.1.5 一価ワクチンによる接種が進められてきた。このような抗原性の異なる多様なワクチン接種歴に加え、変異株によるブレークスルー感染により、新型コロナウイルスに対する免疫履歴が多様化している。2023/2024 年秋冬シーズンから、XBB.1.5 とは系統の異なる JN.1 変異株による感染者数が増加し、2023 年度末時点で世界多くの国・地域で XBB 系統変異株から JN.1 系統変異株への置き換わりが起きている状況にある。加えて、XBB/JN.1 系統とさらに系統が異なり、スパイクタンパク質に多くの変異を蓄積した BA.2.87.1 等の変異株も検出されている。本邦における免疫履歴の多様化と、XBB.1.5 ワクチン株とは系統の異なる新たな変異株の発生を受け、本研究では XBB.1.5 一価ワクチン被接種歴及びブレークスルー感染歴の有無により層別化したワクチン被接種者を対象として、多様なオミクロン変異株に対する免疫調査を実施した。さらに、JN.1 や BA.2.87.1 の抗原性が現行 XBB.1.15 ワクチン株と比べてどの程度変化しているのか、ヒト抗血清を用いたウイルス中和試験により評価を実施した。その結果、XBB.1.5 一価ワクチン接種により誘導された中和抗体から、JN.1 株はおよそ 2~6 倍程度の逃避能を有することが確認された一方、BA.2.87.1 株から検出可能な逃避能は確認できなかった。加えて、ワクチン被接種者における記憶 B 細胞の中には、JN.1 曝露歴がないにも関わらず JN.1 を交差中和できる抗体が保存されていた。この JN.1 交差中和抗体の中には、XBB.1.5 を含むこれまでに発生したオミクロン株を幅広く交差中和する抗体が存在するため、今後のワクチン株選定等のワクチン戦略を策定する上で、交差中和抗体の分子学的・構造学的特性を詳細に解析することが重要であると考えられた。さらに、これまで既存変異株に対する中和抗体価の測定に依存した免疫調査法の精度を改良すべく、抗体のウイルス変異への耐性評価を可能とする抗体耐性評価系を構築するとともに、特に重症化予防効果への寄与が想定されている記憶 B 細胞・記憶 T 細胞の評価系を構築し、今後の免疫調査への活用を可能にした。

A. 研究目的

免疫履歴の多様化と、既存ワクチン株と系統の異なる新たな変異株の発生を受け、本研究では、ワクチン接種歴及びブレークスルー感染歴により層別化したワクチン被接種者の抗血清を用い 2023/2024 年シーズンに検出された系統の異なる変異株に対する中和抗体価に基づいた免疫調査を実

施した。今後の免疫調査の精度を改良すべく、新たな変異株に対する抗体耐性評価系の構築を行うとともに、とくに重症化予防効果への寄与が想定されている記憶 B 細胞及び記憶 T 細胞の定量化と機能評価を可能とする新たなシステム構築を目指し研究を実施した。

B. 研究方法

研究デザイン

2023/2024 年秋冬シーズン前に、従来株一価ワクチン 3 回接種後、4 回目にオミクロン対応二価ワクチン（BA.4/5）接種を完了し、2023/2024 年シーズンで XBB.1.5 一価ワクチンの 5 回目接種を受けた医療従事者 100 名以上から末梢血の提供を受けた。経時的な N 抗体価のモニタリングデータとともに、ブレークスルー感染が生じた時期と株を推定した。

ウイルス中和抗体価の測定

新規変異株の中和抗体逃避能を確認するために、研究期間内に新規に発生し日本でも感染者が報告された新規変異株のショードタイプウイルスを用いた中和抗体価測定系を構築した。新規変異株のアミノ酸配列情報をもとに膜貫通型スパイク糖タンパク質質の発現ベクターを作製し、この発現ベクターと水疱性口内炎ウイルスを用いて新規変異株のスパイク糖タンパク質質をウイルス表面に持つショードタイプウイルスを作製し、ルシフェラーゼ活性を指標にウイルス感染性を測定した。

一変異 receptor binding domain (RBD) ライブラリを用いた抗体耐性評価系

今後発生する可能性のある新規変異による抗体免疫逃避リスクの事前評価に用いるデータを収集するため、1 アミノ酸変異 RBD ライブラリを用いた新規変異への抗体耐性評価系を構築した。抗体の結合性が低下する変異は抗体免疫逃避リスクの高い変異であると考えられる。従来株 RBD タンパク質質の発現ベクターに 1 アミノ酸置換変異を導入して 220 種類の 1 アミノ酸変異 RBD 発現ベクターを作製した。293Expi 細胞を用いて発現精製して 132 種類の 1 アミノ酸変異 RBD タンパク質質が得られた。これらの 1 アミノ酸変異 RBD タンパク質質を異なる輝度の蛍光シグナルを発する Luminex ビーズ 50 種類程度と結合して、1 アミノ酸変異 RBD ライブラリを合計 3 セット作製した。1 検体あたり 3 回の測定で 132 種類の 1 アミノ酸変異 RBD に対する結合性データを取得することができる。

記憶 B 細胞が発現する抗体の変異株交差中和活性測定

RBD を蛍光標識した抗原プローブを用いたフローサイトメトリおよびシングル B 細胞培養系を用い、記憶 B 細胞が発現する抗体をモノクローナル化した。得られたモノクローナル抗体パネルを用い、様々な変異株に対する中和活性を測定した。

スパイクタンパク質特異的な T 細胞の定量化及び機能評価系の構築

ペプチド化したスパイクタンパク質を抗原刺激用に用意し、試験管内で末梢血単核球とともに共培養した後、活性化マーカーを発現した T 細胞頻度をフローサイトメトリにて定量することでスパイクタンパク質特異的な T 細胞を定量するとともに、培養上清中に產生されるサイトカイン濃度や B 細胞からの抗体產生濃度を測定することで、抗体產生ヘルパー機能を評価する実験系を構築した。

(倫理面への配慮)

本研究の検体、プロトコル及び手順は国立感染症ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

2023/2024 年シーズンにおけるワクチン被接種者を対象とした抗体調査

COVID-19 ワクチンは従来株一価ワクチンによる初回接種シリーズに始まり、オミクロン対応二価ワクチン（BA.1 もしくは BA.4/5）の導入、そして 2023/2024 年秋冬シーズンからは XBB.1.5 一価ワクチンによるブースター接種が進められてきた。このような多様なワクチン接種歴に加え、系統の異なる変異株によるブレークスルー感染により、新型コロナウイルスに対する免疫履歴が国内でも非常に多様化している状況にある。本研究では、初回接種シリーズからワクチン接種歴とともに免疫調査を実施しているコホートを対象とし、今後、公衆衛生的観点から選択した変異株を対象とし抗体調査を実施した。対象とした変異株は、2023/2024 秋冬シーズンから感染者数が増加し、2023 年度末時点で世界多くの国・地域で XBB 系統変異株からの置き換わりが起きた JN.1 変異株に加え、XBB/JN.1 系統と系統が異なり、スパイクタンパク質に多くの変異が蓄積されている BA.2.87.1 変異株を調査対象とした。XBB.1.5 一価ワクチ

ン接種後に惹起された XBB.1.5 に対する中和抗体価と、これら変異株に対する中和抗体価の相違を調べることで、これら変異株の抗体逃避能及び抗原性変化を評価した。また、XBB.1.5 一価ワクチン未接種者も一定頻度存在する現状を鑑み、XBB.1.5 一価ワクチン未接種者も調査対象に加えた。ワクチン接種による免疫獲得に加え、感染により獲得された免疫についても調査が必要である。本研究のコホートでは、定期的に測定された N 抗体価の陽転時期を指標として、ブレークスルー感染の有無と、感染ウイルス株について推定した。本研究の調査対象者はすべて、従来株ワクチン 3 回接種を受けるまで感染歴がなくオミクロン対応二価ワクチン(BA.4/5)接種を受けている。その上で、ワクチン接種歴とブレークスルーア感染歴を指標とし、72 名を以下の 3 つのワクチン接種歴、感染歴により 5 つのグループに層別化した(図 1)。1) BA.5 流行期での N 抗体陽転化の有無、2) XBB.1.5 流行期での N 抗体陽転化の有無、3) XBB.1.5 一価ワクチン接種歴の有無。いずれのグループでも、従来株ワクチン 3 回接種を受け、武漢株に対する免疫刷り込み現象による影響もあり、最後の従来株ワクチン接種から約 2 年経過しているものの、武漢株に対する中和抗体が相対的に高値で維持されていた。加えて、ワクチンや感染により追加の抗原曝露を 2 回受けたグループのほうが、追加の曝露がない、もしくは 1 回のグループに比べて武漢株に対する中和抗体価が相対的に高値であった。XBB.1.5 に対する中和抗体価に関しても、追加の曝露回数が多いグループで相対的に高値であった。BA.5 流行期での感染歴と XBB.1.5 流行期での感染歴で XBB.1.5 に対する中和抗体価に有意な差は認められないものの、感染からワクチン接種までの時期が異なることに起因した免疫成熟度の違いなどを反映した可能性があることに留意が必要である。XBB.1.5 に対する中和抗体価と比較し、BA.2.87.1 に対する中和抗体価はほぼ同程度であり有意な差は認められなかった。この結果は、スパイクタンパク質に多数の変異が新たに追加されているものの、BA.2.87.1 の抗体逃避能は変異数から想定されるほど大きくなないことを見出している。その一方、JN.1 に対する中和抗体価は、各グループで若干の程度の差はあるものの、2.2~5.7 倍程度、XBB.1.5 に対する中和抗体価と比較して低下していた。

この中和抗体の差は、JN.1 株と XBB.1.5 株の抗原性の差を反映しているものと考えられ、JN.1 株が抗体逃避能を有している可能性を支持する。

一変異 RBD ライブラリを用いた抗体耐性評価系の構築

従来株 RBD タンパク質の発現ベクターに 1 アミノ酸置換変異を導入して 132 種類の 1 アミノ酸変異 RBD ライブラリを作製した。作製した 1 アミノ酸変異 RBD ライブラリを用いることで、1 アミノ酸変異による血中ポリクローナル抗体の結合性変化を評価する実験系を構築した(図 2)。この実験系を用いることで、血清・血漿抗体のエピトープ解析が可能になり、既存の変異株に対する抗体の耐性評価だけでなく、将来新たな変異株が発生した際に、変異部位とアミノ酸の置換パターンにより、これまでの免疫履歴で獲得された抗体の耐性評価を速やかに行うことを可能にした。

記憶 B 細胞の評価系構築と発現抗体の変異株交差中和活性の解析

ワクチン接種及び感染によりスパイクタンパク質による曝露を受けると、中和抗体に加えて記憶 B 細胞や記憶 T 細胞が誘導され、これが特に重症化予防効果に寄与すると想定されている。そのため、中和抗体の交差性や機能評価に加え、記憶 B 細胞や記憶 T 細胞の存在頻度や変異株への交差性、機能を評価することが今後の免疫調査には強く求められる。本研究では、RBD に特異的な記憶細胞を分離し、シングルセル培養系を用いて記憶 B 細胞が細胞表面に保有している抗体パネルを作製し、様々な変異株に対する中和活性を解析した。その結果、XBB.1.5 に対して中和活性を持つ記憶 B 細胞由来抗体の約半数が、JN.1 に対する中和活性をもつことが確認された。このことは血液中に循環している中和抗体に加え、記憶 B 細胞に保有され感染後に新たに放出される中和抗体の一定数が JN.1 株に対しても交差中和活性を示す可能性を示唆している。

スパイクタンパク質特異的な T 細胞の定量及び機能評価系の構築

記憶 B 細胞から新たに抗体が放出されるためには、記憶 T 細胞による B 細胞のヘルプが必要である。そのため、記憶 T 細胞の存

在頻度とヘルパー機能を評価する系を構築することは、中和抗体価だけに依存した現行の免疫調査の精度を高めることにつながることが期待される。ペプチド化したスパイクタンパク質を抗原刺激用に用意し、試験管内で末梢血単核球とともに共培養後に、活性化マーカー陽性細胞を定量化することで感度よく記憶T細胞頻度を定量することに成功した（図3）。加えて、培養上清中に産生されるサイトカイン濃度やB細胞からの抗体産生濃度を測定することで、抗体産生ヘルパー機能を評価することが可能になった。

D. 考察

2023/2024年秋冬シーズンにおいても、様々なオミクロン変異株の発生が継続している状況であった。特に、XBB系統と遺伝子系統が異なり既存オミクロン変異株を置き換える流行を示したJN.1系統については、今後もこの系統から継続的に変異株が発生する公衆衛生上のリスクがあり、モニタリング情報を注視することが必要な状況である。JN.1系統の抗原性変化について、国内外から査読前プレプリント等を含む論文が発表されているものの、各国・地域で使用してきたワクチン構成が異なったことや、流行株が異なったことに起因する免疫履歴の多様化が生じている状況にある。そのため、免疫履歴の異なるヒト抗血清を用意した上で、新たな変異株の抗原性変化等を評価する必要性が従来よりも増している状況にある。本研究では、XBB.1.5一価ワクチン被接種歴及びブレーカスルーチェンジ歴により層別化したワクチン被接種者の抗血清を用い、オミクロン変異株に対する免疫調査を実施した。XBB.1.5一価ワクチン接種により誘導された中和抗体から、JN.1株はおよそ2~6倍程度の逃避能を有することが確認された一方、BA.2.87.1株は検出可能な逃避能を有していなかった。この結果は、別グループから報告されている評価結果と大きな相違ではなく、抗原性変化の観点では、JN.1株への注視が必要とされた。

本評価でも実施したヒト抗血清を用いた変異株に対する中和抗体価の測定は、比較的簡便かつ迅速に発生した変異株の抗原性変化を評価することが可能となる。ただし、本スキームでは、既出の変異株に対する評価しか実施できず、今後発生するリスクの

ある変異に対する事前評価を行うことは困難である。本研究で構築した1変異RBDライブラリを用いた抗体耐性評価系は、今後スループット性を高める等の課題はあるものの、将来的な変異株のリスク評価、ワクチン戦略を構築する上で活用可能な新しい技術となることが期待される。

ワクチン予防効果において、感染前に存在する記憶B細胞が記憶T細胞によるヘルプのもと感染後に新たに作る抗体が重要な役割を果たすと考えられている。とくにワクチン接種の大きな目的である重症化予防効果への寄与が想定されているものの、これまでこれら細胞の定量化、機能評価を可能にする免疫解析技術が未整備であり、免疫調査には活用されていない。本研究で構築した記憶B細胞と記憶T細胞の評価技術は、上述の抗体耐性評価系に加え、今後の変異株へのワクチン構成を考える上で、重要な手法になる可能性がある。さらに、記憶B細胞の中に、JN.1株含む系統の異なる変異株全てに交差性する抗体を発現するものが含まれていたことから、今後のワクチン株選定等のワクチン戦略を策定する上で、この交差中和抗体の分子学的・構造学的特性を詳細に解析することが重要であると考えられた。

E. 結論

XBB.1.5一価ワクチン被接種歴及びブレーカスルーチェンジ歴により層別化したワクチン被接種者の抗血清を用い、オミクロン変異株に対する免疫調査を実施した。XBB.1.5一価ワクチン接種により誘導された中和抗体から、JN.1株はおよそ2~6倍程度の逃避能を有することが確認された一方、BA.2.87.1株は検出可能な逃避能を有していなかった。中和抗体価の測定に依存した現行の免疫調査法の精度を改良すべく、抗体のウイルス変異への耐性評価を可能とする抗体耐性評価系に加え、重症化予防効果への寄与が想定されている記憶B細胞・記憶T細胞の評価系を構築し、今後の免疫調査への活用を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（発表雑誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1). Yoshimasa Takahashi Vaccine-elicited memory B-cell responses for tackling virus variants. 37th Meeting of the USJCMSP Hepatitis Panel. 2024年3月7日 韓国
 - 2). Yoshimasa Takahashi Humoral Immunity for Durable Control of SARS-CoV-2 Variants. Duke University Special Seminar 2024年2月22日 アメリカ
 - 3). 森山彩野 新型コロナウイルスに対する中和抗体の研究. Cross-disciplinary Conference 2024 2024年2月19日東京
 - 4). Yoshimasa Takahashi Understanding humoral immunity by multi-disciplinary approach. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2024年1月19日 幕張
 - 5). Yoshimasa Takahashi Humoral immune memory elicited by COVID-19 vaccine. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2024年1月17日 幕張
 - 6). Ryutaro Kotaki, Saya Moriyama, Yu Adachi, Eita Sasaki, Kota Ishino, Miwa Morikawa, Hiroaki Takei, Hidenori Takahashi, Masanori Isogawa, Takayuki Matsumura, Masaharu Shinkai, Yoshimasa

Takahashi. Repeated exposure to SARS-CoV-2 Omicron antigens alleviates immunological imprinting and develops Omicron-specific B cells. 第52回日本免疫学会学術集会 2024年1月19日 幕張

- 7). 高橋宜聖 Immune profiling for understanding vaccine immunogenicity and reactogenicity. 近未来ワクチンのサイエンスとデザインシンポジウム 第97回日本薬理学会年会 2023年12月14日
- 8). 上滝隆太郎, 森山彩野, 佐々木永太, 安達悠, 石野航太, 森川美羽, 高橋秀徳, 武井啓朗, 新海正晴, 鈴木忠樹, 松村隆之, 五十川正記, 高橋宜聖 オミクロン対応2価ワクチン追加接種後の液性免疫応答の解析. 第27回日本ワクチン学会・第64回日本臨床ウイルス学会合同学術集会 2023年10月22日 静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

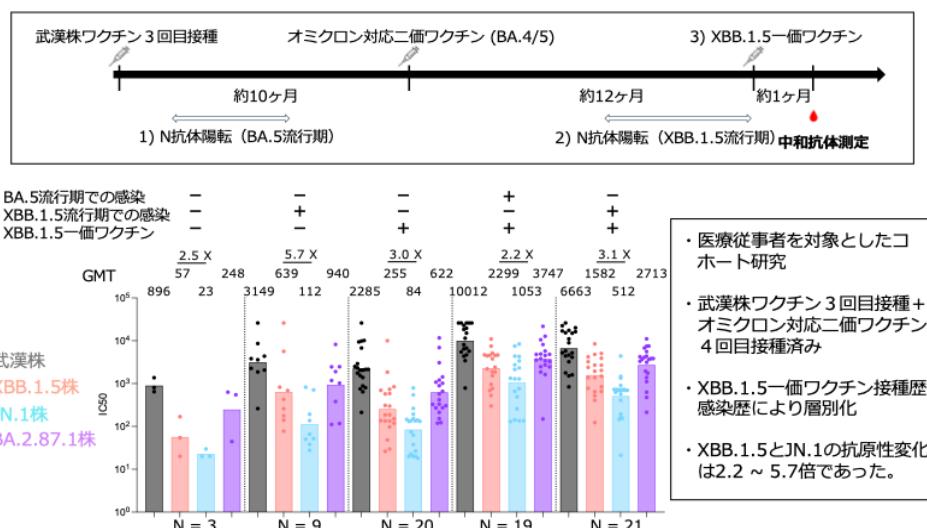


図1 ワクチン被接種者におけるXBB.1.5/JN.1/BA.2.87.1中和抗体値

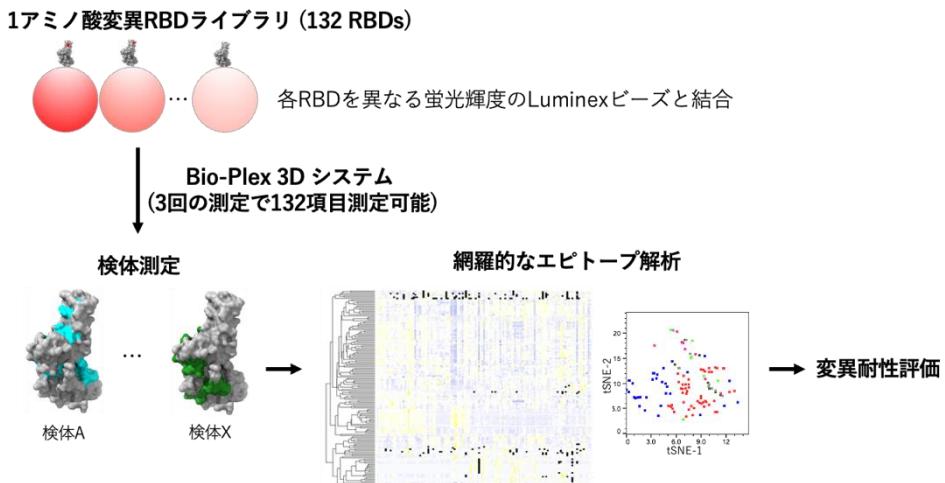


図 2 一変異 RBD ライブリを用いた抗体耐性評価系の構築

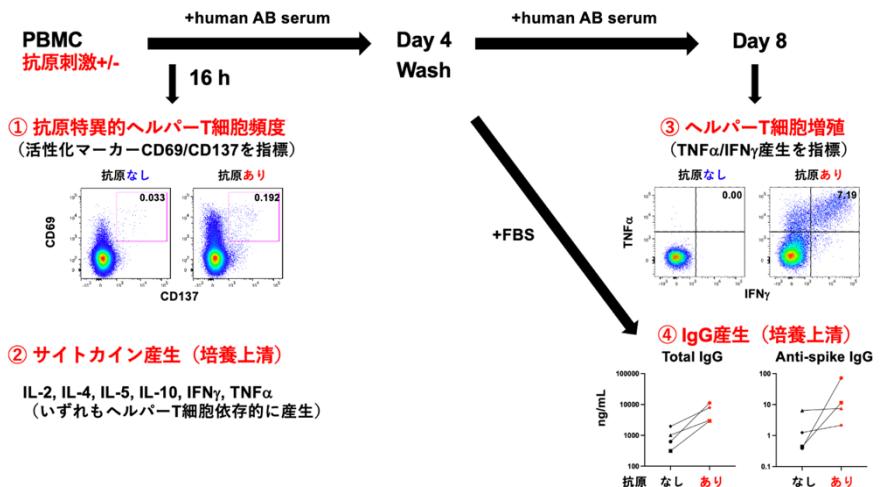


図 3 記憶 T 細胞の定量及び機能評価系の構築