

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）
分担研究報告書

新型コロナウイルスワクチンによる免疫原性に関する調査

研究分担者	原 めぐみ	佐賀大学 医学部 社会医学講座 予防医学分野
研究協力者	松本 明子	佐賀大学 医学部 社会医学講座 環境医学分野
研究協力者	岩坂 知治	佐賀大学 医学部 社会医学講座 予防医学分野
研究協力者	古川 拓馬	佐賀大学 医学部 社会医学講座 予防医学分野
研究協力者	澤田 孟志	佐賀大学 医学部 生体機能学講座
研究協力者	土器屋美貴子	佐賀大学 医学部 社会医学講座 環境医学分野
研究協力者	Mohammad Said Ashenagar	佐賀大学 医学部 社会医学講座 環境医学分野

研究要旨

新型コロナウイルスワクチンの免疫原性や持続とそれらを修飾するについて明らかにするために、健康成人（医療従事者、医学部職員、学生）を対象に2021年6月から9月に前向きコホート研究の手法で観察研究を開始した。150人（男性66人、女性84人、平均年齢 35.8 ± 13.3 ）の研究協力を得て検体採取と測定を進めている。ワクチン接種後の抗体価の推移を評価するとともに測定方法による特性を明らかにした。ファイザー社の新型コロナウイルスワクチン接種後にS蛋白に対するIgG抗体価は有意に上昇し、2回接種後14日前後でピークを示した。研究参加者のうち、接種前、1回接種後、2回接種後の抗体測定が完了した60人について、幾何平均抗体価や上昇倍率を用いて免疫原性を評価したところ、IgG抗体の幾何平均値は、接種前0.44(95%CI:0.41-0.48)、ファイザー社製ワクチン接種後の1回接種後128.9(95%CI:109.2-152.3)、2回接種後1414.9(95%CI: 1226.9-1631.7)、上昇倍率は1回接種後(vs 接種前)291.5(95%CI: 243.6-348.9)、2回接種後(vs 1回接種後)11.0(95%CI: 9.4-12.8)であり、ワクチン接種により有意な上昇がみられた。女性や年齢が若い群で上昇倍率が高い傾向を認めたが有意差を検出するには至らなかった。細胞性免疫については測定方法を確立できた。3回目ブースター接種の検体がそろった時点で測定予定である。

A. 研究目的

ファイザー社の新型コロナウイルスワクチン「コミナティ筋注」（一般名：コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン（SARS-CoV-2）（有効成分名：トジナメラン））について、厚生労働省は2021年2月14日、医薬品医療機器等法に基づく特例承認を行い、2月17日より医療従事者への先行接種が開始された。また、モデルナ社の新型コロナウイルスワクチン「スパイクバックス筋注（旧販売名：COVID-19ワクチンモデルナ筋注）」（一般名：コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン（SARS-CoV-2）（有効成分名：エラソメラン））について、厚生労働省は2021年5月21日、医薬品医療機器等法に基づく特例承認を行い、5月24日より大規模接種センターでの使用が開始された。

これらの mRNA ワクチンは、SARS-Cov-2 のス

パイク蛋白に対する抗体の産生（液性免疫）の誘導を目指すものであり、日本国内での臨床試験においても十分な抗体産生が確認されている。実社会においても、ワクチン接種後の抗体産生の測定結果が多数報告されているが、接種から経時的に検体を採取し抗体産生のピークを評価したものは少ない。また、抗体産生や持続を修飾する要因として性、年齢、生活習慣、基礎疾患などの要因が多数報告されているが、接種時の栄養状態や遺伝子多型などについて評価した報告はない。また、現在、抗体の測定に関しては、様々な試薬や測定方法が存在する。同一検体を異なる方法で測定し、それらの特徴を明らかにすることは、調査間の測定値を比較する際に必要である。

ウイルス感染に対する免疫原性は、抗体産生に加えて、ウイルスに対する T 細胞（細胞性免疫）反

応も重要である。本ワクチンは、抗体反応を誘導する CD4+ T 細胞（ヘルパー T 細胞）や、ウイルス感染が進行して細胞内増殖したウイルスを殺傷する CD8+ T 細胞（キラー T 細胞）のようなウイルス特異的 T 細胞の誘導も期待されており、接種後の CD8+ T 細胞の増加が報告されているが、実社会での調査結果に基づく報告は十分でない。

本研究では新型コロナウイルスワクチンの免疫原性や持続、ならびにそれらを修飾する因子について以下について明らかにすることを目的とする。

- (1) 新型コロナウイルスワクチン接種後の抗体価の推移を各週で評価する。
- (2) 新型コロナウイルスワクチン接種後の抗体価を異なる方法で測定し、その特徴を明らかにする。
- (3) 新型コロナウイルスワクチン接種後の抗体価に影響を及ぼす要因を明らかにする。
- (4) 新型コロナウイルスワクチン接種後の細胞性免疫を評価するとともに、それらに影響を与える要因を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 研究デザイン

前向きコホート研究（市販後ワクチンの観察研究）

(2) 対象者の選定基準

20歳以上の医療従事者、佐賀大学医学部教職員、学生で研究参加について本人の自由意思による文書同意を得た者を対象とした。

(3) 除外基準

妊娠中の者、新型コロナウイルス感染症の既感染者、その他、本研究の担当医が被験者として不適当と判断する者

(4) 登録時の情報収集

ワクチン接種歴は接種済証の記録を転記する。性、生年月日、接種直後の症状、基礎疾患（ぜんそく、慢性肺疾患、心臓病、脳卒中後遺症、腎疾患、肝疾患、血液疾患、糖尿病、神経・筋原性疾患、免疫不全、悪性腫瘍、膠原病、アトピー、薬物アレルギー、食物アレルギー、その他）、治療歴、喫煙歴、飲酒習慣、運動習慣などの基本属性は自記式調査票を用いて調査する。

(5) ワクチン接種

日本での承認内容・接種順に応じて、3週間以上の接種間隔で2回接種し、追加接種は2回接種後8か月経過時に接種。

(6) 免疫原性の評価：抗体測定ならびに細胞性免疫の測定を実施する。

- ① 液性免疫（抗体）：血清用採血管で血液を採取し、シスメックス社およびセルスペクト社に委託し、SARS-CoV-2 N-IgG、および SARS-CoV-2 S-IgG を測定した。シスメックス社では CLEILA 法、セルスペクト社では ELISA 法が採用されている。
- ② 血球検体：EDTA-2K 採血管で血液を採取し、全血球計算と白血球分画検査（外注）、リンパ球サブセット解析を行った。また、同血液検体 5～10 mL よりリンパ球分離溶液（Lymphoprep, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Germany）を用いて末梢血単核細胞ペレットを得た。ペレットは培養液（KM Banker II, Kohjin Bio, Saitama, Japan）で懸濁し、細胞数を計測したうえ -80℃ 保存した。
- ③ リンパ球数の計測：採血後12時間以内に血球を BD マルチテスト 6 カラー TBNK（日本ベクトントンディックインソン（株）、Fukushima, Japan）で染色し、細胞自動解析装置（MACSQuant, Miltenyi Biotec K.K., Tokyo, Japan）でリンパ球サブセット解析を行った。リンパ球サブセット率、白血球数、白血球分画よりリンパ球サブセット数を求めた。
- ④ ELISPOT アッセイ：Human IFN- γ ELISPOT kit (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden) を用いて行う予定である。抗原として SARS CoV-2 Spike Glycoprotein（オリジナル株）の315ペプチド混合液、同様にデルタ株、オミクロン株のペプチド混合液を用いる。20万細胞/ウェルで0.5 ug/ ペプチドを添加して得られた IFN- γ スポット数の平均値から陰性対照において得られたスポット数の平均値を減じてペプチド特異的なスポット数を算出する。今年度は IFN- γ ELISPOT の妥当性を確認するため、抗原の添加条件を検討した。モデルナ社の COVID-19 ワクチン

(mRNA-1273) 接種を受けた5名に由来するPBMC検体を用い、SARS-CoV-2スパイク蛋白に由来するペプチドプールを抗原とした。凍結乾燥品をDMSOに溶解して試験に使用した。オリジナル株ペプチドプール(製品名:PepMix™ SARS-CoV-2 (Spike Glycoprotein)、製品番号:PM-WCPV-S-2、純度:>70%(HPLC-MS)、メーカー:JPT Peptide Technologies)、Delta株ペプチドプール(製品名:PepMix™ SARS-CoV-2 (Spike B.1.617.2/Delta)、製品番号:PM-SARS2-SMUT06-1、純度:Crude、メーカー:JPT Peptide Technologies)について検討した。陰性対照としてDMSO添加群を設け、陽性対照としてPMAおよびIonomycin添加群を設けた。ELISPOTアナライザーはImmunoSpot S6 VERSA (Cellular Technology Limited)を用いた。

(7) 統計解析

ワクチン接種前後の抗体価やリンパ球数の上昇倍率や幾何平均値を求める。採血ポイント間の比較はWilcoxon signed-rank testで比較し、群間比較はWilcoxon rank-sum testあるいはKruskal-Wallis testで評価する。必要に応じてParametric検定や傾向性の検定なども用いる。統計解析にはSAS (Version 9.4)を使用する。

(倫理面への配慮)

当研究は、佐賀大学医学部の臨床研究審査委員会およびヒトゲノム倫理審査委員会の承認を得た(承認番号:R2-24, R2-44, R3-4, R3-9, R3-39)。本調査の目的、協力の諸条件について文書による説明を行い、調査対象者が本研究の内容を十分理解したことを確認した後に、本調査への参加についての自由意思による同意を文書により得た。

C. 結果

研究参加者の内訳を表1に示した。150人が研究に参加し、121人はファイザー社製、29人はモデルナ社製のワクチンを接種した。ワクチン接種順番や時期が緊急に決定していったため、細胞性免疫の評価が実施可能であったのは、モデルナ社製のワクチンを接種した29人であった。3回目の追加接種の際に学生41人に細胞性免疫の評価を追加で実施す

ることとした。接種前の採血ができていない医療従事者60人については、ワクチン接種後の抗体の持続について評価することとした。

(1) 新型コロナウイルスワクチン接種後の抗体価の推移(測定方法別)

コヒナティ筋注の接種前、1回接種1週後、2週後、3週後、2回目接種1週後、2週後、3週後、1か月後、2か月後、3か月後の抗体価をCLEILIA法とELISA法で測定し、その推移を図1に示した。両測定方法においてもSタンパクに対する抗体は2回目接種後2週間目でピークとなった。ELISA法は、抗体価が低い場合にはばらつきが大きい傾向がみられた。性別にみると女性の方が接種後初期には抗体価が高い傾向が認められた。両測定方法間の測定値の相関を図2に示した。抗体価が高い時は両者の相関は高いが、抗体価が低い時は両者の相関は低いことが示された。

(2) 抗体応答に影響を及ぼす要因

ワクチン接種前、1回接種後、2回接種後4週目までの検体の測定が完了した62人について免疫応答をS蛋白に対するIgG抗体(BAU/ml)の測定結果を用いて評価した(表2)。IgG抗体の幾何平均値は、接種前0.44(95%CI:0.41-0.48)、ファイザー社製ワクチン接種後の1回接種後128.9(95%CI:109.2-152.3)、2回接種後1414.9(95%CI:1226.9-1631.7)、上昇倍率は1回接種後(vs接種前)291.5(95%CI:243.6-348.9)、2回接種後(vs1回接種後)11.0(95%CI:9.4-12.8)であり、ワクチン接種により有意な上昇がみられた。性別、年齢別(20~39歳、40歳以上)、基礎疾患の有無で層別解析を実施したところ、2回接種後の上昇倍率が女性や年齢が低い群で高い傾向がみられたが統計学的有意差を検出するには至らなかった。

(3) 細胞性免疫の評価

① 血球検体

2021/7/27、9/2、10/4、11/29、2022/1/13、1/18に血球検体の採取を行い、5-40×10⁶/mLの末梢血単核球懸濁液(1-2 mL)を得、-80℃保存を行った。

② リンパ球数の計測

採血当日に10 μ Lを染色し、フローサイトメトリーでリンパ球サブセット解析を行った(図3)。外注検査によって得られたリンパ球数をもとにリ

ンパ球サブセット細胞数を算出したところ CD4 陽性 T 細胞は 200~1,300 細胞/ μ L、CD8 陽性 T 細胞は 100~900 細胞/ μ L、B 細胞は 70~700 細胞/ μ L と個人差が大きく、ワクチン接種後に細胞数が減る傾向にあった (図 4)。

③ ELISPOT アッセイ

オリジナル株の条件検討では、0.5 μ g/ ペプチドでペプチド特異的 IFN- γ スポットが検出できることが分かった。ただし 1 μ g/ ペプチドまたは 0.5 μ g/ ペプチドでペプチド特異的 IFN- γ スポット数に顕著な差 (50% 以上の減少) が生じることが確認され、留意が必要と考えられた。Delta 株でも 0.5 μ g/ ペプチドでペプチド特異的 IFN- γ スポットが検出できることが分かった。

D. 考察

本研究では新型コロナウイルスワクチンの免疫原性や持続、ならびにそれらを修飾する因子について以下について明らかにすることを目的に、前向きコホート研究の方法で調査を実施中である。ワクチン接種開始や対象者が急に決定するため、対象者のリクルートまでに十分な時間が確保できず、血液採取が間に合わないなどの事態が生じたため、150 人の参加者のうち細胞性免疫による免疫原性の評価が実施できるのは 29 人となった。

今回、CLEILA 法と ELISA 法を用いて S 蛋白に対する IgG 抗体を測定し測定方法による特性を明らかにした。ELISA 法は抗体価が低い場合にはばらつきが大きいが、値が高い場合には精密な測定方法である CLEILA 法と高い相関を示すことが示された。ELISA 法は特殊な装置を必要とせず汎用可能な方法であり、2 回接種後の抗体価測定には十分対応可能であると考えられた。

医療従事者 20 人についてワクチン接種後 1 週間ごとに S 蛋白に対する IgG 抗体を測定したところ、2 回目接種後 2 週間でピークとなり、以後漸減することが示された。このことは、2 回目接種後 2 週間前後が最も感染防御効果が高いことを示唆する結果と考えられる。我々は、症例対照研究においてワクチン接種後からの期間ごとに有効率を算出したが、2 回目接種後 14 日前後で最も有効率が高かったことを明らかにしており、本仮説を支持する結果であった (令和 3 年度報告書：新型コロナウイルス感染症の予防に関する疫学調査：新型コロナウイルスの

有効性に関する症例対照研究)。

対象者が比較的若い健康成人である点やサンプルサイズが小さい点から、対象者の特性による免疫原性の有意差は認められなかった。しかし、2 回接種後の上昇倍率が女性や年齢が低い群で高い傾向がみられたことは、これまでの報告を支持すると考えられた。

細胞性免疫に関しては、血球検体の測定、リンパ球数の計測に加え、オリジナル株、デルタ株、オミクロン株に対するペプチド特異的 IFN- γ スポットの測定の予備検討を進めている。承認後の観察研究において細胞性免疫を評価した研究は少ないことから、本研究成果は新型コロナワクチンの接種推進に対し有用な情報となることが期待される。

E. 結論

新型コロナウイルスワクチンの実社会での免疫原性および、それらに対する関連因子を明らかにするため、2021 年 6 月から 9 月に前向きコホート研究の手法で観察研究を開始した。抗体価の推移を評価するとともに測定方法による特性を明らかにした。ファイザー社の新型コロナワクチン接種後に S 蛋白に対する IgG 抗体価は有意に上昇し、2 回接種後 14 日前後でピークであった。女性や年齢が若い群で上昇倍率が高い傾向を認めたが有意差を検出するには至らなかった。細胞性免疫については測定方法を確立できた。3 回目ブースター接種の検体がそろった時点で測定予定である。

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
投稿準備中
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 研究参加者

対象	接種ワクチン	人数	評価内容	検体採取ポイント
学生	ファイザー	41	抗体応答、持続、ブースター効果 (3回目接種時細胞性免疫)	接種前、1回接種後、2回接種1か月後、 3か月後、6か月後、3回接種1か月後
医療従事者 (クリニック)	ファイザー	20	抗体応答、持続、ブースター効果	接種前、1回接種後から2回接種1か月後 までは各週、3か月後、6か月後、 3回接種1か月後
医療従事者 (大学附属病院)	ファイザー	60	抗体価の持続、ブースター効果	2回接種1か月後、3か月後、6か月後、 3回接種1か月後
学生職員	モデルナ	29	細胞性免疫、抗体応答、持続、 ブースター効果	接種前、1回接種後、2回接種1か月後、 3か月後、6か月後、3回接種1か月後

表 2. ワクチン接種によるS蛋白に対するIgG抗体 (BAU/ml)の応答

	人数	幾何平均抗体価 (GMT; BAU/ml)			上昇倍率	
		接種前 (S0)	1回後 (S1)	2回後 (S2)	1回目 (S1/S0)	2回目 (S2/S1)
全体*	62	0.44	128.9	1414.9	291.5	11.00
	95%CI	(0.41-0.48)	(109.2-152.3)	(1226.9-1631.7)	(243.6-348.9)	(9.4-12.8)
男性	32	0.45	137.6	1306.8	306.9	9.50
	95%CI	(0.40-0.51)	(113.0-167.6)	(1044.0-1635.6)	(248.4-379.2)	(7.57-11.9)
女性	30	0.44	120.3	1540.2	2760.0	12.80
	95%CI	(0.38-0.50)	(90.6-159.6)	(1285.6-1845.1)	(202.8-375.5)	(10.3-15.9)
P値		0.75	0.43	0.25	0.56	0.06
20~39歳	47	0.45	127.3	1520.2	284.7	11.90
		(0.40-0.50)	(107.3-151.0)	(1303.6-1772.8)	(234.6-345.3)	(10.1-14.1)
40歳以上	15	0.43	134.2	1129.9	314.2	8.40
		(0.37-0.49)	(83.0-217.0)	(795.7-1604.5)	(194.3-507.9)	(5.58-12.7)
P値		0.65	0.83	0.07	0.64	0.05
基礎疾患なし	55	0.44	132.6	1386.5	302.9	10.50
		(0.40-0.48)	(110.6-158.8)	(1192.4-1612.2)	(249.0-368.4)	(8.82-12.4)
あり	7	0.48	103.6	1659.6	215.9	16.00
		(0.037-0.62)	(64.2-167.4)	(945.7-2912.7)	(135.0-345.4)	(11.4-22.6)
P値		0.51	0.35	0.43	0.24	0.09
*接種前、1回接種後、2回接種後の検体がそろっている62例で検討						

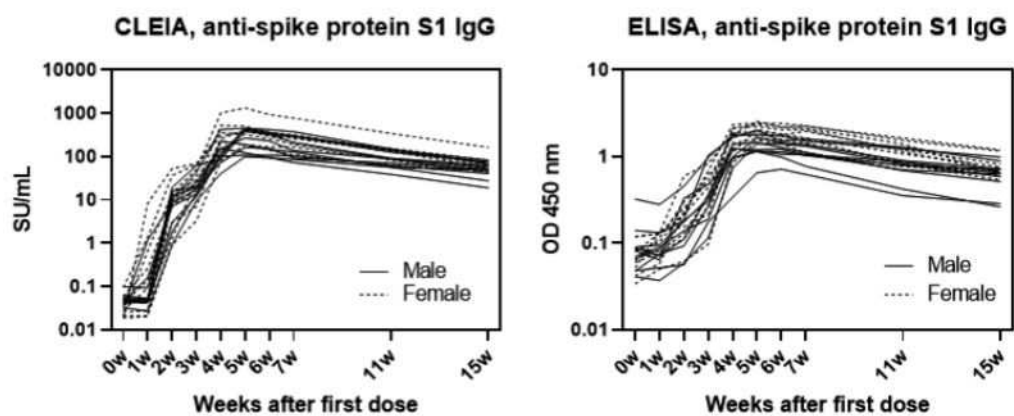


図 1. ワクチン接種後の抗体価の推移：測定方法別

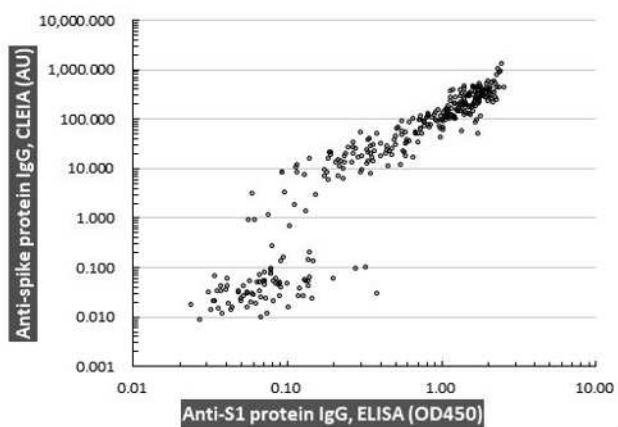


図 2. CLEIA 法と ELISA 法の相関

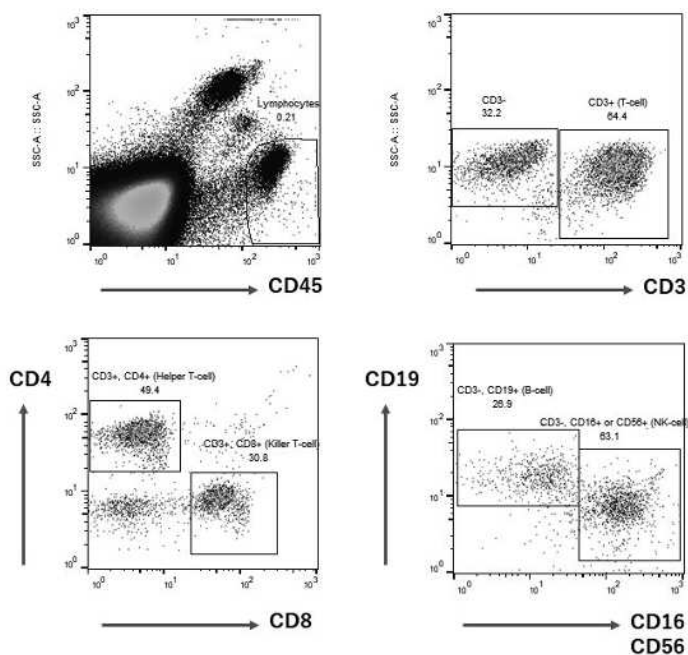


図3. フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析
 左上: 側方散乱光 (SSC) と CD45 (白血球共通抗原) によるリンパ球の選択
 右上: リンパ球分画における CD3 による T 細胞 (CD3+) と B 細胞・NK 細胞 (CD3-) の選択
 左下: T 細胞分画 (CD3+) における CD4+T 細胞もしくは CD8+T 細胞の選択
 右下: B・NK 細胞分画 (CD3-) における B 細胞もしくは NK 細胞の選択

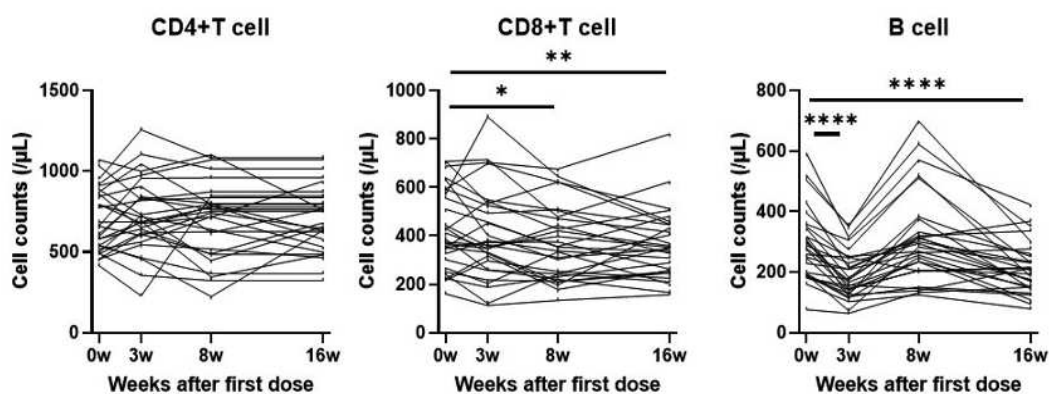


図4. 末梢血リンパ球数の推移
 モデルナ社製ワクチンを8月に開始した大学職員・学生29人の細胞数。*, **, ****; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$ by Wilcoxon signed-rank sum test.