

新型コロナウイルスワクチン接種後の Spike protein 特異的 T 細胞応答：一般集団における前向き研究

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

研究要旨

本研究では新型コロナウイルスワクチンの細胞性免疫原性について、その持続やそれらを修飾する因子について明らかにすることを目的とした。健康成人（佐賀大学医学部職員、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68人（男性33人、女性35人、平均年齢28.4±12.4）の研究協力を得て2022年9月まで観察、血液採取を行った。ワクチン接種前後の抗体価の推移を評価するとともに、一部の検体で末梢血単核球を抽出し、ELISPOT アッセイによる抗原特異的 IFN- γ 放出能の評価を行っている。ベースラインから細胞性免疫の評価が実施可能であった26人分のリンパ球サブセット解析では、ワクチン接種後の細胞数がダイナミックに変動するとともに個人差が大きく、細胞性免疫応答の評価の際にこれを考慮する必要性が示唆された。交差反応の検証では、オリジナル株、デルタ株、オミクロン株ペプチドに同様の応答が観察され、免疫逃避は液性免疫で強く、細胞性免疫で限定的であることが確認できた。2回目接種後1か月時点と3回目接種後1か月時点の比較では、全体的には有意差が検出されなかったが、2回目接種後のピーク値が最も低かった3名は大幅に応答が増加し、追加接種が細胞性免疫の観点からも重要である可能性が示唆された。さらに、COVID-19において細胞性および液性免疫応答強度が非関連であることが確認され、ワクチンの免疫原性について、液性免疫とは別に、細胞性免疫応答に関する検証が必要であることが示された。今後は残検体の測定を進めるとともに、細胞性免疫応答強度と属性との関連を検証する。

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」、モデルナ社の「スパイクバックス筋注」の接種が2021年5月より開始された。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）および細胞性免疫の誘導を目指すものである。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が、異なるタイプの免疫記憶は異なる動態を示すため、中和抗体力価や S 蛋白特異的抗体価で細胞性免疫能は予測できない [1]。また、SARS-CoV-2 感染症において T 細胞性免疫の早期誘導が重症化抑制と関連する [2] ことや、SARS-CoV-1 感染症（2003

年）で経年的にメモリー B 細胞が失われ、メモリー T 細胞が残存する（6年後調査）[3] ことが報告されていることから SARS-CoV-2 感染症における細胞性免疫の重要性が示唆される。しかし、COVID-19 ワクチン接種後の T 細胞性免疫能の評価は多くはなされていない。

本研究では新型コロナウイルスワクチンの細胞性免疫原性について、その持続やそれらを修飾する因子について明らかにすることを目的とする。

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した。

(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) 細胞性免疫の評価

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、 $5-40 \times 10^6/\text{mL}$ の末梢血単核球懸濁液（1-2 mL）を得、緩やかに冷却、 -80°C で保存した。

- ① 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・ディッキンソン(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(外注)、白血球分画(外注)よりリンパ球サブセット数を求めた。
- ② ELISPOT アッセイ: Human IFN- γ ELISPOT kit (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden)を用いた。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た。20万細胞/ウェルで $0.5 \mu\text{g/}$ 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した。IFN- γ ELISPOT の妥当性を確認するため、抗原の添加条件を事前に検討し、結果を踏まえて $0.5 \mu\text{g/}$ ペプチドの濃度で凍結乾燥ペプチド混合物をDMSOに溶解し、使用した。オリジナル株ペプチドプール(製品名: PepMixTM 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: PepMixTM 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リンパ球数の上昇倍率や幾何平均値を求める。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

68人が研究に参加し、佐賀大学学生42人はファイザー社製、26人は教職員はモデルナ社製のワクチンを2回接種した。その後、3回目は全員ファイザー社製ワクチンを接種した。接種順番や時期が緊急に決定していったため、ベースラインから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26人であった。3回目の

追加接種の際に学生の評価を追加した。

(ア) リンパ球サブセット数

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。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100~1000細胞/ μ L、B細胞は70~600細胞/ μ Lと個人差が大きく、CD8陽性T細胞とB細胞はワクチン接種後に細胞数が減少した(図1)。

(イ) 交差反応

オリジナル株と変異株の交差反応を一部検体で確認したところ、回帰直線はほぼ $y=x$ となり、良好な交差反応を示すことが確認できた(図2)。

(ウ) 細胞性免疫応答の推移

1回目ワクチン接種後3週間から3回目接種後1か月の間に採取した末梢血単核球について行ったSARS CoV-2 Spike Glycoprotein 特異的IFN- γ 放出能を図3に示す。2回目接種後1か月、あるいは3回目接種後1か月後に最も高い反応が検出され、この2群で差は検出されなかったものの、最低値が26から69.5 SFC/ 2×10^5 PBMCに増加しており、細胞性免疫の底上げの効果が考えられた(図3A)。また、モデルナ社製ワクチンを接種したサブコホートとファイザー社製ワクチンを接種したサブコホートの比較では、3回目接種直前の反応がファイザー社製ワクチン接種コホートで高かった(図3AおよびB)。

(エ) 細胞性免疫応答と液性免疫応答の関連

図4に同一検体のワクチン接種後の特異的細胞性免疫応答(ELISPOTアッセイ)と液性免疫応答(血清抗S1IgG)の関係をプロットした。繰り返しを考慮した混合モデルでlog IFN- γ SFCに対するLog抗S1IgGの効果を検定したところ、回帰係数は0.09、 $p=0.3$ と関連は推定されず、層別の順位相関係数も同様であった(図中に表示)。

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し、検体測定、統計解析中である。

リンパ球サブセット解析では、ワクチン接種後の細胞数がダイナミックに変動するとともに個人差が大きく、細胞性免疫応答の評価の際にこれを考慮する必要性が示唆された。交差反応の検証では、既報[4, 5]と同様にオリジナル株、デルタ株、オミクロン株ペプチドに同様の応答が観察された。S蛋白変異による免疫逃避は液性免疫で強く、細胞性免疫で限定的であることが示されており[4-6]、本結果と一致する。また、ブースター効果が検出されなかった(2回目接種後1か月時点と3回目接種後1か月時点の比較)ことも既報と一致している[4]が、2回目接種後のピーク値が最も低かった3名は大幅に応答が増加し(26-39から171-390 SFC/ 10×10^5 PBMCへ)、追加接種が細胞性免疫の観点からも重要である可能性が示唆された。COVID-19において細胞性および液性免疫応答強度が非関連であることがこれまでに報告されているが[1, 2]、本検討でも同様であり、ワクチンの免疫原性について、液性免疫とは別に、細胞性免疫応答に関する検証が必要であることが確認された。

E. 結論

新型コロナウイルスワクチンの実社会での細胞性免疫原性および、それらに対する関連因子を明らかにするため、前向きコホート研究の手法で観察研究を開始した。今年度は変異株に対する良好な交差反応性やブースターショットの効果を確認することができた。今後は残検体の測定を進めるとともに、属性との関連を検証する。

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

参考文献

1. Dan, J.M., et al., *Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection*. Science, 2021. **371** (6529).
2. Tan, A.T., et al., *Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients*. Cell Rep, 2021. **34** (6): p. 108728.
3. Tang, F., et al., *Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7264-8.
4. Maringer, Y., et al., *Durable spike-specific T-cell responses after different COVID-19 vaccination regimens are not further enhanced by booster vaccination*. Sci Immunol, 2022: p. eadd3899.
5. Keeton, R., et al., *T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron*. Nature, 2022. **603** (7901): p. 488-492.
6. Geers, D., et al., *SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees*. Sci Immunol, 2021. **6** (59).

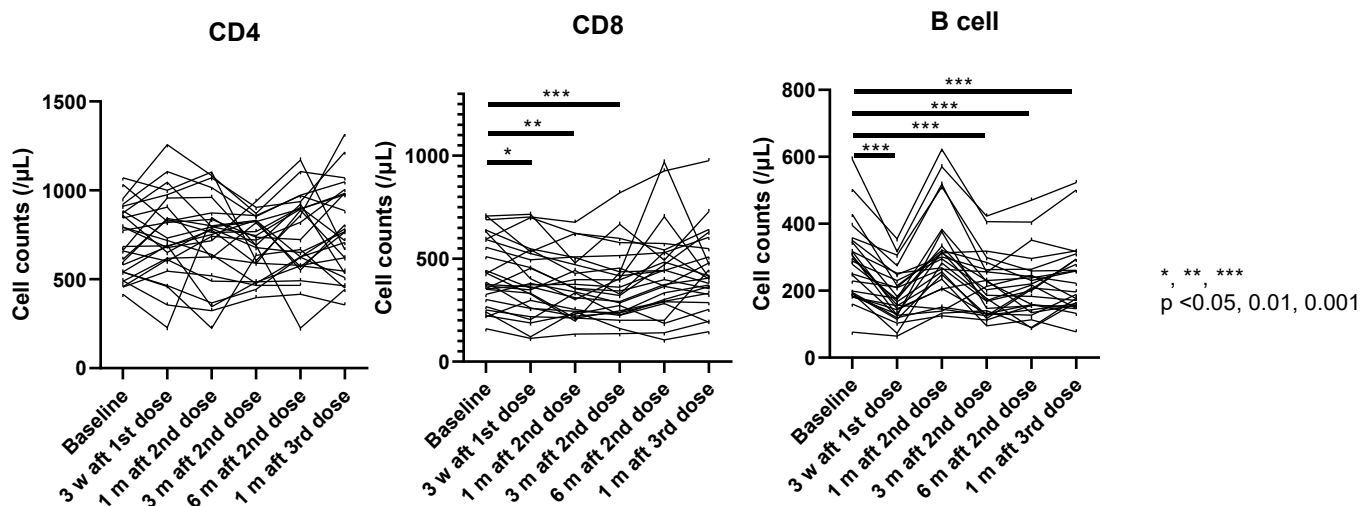


図1. 末梢血リンパ球数の推移
 モデルナ社製ワクチンを8月に開始した大学職員・学生29人の細胞数をプロットした。*, **, *** ;
 p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001 by Wilcoxon signed-rank sum test.

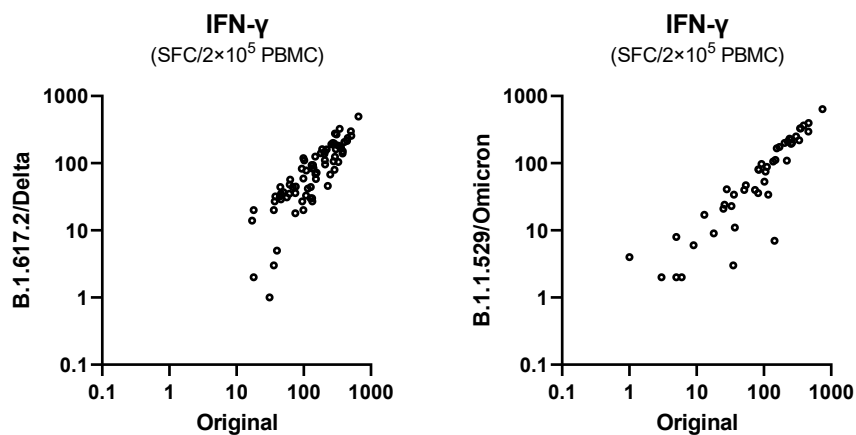


図2. ELISPOT アッセイによる SARS-CoV-2 (Spike Glycoprotein)変異株に対する交差反応性

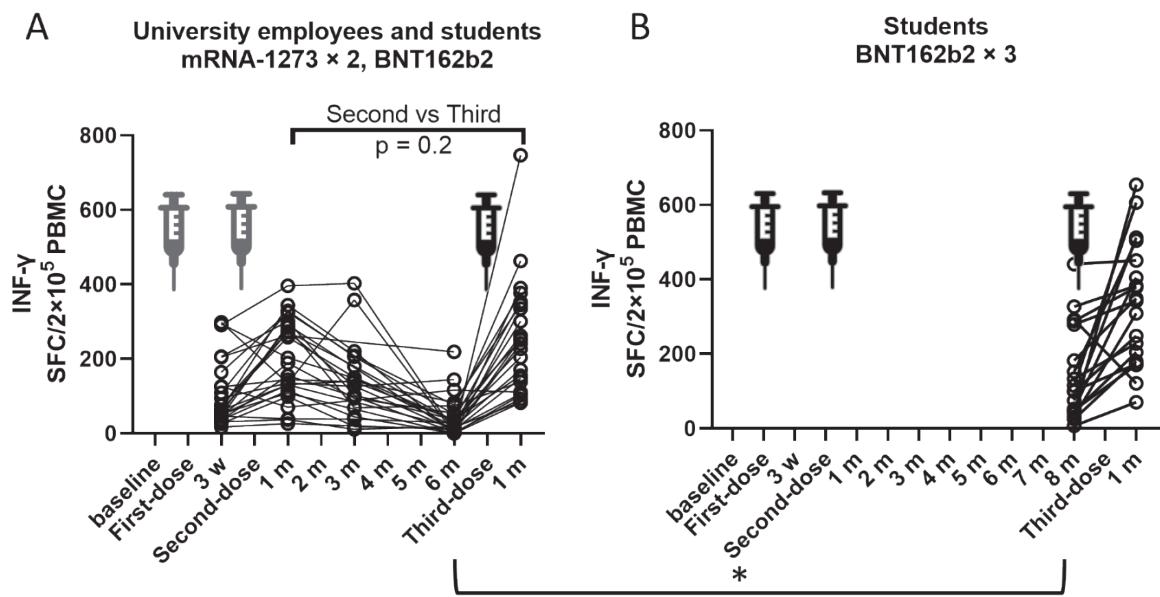
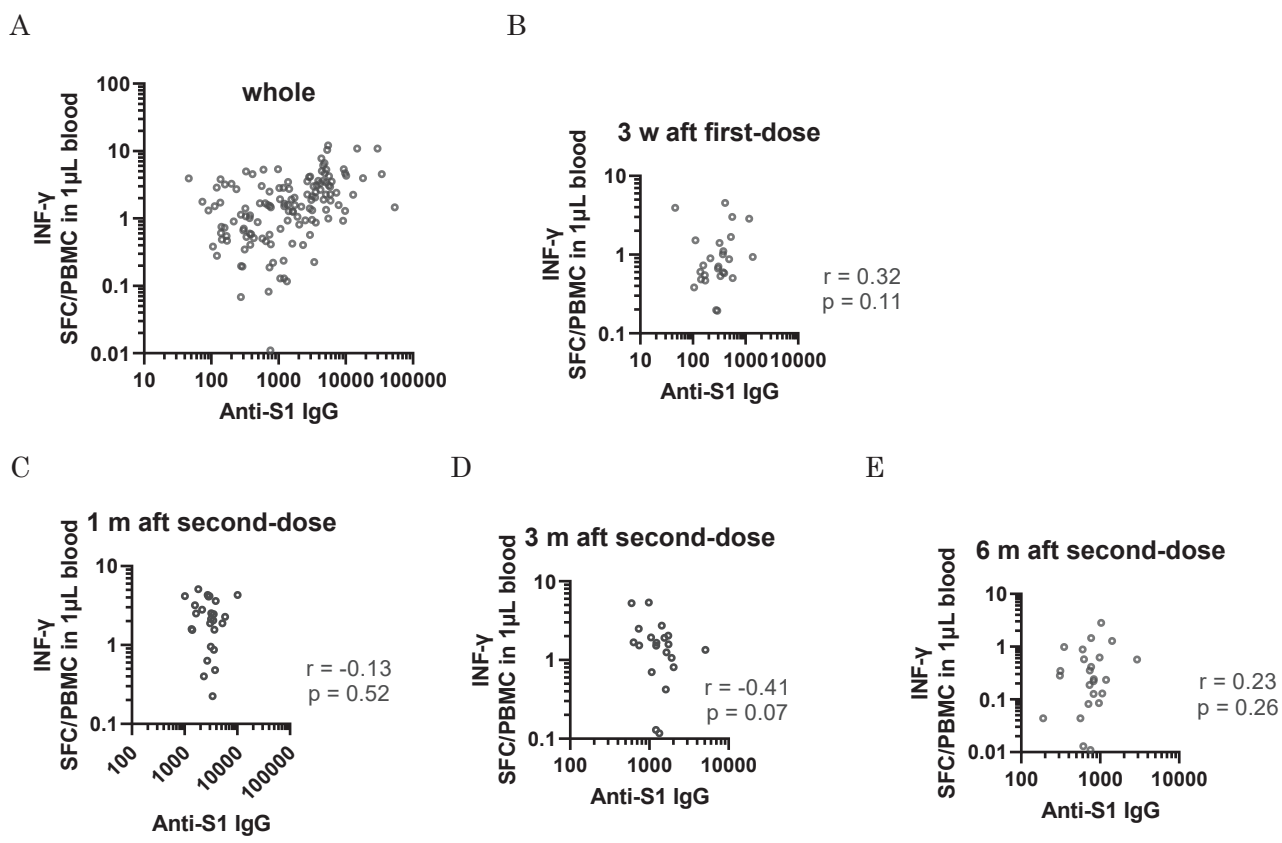
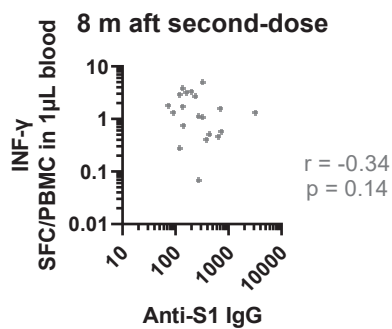


図3. SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein オリジナル株ペプチドに対する特異的 IFN- γ 放出能
 A) モデルナ社製ワクチン 2 回接種およびファイザー社製ワクチン 3 回目接種群 (大学教職員および学生 26 名) における推移。 $p = 0.2$ for Wilcoxon matched-pairs signed rank test.
 B) ファイザー社製ワクチン 3 回接種群 (大学生 19 名) における推移。
 * $p < 0.01$ for Spearman's rank correlation test with adjustment of sex, age, and rs671 genotype in the left panel.



F



G

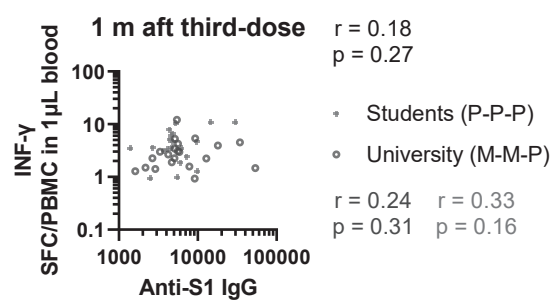


図 4. 血清中抗 SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein IgG 抗体価と特異的 IFN- γ 放出能の関連
血清抗体価 (BAU/mL) との直接比較のため、特異的 IFN- γ 放出能は血液 1 μ L 当りに補正した。
A) 45 名分の繰り返し測定を含む全データ (N = 159) のプロット
B-G) ワクチン接種後のタイミングで層別にプロット。F はファイザー社製ワクチン 3 回接種群 (大
学生 19 名) のプロット。G はモデルナ社製ワクチン 2 回接種およびファイザー社製ワクチン 3 回
目接種群 (大学教職員および学生 26 名) のプロット。r, Spearman の順位相関係数。