厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

スパイクタンパク質の由来となる mRNA 検出文献の分析法信頼性評価研究

研究分担者　橋本晨（孫雨晨）国立医薬品食品衛生研究所　医薬安全科学部　主任研究官

研究要旨
COVID-19 mRNA ワクチン由来 mRNA がヒトの体液および組織中に残存することを示した報告が近年相次いでおり、安全性への懸念が高まっている。一方、これらの報告で用いられた分析法の信頼性については十分に検討されていない。本研究では、ヒト体液および組織においてワクチン由来 mRNA を検出した文献 11 報を対象として、分析法を信頼性の観点から評価し、評価結果および各分析法が検出可能な分析対象に関する情報を整理した。評価の結果、独自に設定した信頼性評価基準においてバリデートされた定量分析法を必要とするランク A に相当したものは 11 報中 3 報にとどまり、多くの文献では分析法の品質が十分とはいえず、結果の信頼性に懸念が残ることが示された。特に ISH を用いた文献では、使用された市販プローブの標的塩基配列が非公開であるため、SARS-CoV-2 感染由来 RNA とワクチン由来 RNA とを正確に識別できるか否かを判断することが困難であった。一方、核酸増幅法を用いた信頼性の高い報告では、ワクチン由来 mRNA が接種後の組織・体液中に残存することが示されており、その残存量とスパイクタンパク質の発現および mRNA ワクチンの安全性との関連を明らかにするさらなる研究が必要であると考える。COVID-19 mRNA ワクチンの安全性を適切に評価するためには、十分にバリデートされた定量分析法を用いた研究の実施と、信頼性の高い科学的根拠の基盤構築が重要であると考える。

研究分担者
齊藤公亮　国立医薬品食品衛生研究所　医薬安全科学部　第二室長
薄田健史　国立医薬品食品衛生研究所　医薬安全学部　主任研究官

A．研究目的

2019 年末に出現した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、世界規模のパンデミックを引き起こした。この未曾有の感染症の出現を受け、製薬企業は迅速に対応し、mRNA 技術を基盤としたワクチンの開発および製造を加速させた。結果として、特例承認という形であったものの、本邦でも主に流通した mRNA ワクチンをはじめ、約 1 年という非常に短期間で一般利用が可能となり、新型コロナワクチン接種は、2020 年から 2024 年の間に約 250 万人の死亡を回避したと推定されている[1]。 ワクチン接種は現在も世界各地で継続されており、特に重症化しやすいとされている高齢者や基礎疾患を有する人、免疫が抑制状態の人は継続した接種が推奨されている。

コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンは、病原体である重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質をコードする mRNA が本体であり、接種後宿主細胞内に取り込まれることで、スパイクタンパク質を発現させる。発現したスパイクタンパク質は抗原として提示されることで免疫応答を誘導し、抗体

の産生及び細胞性免疫応答の惹起により、防御免疫の獲得につながる[2]。接種された mRNA はヌクレアーゼにより分解されるため、数日で消失することが審査報告書において記載されている。一方で、近年の研究では、ワクチン由来のスパイクタンパク質、あるいは接種された mRNA 自身が、接種後数日から数週間にわたり血中で検出される症例が存在することが報告された[3-5]。これに伴って、スパイクタンパク質や mRNA がヒト組織内に残存する可能性や、それに伴う安全性への影響について懸念を表する考えも提唱されている。一般に、安全性上の懸念は、有害事象報告の体系的な収集・評価・解析を通じて検討され、その結果に基づいて適切な安全対策が講じられる。しかしながら、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンは、社会的および科学的関心が非常に高く、その広範な使用は、公衆衛生上きわめて大きな利益をもたらしてきたことは疑う余地がないが、情報が十分に検証されないまま安全性に関する不安を招く情報が発信・拡散されており、科学的根拠に基づく適切な情報理解を妨げる影響が危惧される。

そこで本研究では、分担研究により、体液および組織中においてコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンを検出した文献として抽出した文献 11 報を対象に、分析法を信頼性の観点から評価し、その評価結果と分析法で検出可能な分析対象に関する情報を整理することを目的とした。

B．研究方法

抽出した文献について、分析法を信頼性の観点から評価した。具体的には、メソッド記載の有無、重要項目の記載の有無、選択性評価の有無、定量的評価の有無（検量線の有無）、及び定量的評価に対するバリデーションの有無、を評価し、それぞれの有無に応じてランク付けした（図１）。評価においては、高ランクの条件を満たした場合であっても、より低ランクの条件を満たさない場合（例：メソッドの記載がない定量的評価）は、低ランクを採用した。コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの検出手法として、逆転写リアルタイム PCR 法（RT-qPCR）およびドロップレットデジタル PCR 法（ddPCR）を含む核酸増幅法、*in situ* ハイブリダイゼーション法（ISH）、ならびに RNA シークエンス法について、それぞれ重要項目を設定した。具体的に、核酸増幅法では、標準物質 （陽性コントロール）、Non-template control（陰性コントロール）、プライマー情報、およびプローブ情報を重要項目に設定した。一方で、ISH ではプローブ情報およびハイブリダイゼーション温度、RNA シークエンス法ではライブラリー合成キットおよび解析参照配列情報を重要項目として設定した。市販キットを使用し、キット名・製品情報が明確に提示されている場合は、上述の重要項目を満たすと判断した。

ヒト検体においてコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンを検出した文献に記載された情報に基づき、主な検出条件および検出対象を整理した。組織中における解析文献を表 1、体液中における解析文献を表 2 にまとめた。なお、評価対象とした文献は以下の通りである。

＜評価対象文献＞

評価文献 1.

Ota N, Itani M, Aoki T, et al. Expression of SARS-CoV-2 spike protein in cerebral Arteries: Implications for hemorrhagic stroke Post-mRNA vaccination.

J Clin Neurosci. 2025;136:111223.

評価文献 2.

Krauson AJ, Casimero FVC, Siddiquee Z, Stone JR. Duration of SARS-CoV-2 mRNA vaccine persistence and factors associated with cardiac involvement in recently vaccinated patients.

NPJ Vaccines. 2023;8(1):141.

評価文献 3.

Martin-Navarro L, de Andrea C, Sangro B, Argemi J. In situ detection of vaccine mRNA in the

cytoplasm of hepatocytes during COVID-19 vaccine-related hepatitis.
J Hepatol. 2023;78(1):e20-e22.

評価文献 4.
Bartmann C, Schmidt V, Mörz M, et al. Detection of spike protein in term placentas of COVID-19 vaccinated and/or SARS-CoV-2 infected women.
PLoS One. 2026;21(3):e0344185.

評価文献 5.
Santos A, Sauer M, Neil AJ, et al. Absence of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein expression in placentas from individuals after mRNA SARS-CoV-2 vaccination.
Mod Pathol. 2022;35(9):1175-1180.

評価文献 6.
Lin X, Botros B, Hanna M, et al. Transplacental transmission of the COVID-19 vaccine messenger RNA: evidence from placental, maternal, and cord blood analyses postvaccination.
Am J Obstet Gynecol. 2024;230(6):e113-e116.

評価文献 7.
Golan Y, Prahl M, Cassidy A, et al. Evaluation of Messenger RNA From COVID-19 BTN162b2 and mRNA-1273 Vaccines in Human Milk.
JAMA Pediatr. 2021;175(10):1069-1071.

評価文献 8.
Hanna N, Heffes-Doon A, Lin X, et al. Detection of Messenger RNA COVID-19 Vaccines in Human Breast Milk.
JAMA Pediatr. 2022;176(12):1268-1270.

評価文献 9.
Hanna N, De Mejia CM, Heffes-Doon A, et al. Biodistribution of mRNA COVID-19 vaccines in human breast milk.
EBioMedicine. 2023;96:104800.

評価文献 10.
Fertig TE, Chitoiu L, Marta DS, et al. Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination.
Biomedicines. 2022;10(7):1538.

評価文献 11.
Castruita JAS, Schneider UV, Mollerup S, et al. SARS-CoV-2 spike mRNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID-19 vaccination.
APMIS. 2023;131(3):128-132.

（倫理面への配慮）
該当なし

C．研究結果・考察
評価文献 1
本文献では、ワクチンの接種歴がある出血性脳卒中患者 (n=3) の脳組織および脳大動脈 (スパイクタンパク質陽性・ヌクレオカプシドタンパク質陰性）におけるコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの検出に ISH 法が用いられていた。メソッド記載があり、重要項目として設定したプローブ情報も記載されていた。ハイブリダイゼーション温度に関する記載は本文中にはないものの、使用キットの説明書に記載があるため、情報があるものとして扱った。本文献では、陽性対照プローブ（peptidylprolyl Isomerase B [NM_000942.4]）と陰性対象プローブ（bacterial dihydrodipicolinate reductase [EF191515]）を用いた ISH 解析は実施していたものの、陽性対照検体と陰性対照検体の測定は未実施であった。また、定量解析やバリデーション試験等も実施されていなかった。以上より、本 ISH をランク C2 と評価した。

本文献では、コロナウイルスのスパイクタンパク質をコードする mRNA を標的とするプローブ（ RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S #848561 (NC_045512.2; 21631 - 23303)）と、ワクチン mRNA に最適化したプローブ（RNAscope™ Probe-V-SARS-CoV-2-S-opt-O2 #1215391 (OK120841.1:49-3819; 1899 - 2874)）の 2 種類のプローブが組織試料におけるワクチン mRNA の検出に利用された。各プローブの標的領域は製造元より開示されているものの、その標的塩基配列の範囲はいずれも 1,000 塩基超であった。さらに、プローブの具体的な塩基配列は未公表であり、かつ標的領域が広範であることから、標的分子への正確な結合部位を特定し、プローブの特異性を評価することは困難と判断した。

ISH 解析の結果、免疫染色においてスパイクタンパク質の発現が認められたすべての脳組織および脳大動脈検体において、検討した両方の ISH プローブが陽性反応を示した。これに対して筆者らは以下のように考察している。「本研究において、ISH はワクチン由来 mRNA および SARS-CoV-2 感染由来 mRNA の双方を検出した。この結果は、SARS-CoV-2 ワクチン接種歴を有するものの、ウイルス感染歴が確認されていない患者において観察されたスパイクタンパク質陽性染色が、ワクチンのみに起因すると断定することはできないことを示唆している。注目すべきことに、ヌクレオカプシドタンパク質は全症例で一貫して陰性であり、この結果は本 ISH が高い感度を有し、未認識の無症候性感染を反映している可能性のある微量の mRNA をも検出し得ることを支持している。これらの所見は、スパイクタンパク質の存在をワクチン由来のみと解釈する際には慎重さが求められることを強調している。」

一方後述の評価文献 3 では、RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S（#848561）がワクチン由来 mRNA の検出に使用されている実例も存在する。このことを踏まえると、同プローブのワクチン由来 mRNA に対する交差反応性が明確にされない限り、このプローブを用いた ISH の結果を適切に解釈することは困難であると我々は考える。

評価文献 2

本文献では、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの被接種者（n=20）の剖検から採取された両側の腋窩リンパ節および縦隔リンパ節、左右心室、肝臓、および脾臓におけるワクチン mRNA の定量に RT-qPCR が用いられていた。メソッド記載があり、重要項目として設定した陽性コントロール（ワクチン配列の 2 本鎖 DNA 断片)、陰性コントロール（Non-template control)、プライマー情報、プローブ情報も記載されていた。また、選択性評価として陰性対照（ワクチン非接種剖検検体）の測定も行われていた。本手法では検量線を用いた定量解析（定量下限; BNT162b2: 6 ssRNA copies/reaction; mRNA-1273: 11 ssRNA copies/reaction）が実施された。バリデーション項目として、陽性検体について RT-qPCR の標的領域とは異なる領域を対象に、ワクチン mRNA に対する別プライマーを用いた PCR 増幅の確認ならびに増幅産物の塩基配列確認を実施した。以上より、本分析法をランク A と評価した。

本手法では、BNT162b2 の mRNA 配列の central helix 領域、mRNA-1273 の mRNA 配列の heptad repeat2 領域に対するプライマー設計がなされていた。測定に用いる相補 DNA（cDNA）は、ランダムプライマーおよび $Oligo(dT)_{15}$プライマーを用い、市販の逆転写キットにより合成された。設計した各プライマーセットについて、陽性および陰性コントロールを用いた SYBR Green アッセイを実施し、増幅産物の融解曲線解析により最適なプライマーセットを選択して定量解析に使用した。BNT162b2 および mRNA-1273 のプライマー・プローブセットを用いた際の増幅効率はそれぞれ 97.7%と 97.2%であり、良好な値を示した。

本文献では、SARS-CoV-2 既感染患者をワクチン接種群およびワクチン非接種群の双方から除外しているのに加え、使用した剖検試料において

SARS-CoV-2 E 遺伝子の陰性検出を確認していることから、検出された mRNA は SARS-CoV-2 感染由来ではないと考えられる。

本手法を用いた解析の結果、ワクチン接種後 30 日以内に死亡した患者の大多数において腋窩リンパ節でワクチン mRNA が検出され、また同群の一部の患者では心筋においても検出された。一方、接種後 30 日以上経過して死亡した患者では腋窩リンパ節における検出は認められず、縦隔リンパ節、脾臓、および肝臓ではいずれの群においてもワクチン mRNA は検出されなかった。

評価文献 3

本文献では、過去に治療歴のない BNT162b2 ワクチン 2 回接種 12 日後に自己免疫性肝炎様肝炎を発症した女性のホルマリン固定パラフィン包埋組織におけるワクチン mRNA の検出に ISH が用いられていた。メソッド記載があり、重要項目として設定したプローブ情報も記載されていた。ハイブリダイゼーション温度に関する記載は本文中にはないものの、使用キットの説明書に記載があるため、情報があるものとして扱った。本文献では、選択性の評価として、陽性対照（重度の COVID-19 と診断された剖検肝組織 1 例）と陰性対照（自己免疫性肝炎 2 例）の測定が実施されていた。一方、定量解析やバリデーション試験等は実施されていなかった。以上より、本 ISH をランク C1 と評価した。

本解析では、評価文献 1 と同じ SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質をコードする mRNA を標的とするプローブ（RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S #848561（NC_045512.2; 21631 - 23303））が使用された。

当該患者由来試料においてサイトメガロウイルス、A 型・B 型・C 型肝炎ウイルス、EB ウイルス、および SARS-CoV-2 の陰性を確認した。ISH による染色の結果、当該患者の肝組織において、陽性対照（COVID-19 重症患者）と同程度の強い染色像が認められた。一方、陰性対照である自己免疫性肝炎患者では染色像は認められなかった。

本文献の解析対象検体は SARS-CoV-2 に感染していないにも関わらず、RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S（#848561）を用いた ISH で陽性反応が認められた。このことから、同プローブは SARS-CoV-2 感染由来のスパイクタンパク質 mRNA のみでなく、BNT162b2 由来ワクチン mRNA に対しても交差反応性を有する可能性が示唆される。この知見は、評価文献 1 において同プローブの解釈に慎重さが求められると指摘した根拠を支持するものである。

評価文献 4

本文献では、ワクチン接種歴があり、かつスパイクタンパク質の免疫染色が陽性である胎盤組織(n=9, うち 3 例がヌクレオカプシド陽性)における COVID-19 スパイクタンパク質遺伝子及びワクチン由来 mRNA の検出に ISH が利用された。メソッド記載があり、重要項目として設定したプローブ情報も記載されていた。ハイブリダイゼーション温度に関する記載は本文中にはないものの、使用キットの説明書に記載があるため、情報があるものとして扱った。一方で、選択性の評価、定量解析、ならびにバリデーション試験等は実施されていなかった。以上より、本 ISH をランク C2 と評価した。

本解析では、コロナウイルスのスパイクタンパク質をコードする mRNA を標的とするプローブ（RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S #848561 (NC_045512.2; 21631 - 23303)）が利用されていた。また、ワクチン mRNA の検出のために、BNT162b2 用には RNAscope™ Probe-S-encoding-BNT162b2-C1 #1104241-C1（PP544445.1; 3625 - 4667), mRNA-1273 用には RNAscope™ Probe-S-encoding-mRNA-1273-C1 #1104251-C1（OK120841.1; 44 - 1431)が利用された。本分析試料中には SARS-CoV-2 感染歴のある患者由来検体が含まれるため、解析結果の解釈は慎重に行う必要があると考えられる。

本文献の解析の結果、スパイクタンパク質が陽性であった 9 例のうち、コロナウイルス用プローブである RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S の陽性検体は認められなかった。一方、SARS-CoV-2 感染歴を有し、スパイクタンパク質およびヌクレオカプシドがいずれも陽性であった BNT162b2 接種歴のある胎盤組織 1 例において、RNAscope™ Probe-S-encoding-BNT162b2-C1 (#1104241-C1) が陽性を示した。ただし、当該検体は SARS-CoV-2 感染歴を有することから、陽性シグナルの由来（ワクチン由来または SARS-CoV-2 感染由来）を明確に区別することは困難である。mRNA-1273 については、SARS-CoV-2 感染歴がなく、スパイクタンパク質陽性かつヌクレオカプシド陰性の検体において、RNAscope™ Probe-S-encoding-mRNA-1273-C1（#1104251-C1）が陽性を示す例が 1 例存在した。

BNT162b2 ワクチン mRNA 陽性検体において RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S (#848561) が陰性を示した結果は、同プローブがワクチン由来 mRNA に対して交差反応性を示した評価文献 3 の知見と矛盾する。評価文献 1 の考察に記載したとおり、プローブの特異性に関する追加検証が必要と考えられる。ISH 解析における染色結果の信頼性を確保するため、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質をコードする mRNA あるいはワクチン mRNA に特異的なプライマーセットを用いた核酸増幅法による検証試験の並行実施が推奨される。

評価文献 5

本文献では、新型コロナワクチンを 1 回または 2 回接種した妊婦患者（n=48）例のうち、ワクチン接種から 2〜7 日で分娩した 6 例の胎盤を対象として、ワクチン由来 mRNA の検出に ISH が利用された。メソッド記載があり、重要項目として設定したプローブ情報も記載されていた。ハイブリダイゼーション温度に関する記載は本文中にはないものの、使用キットの説明書に記載があるため、情報があるものとして扱った。本文献では、選択性の評価として陽性対照（SARS-CoV-2 陽性胎盤組織 1 例）の測定は実施されていたものの、陰性対照の測定は実施されていなかった（なお、スパイクタンパク質の免疫染色解析においては陰性対照の測定が実施されていた)。一方、定量解析やバリデーション試験等は実施されていなかった。以上より、本 ISH をランク C2 と評価した。

本分析法では RNAscope™2.5 LS Probe-V-nCoV2019-S #848568（NC_045512.2; 21631 - 23303)がワクチン mRNA の検出用プローブとして利用されていた。本プローブは型番が異なる（#848568）ものの、評価文献 1、3、および 4 で使用された RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S（#848561）と同一の標的認識領域（NC_045512.2; 21631–23303）を有する。本文献では、出産前に SARS-CoV-2 陽性あるいは COVID-19 症状を有する患者は解析から除外されているため、ISH で検出された mRNA は SARS-CoV-2 感染由来ではない可能性が高いと考えられる。

本文献の解析の結果、陽性対照として使用した SARS-CoV-2 感染患者由来胎盤組織では明確な染色像が認められた。一方、ワクチン接種を受けた患者由来のすべての検体では染色が陰性であった。ワクチン由来 mRNA の陰性結果の妥当性を確認するためには、解析した組織切片あるいはその近傍切片に対する核酸増幅法等の独立した検出手法による検証が不可欠であると考える。

評価文献 6

本文献では、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの接種者(n=2)の胎盤、臍帯血、ならびに母体血を対象として、ワクチン由来 mRNA の検出に ISH が、定量に ddPCR が用いられていた。ddPCR のメソッドは評価文献 9 を引用しており、重要項目として設定した陽性コントロール、陰性コントロール、プライマー情報、およびプローブ情報は本文献内に記載されていなかった。プライマー・プローブ情報については評価文献 9 から情報を抽出し、表 1 に記載した。また、

選択性評価として陰性対照（ワクチン非接種検体）の測定が行われていた。本文献で使用した ddPCR では、デジタル PCR の原理に基づく絶対定量が採用されており、陽性ドロップレット数 3 以上をもって陽性と判定していた。バリデーションは未実施であった。以上より、本文献で用いられた ddPCR をランク D と評価した。

一方、ISH については、プローブ情報が文献内に記載されているものの、その他の方法についての記載がなかった。選択性の評価として、陽性対照（ワクチン添加した胎盤組織切片）と陰性対照（SARS-CoV-2 非感染およびワクチン非接種検体）の測定を実施していた（結果は非公開）。以上より、本文献で用いられた ISH をランク E と評価した。

本文献では、BNT162b2 および mRNA-1273 に特異的なプライマーを用いた定量解析が実施された（特異性に関しては評価文献 9 を参照）。また、ISH においても、評価文献 4 と同一の各 mRNA ワクチン用に設計された ISH プローブを解析に利用していた。本文献はリサーチレター形式であり、分析法の詳細な記載は不十分であったものの、既報において使用実績のあるワクチン mRNA 分析法が採用されていた。

本文献の ISH 解析の結果、被験者 2 名の胎盤の絨毛間質においてワクチン mRNA が主に検出されることが示された。また、ddPCR 解析においても、両者の胎盤組織で陽性の結果が示された。ワクチン mRNA 陽性患者の母体血及び臍帯血を用いた ddPCR 解析を行ったところ、両検体とも陽性となった。また、検出された mRNA の完全性（integrity）を評価するため、標的領域が約 1.5 kbp 離れた 2 種類の異なるプライマーセットを用いて ddPCR 解析を実施した。両プライマーセットに対して陽性を示したドロップレット（ダブルポジティブドロップレット）の割合は、母体血で 85%、臍帯血では 13%であった。

評価文献 7

本文献では、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの接種者 (n=7) の乳汁とそのサブ分画のワクチン mRNA の定量に RT-qPCR が用いられていた。メソッド記載があり、重要項目として設定した陽性コントロール（ワクチン非接種時の乳汁にコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンを添加した試料）、陰性コントロール（Non-template control）、およびプライマー情報が記載されていた。なお、本手法では核酸増幅の検出に蛍光プローブではなくインターカレーター色素を使用しているため、プローブ情報は評価対象外とした。また、選択性評価として陽性対照（コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンを添加した乳汁）と陰性対照（ワクチン接種前の乳汁）の測定も行われていた。本手法では検量線を用いた定量解析（BNT162b2: 0.195 pg/well – 200 pg/well; mRNA-1273: 1.5 pg/well – 200 pg/well）が実施された。バリデーション項目として、乳汁試料の凍結融解が測定値に与える影響が評価された。以上より、本分析法をランク A と評価した。

本手法では、BNT162b2 および mRNA-1273 に対して共通のプライマー設計がなされていた。我々が独自にプライマー配列を確認したところ、BNT162b2 に対して完全に相補的な配列を有することが明らかとなった。一方で、mRNA-1273 に対して、リバースプライマーは完全相補であったが、フォワードプライマーは 3'末端から 4 番目の塩基にミスマッチを有していた。3'末端近傍のミスマッチは PCR 増幅効率に影響する可能性があるものの、本文献中では BNT162b2 のみでなく、mRNA-1273 に対しても良好な検量線が得られていた。また、乳汁を 1 回凍結融解した際の安定性評価を行ったところ、測定への悪影響は認められなかった。さらに、測定に使用する cDNA は、ランダムプライマー、Oligo(dT)プライマー、および市販の逆転写キットにより合成された。以上のことから、本手法は信頼性の高い定量値を提供するものと考えられた。

本分析法を用いた測定の結果、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン接種後 4～48 時間

に採取された乳汁の脂肪画分や上清画分中においてワクチン mRNA が検出されないことが示された。

評価文献 8

本文献では、健康な授乳中の女性（n=11）の乳汁およびそのサブ分画の mRNA ワクチンの定量に RT-qPCR が用いられていた。メソッド記載はあり、重要項目として設定した陽性コントロール（コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン）の記載はあった。しかしながら、陰性コントロール、プライマー情報、プローブ情報の詳細な記載はなされていなかった。選択性評価として陽性対照（コロナウイルス(SARS-COV-2)RNA ワクチンを添加した乳汁）と陰性対照（ワクチン接種前に回収した乳汁）の測定が行われていた。本文献で使用した RT-qPCR では検量線を用いた定量解析（1 – 100,000 pg/mL）が実施された。既知量のコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンをスパイクした乳汁を用いた分析法のバリデーションを実施したとの記載はあるものの、評価内容およびその結果の詳細は記載されていなかった。以上より、本分析法をランク D と評価した。

本文献では、過去に報告された mRNA-1273 および BNT162b2 の推定配列をもとに、各ワクチン mRNA の 2 つの領域を標的とする 2 セットのプライマー・プローブが設計され、解析に利用された。しかしながら、参照配列情報ならびにプライマー・プローブ情報のメソッド中での詳述は行われておらず、当該情報は入手不能であった。加えて、設計されたプライマーがワクチン由来 mRNA と SARS-CoV-2 感染由来スパイクタンパク質をコードする mRNA とを識別できるかに関する検証結果も記載されていなかった。このことから、本文献ではワクチン mRNA を標的とするプライマーセットを用いた解析が実施されたものの、そのプライマー特異性の根拠は不十分であると判断した。

測定に使用する cDNA は、ランダムプライマーおよび市販の逆転写キットにより合成された。

本手法を用いた解析の結果、11 名の参加者のうち 5 名において、接種後最長 45 時間までに採取された乳汁からワクチン mRNA が検出された。一方、ワクチン非接種者の乳汁およびワクチン接種後 48 時間以降に採取された乳汁ではワクチン mRNA は検出されなかった。また、全乳から精製した脂肪画分および細胞画分においてもワクチン mRNA は検出されなかった。また、全乳においてワクチン由来 mRNA が陽性であった検体では、乳汁中の細胞外膜小胞においてワクチン mRNA の濃縮が認められることが明らかにされた。

評価文献 9

本文献では、出産後女性（n=13）の乳汁とそのサブ分画のコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの定量に ddPCR が用いられていた。メソッド記載はあり、重要項目として設定した陽性コントロール（コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン）、陰性コントロール（Non-template control)、プライマー情報、プローブ情報も記載されていた。また、選択性評価として陽性対照(コロナウイルス(SARS-CoV-2) RNA ワクチンを添加した乳汁）と陰性対照（COVID-19 流行前に回収した乳汁）の測定も行われていた。本文献で使用した ddPCR では、デジタル PCR の原理に基づく絶対定量が採用されており、陽性ドロップレット数 3 以上をもって陽性と判定していた。バリデーション項目として、プライマーの特異性が実験的に評価された。以上より、本分析法をランク A と評価した。

本文献では、mRNA-1273 および BNT162b2 について、それぞれ異なる領域を増幅する 2 セットのプライマー・プローブセットを設計し、解析に使用した。また、設計したプライマー・プローブセットが SARS-CoV-2 感染由来 mRNA を増幅しないことを実験的に検証した。以上のことから、本文献では SARS-CoV-2 感染由来 mRNA との交差反応性のないコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン特異的な分析法が使用されていたと

判断した。加えて、解析対象検体についても、SARS-CoV-2 鼻腔スワブ検査により SARS-CoV-2 陰性であることが確認されていた。

測定に使用する cDNA は、ランダムプライマーおよび市販の逆転写キットにより合成された。

本手法を用いた解析により、ワクチン接種後 3～45時間に採取された乳汁試料においてワクチン mRNA が検出され、接種後 48 時間以降の検体ではすべて陰性であった。また、ワクチン由来 mRNA が細胞外膜小胞において濃縮されること、さらに当該小胞内には部分的に完全長の構造を保持した mRNA が存在することが明らかにされた。

評価文献 10

本文献では、BNT162b2 を接種した健常人（n=17）の血漿および白血球におけるワクチンの定量に RT-qPCR が用いられていた。メソッド記載はあり、重要項目として設定した陽性コントロール（mRNA ワクチンおよび mRNA ワクチンの cDNA に相当する一本鎖合成 DNA）、陰性コントロール（水）、プライマー情報も記載されていた。一方で、本論文で利用した RT-qPCR では、核酸増幅の検出に蛍光プローブは使用しておらず、インターカレーター色素を利用していた。選択性評価では、SARS-CoV-2 感染歴がなく、かつコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの接種歴のない健常人由来試料が使用された。また、本文献では検量線を用いた定量解析（10 – 10^7 コピー数/反応）が実施された。本文献では定量法のバリデーション試験は実施されていなかった。以上より、本分析法をランク B と評価した。

本文献では、公開されている BNT162b2 配列情報 BNT162b2 の配列（https://github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273）を参照し、SARS-CoV-2 感染由来スパイクタンパク質をコードする mRNA との交差反応性を排除した BNT162b2 特異的なプライマーを設計し、測定に使用した。また、設計したプライマーについて BLAST 検索を実施し、新型コロナウイルス配列ならびにヒトゲノムおよびその転写産物に対して非特異的増幅産物が生じないことを確認した。さらに、上述の陽性コントロールに加え、ワクチン非接種健常人由来の白血球ゲノム DNA、cDNA、血漿 cDNA、および total RNA を用いた選択性確認を実施した。これらの検討結果より、本文献では BNT162b2 特異的な RT-qPCR プライマーが検体測定で使用されたと考えられる。加えて、解析対象検体についても、SARS-CoV-2 感染歴がないことが確認されていた。

測定に使用する cDNA は、ランダムプライマー、Oligo(dT)$_{15}$プライマー、および市販の逆転写キットにより合成された。

本手法を用いた解析により、BNT162b2 ワクチン mRNA は血漿中においてワクチン接種後 15 日目まで一貫して検出されることが示された。一方、白血球画分においては接種後 24 時間以降から検出頻度が低下することが示された。

評価文献 11

本文献では、C 型肝炎（HCV）患者（n=108）の血中におけるコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの検出に RNA シークエンス法が用いられていた。メソッド記載はあり、重要項目として設定したライブラリー合成キットおよび解析参照配列情報も記載されていた。また、選択性評価として陰性対照（陰性検体[詳細不明]、HCV 陽性検体）の測定も行われていた。一方で、本文献では、検出されたワクチン由来 RNA の定量的評価は行われていなかった。以上より、本分析法をランク C1 と評価した。

本文献では、HCV のモニタリングのために回収した血漿試料に対して RNA シークエンス法が実施され、低品質リードおよびヒトゲノム由来リードを除外した後、残存リードをアセンブルし、公開されている BNT162b2 および mRNA-1273 のワクチン配列（https://github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-

mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273)とのマッピング解析を行うことにより、血中に存在するワクチン由来 RNA を直接検出した。血中 RNA はヌクレアーゼによる分解を受けやすいことが知られているため、本文献では RNA シークエンス解析用の cDNA 合成に、断片化した核酸にも適用可能なキットが使用されていた。

本手法により、108 名中 10 名 (9.3%) の患者試料においてワクチン由来配列が検出され、ワクチン接種後最長 28 日まで血中に残存していることが確認された。

D．結論

本研究では、組織および体液においてコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンを検出した文献として抽出された 11 報を対象として、分析法の信頼性の観点からの評価を行い、各分析法が検出可能な分析対象に関する情報を整理した。

RNA シークエンス法を用いた解析については、利用実績は限られているものの、生体試料におけるワクチン由来 mRNA の残存およびその完全性を評価するうえで有用な手法である。核酸分解を受けやすい試料を解析に使用する場合は、断片化した RNA からも cDNA を合成可能なライブラリー合成キットの使用が推奨される。

一方、ISH については、組織試料におけるワクチン由来 RNA の解析にのみ使用されており、すべての文献において市販の検出プローブが利用されていた。これら市販プローブについては、標的分子のデータベース情報は提供されているものの、標的塩基配列の範囲が 1,000 塩基超にわたっており、具体的な結合部位およびプローブの塩基配列は製造元より公開されていない。したがって、SARS-CoV-2 感染由来 RNA とコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン由来 RNA とを正確に識別できるか否かを判断することは困難である。そのため、ISH を用いてコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの組織残存を信頼性高く解析するためには、解析前に SARS-CoV-2 感染検査を実施することに加え、SARS-CoV-2 陽性検体(陽性対照)および COVID-19 流行前検体(陰性対照)を同時に用いた解析を実施することが重要であると考える。加えて、ISH 解析を実施した組織切片あるいはその近傍組織切片を対象とした核酸増幅法による検証試験の実施も必要であると考える。

最後に、本研究で調査した PCR を用いた核酸増幅法では、コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチン由来 mRNA に特異的なプライマーが使用されており、組織および体液試料の両方において信頼性の高い定量結果が得られていた。今後は、これらの文献において認められた組織・体液中のコロナウイルス(SARS-CoV-2)RNA ワクチンの残存量が、スパイクタンパク質の発現および mRNA ワクチンの安全性に与える影響についてのさらなる解析が必要であると考える。

E．研究発表

該当なし

F．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

G. 引用文献

1. Ioannidis JPA, Pezzullo AM, Cristiano A, Boccia S: Global Estimates of Lives and Life-Years Saved by COVID-19 Vaccination During 2020-2024. JAMA Health Forum, 6, e252223 (2025).
2. National Academies of Sciences E, and Medicine. Evidence Review of the Adverse Effects of COVID-19 Vaccination and Intramuscular Vaccine Administration. (Rosenberg D, Kumova OK, Stratton K, Bass AR ed.)^eds.), Washington (DC), (2024).
3. Ogata AF, Cheng CA, Desjardins M, Senussi Y, Sherman AC, Powell M, Novack L, Von S, Li X, Baden LR, Walt DR: Circulating Severe

Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. Clin Infect Dis, 74, 715-718 (2022).
4. Yonker LM, Swank Z, Bartsch YC, Burns MD, Kane A, Boribong BP, Davis JP, Loiselle M, Novak T, Senussi Y, Cheng CA, Burgess E, Edlow AG, Chou J, Dionne A, Balaguru D, Lahoud-Rahme M, Arditi M, Julg B, Randolph AG, Alter G, Fasano A, Walt DR: Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. Circulation, 147, 867-876 (2023).
5. Fertig TE, Chitoiu L, Marta DS, Ionescu VS, Cismasiu VB, Radu E, Angheluta G, Dobre M, Serbanescu A, Hinescu ME, Gherghiceanu M: Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. Biomedicines, 10, (2022).

Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. Clin Infect Dis, 74, 715-718 (2022).
4. Yonker LM, Swank Z, Bartsch YC, Burns MD, Kane A, Boribong BP, Davis JP, Loiselle M, Novak T, Senussi Y, Cheng CA, Burgess E, Edlow AG, Chou J, Dionne A, Balaguru D, Lahoud-Rahme M, Arditi M, Julg B, Randolph AG, Alter G, Fasano A, Walt DR: Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. Circulation, 147, 867-876 (2023).
5. Fertig TE, Chitoiu L, Marta DS, Ionescu VS, Cismasiu VB, Radu E, Angheluta G, Dobre M, Serbanescu A, Hinescu ME, Gherghiceanu M: Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. Biomedicines, 10, (2022).

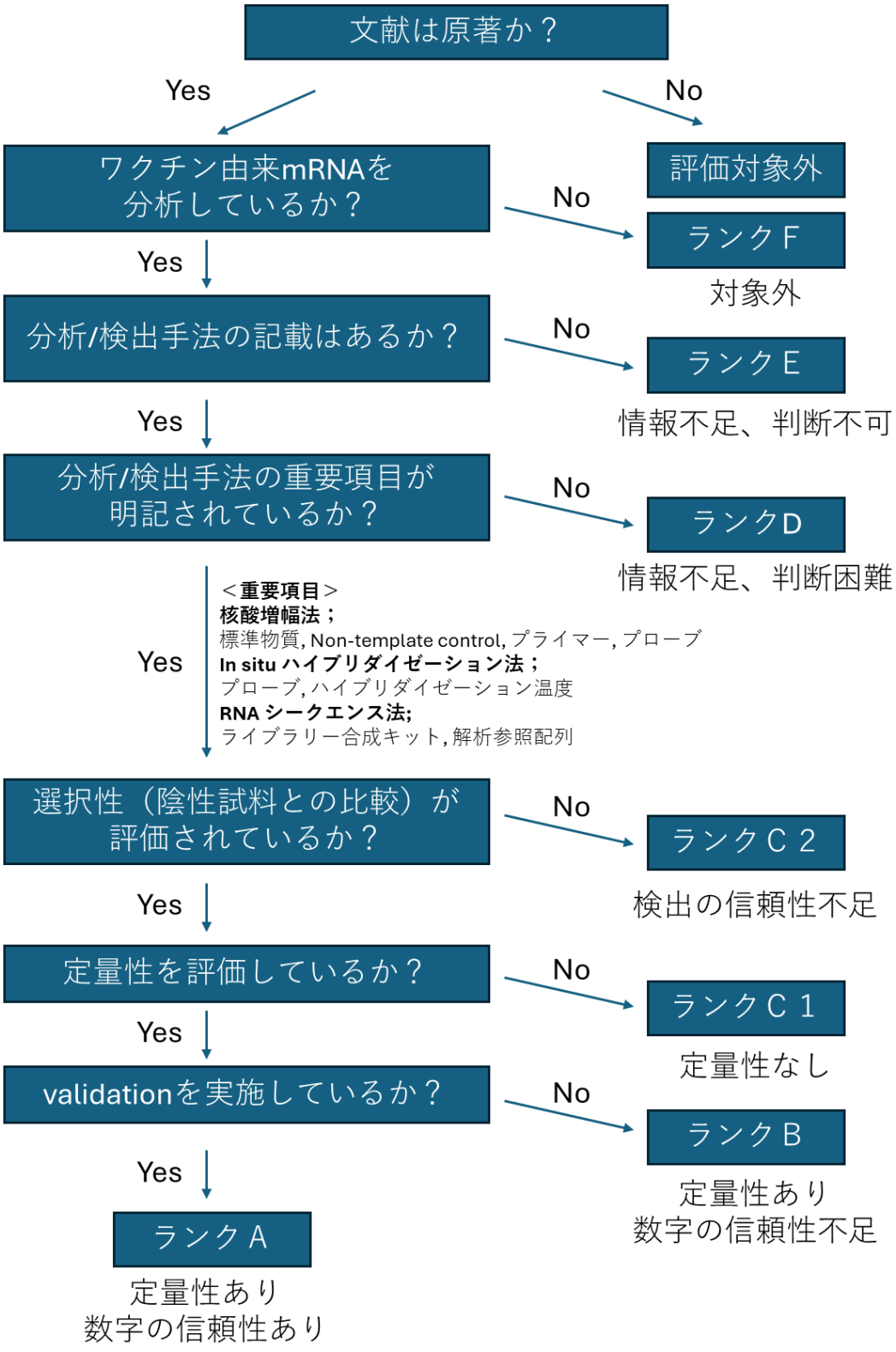


図 1. 分析法評価のフローチャート

表1. 組織においてCOVID-19 mRNA ワクチンを検出した文献

文献番号	評価組織	評価手法*	標的分子	アクセッション番号	RT-qPCR用プライマー・プローブ	cDNA合成キット（販売元）	ISHプローブ販売元	ISHプローブカタログ番号（標的領域）	陽性対照	陰性対照	バリデーション	ランク#
1	脳	ISH	mRNA ワクチン	OK120841.1:49-3819	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#1215391 / RNAscope™ Probe-V-SARS-CoV-2-S-opt-O2 (1899 - 2874)	未測定	未測定	-	C2
			新型コロナウイルス（武漢株）	NC_045512.2	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#848561 / RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S (21631 - 23303)				
			ペプチジルプロピルイソメラーゼ B (陽性コントロールプローブ)	NM_000942.4	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#313901 / RNAscope™ Positive Control Probe-Hs-PPIB (139 - 989)				
			細菌由来ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (陰性コントロールプローブ)	EF191515	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#310043 / RNAscope™ Negative Control Probe-DapB (139 - 989)				
2	心臓	RT-qPCR	BNT162b2	情報なし	Forward: 5'-GGTGCAGATCGACAGACTGA-3' Reverse: 5'-GGGAAGCTCATCAGGTGGTA-3' Probe: 5'-56-FAM/TACGTGACC/ZEN/CAGCAGCTGATCAGAGCC/3IABkFQ-3'	Superscript III (Invitrogen) with random and oligo (dT15) primers (Promega)	-	-	BNT162b2およびmRNA-1273ワクチン配列由来の二本鎖DNA断片	ワクチン非接種者の剖検例	陽性対照領域外を標的としたPCR反応および増幅産物のDNAシーケンス解析	A
			mRNA-1273	情報なし	Forward: 5'-AGCTGGACAGCTTCAAGGAG-3' Reverse: 5'-GGCTCTCGTTCAGGTTCTTG-3' Probe: 5'-56-FAM/ACGCCAGCG/ZEN/TGGTGAACATCC/3IABkFQ-3'							
3	肝臓	ISH	BNT162b2 (新型コロナウイルス（武漢株）標的プローブを利用)	NC_045512.2	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#848561 / RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S (21631 - 23303)	重症COVID-19と診断された患者の剖検肝組織	自己免疫性肝炎患者の肝組織	-	C1
4	胎盤	ISH	新型コロナウイルス（武漢株）	NC_045512.2	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#848561-C1 / RNAscope™ Probe-V-nCoV2019-S Wuhan (21631 - 23303)	未測定	未測定	-	C2
			BNT162b2	PP544445.1	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#1104241-C1 / RNAscope™ Probe-S-encoding-BNT162b2-C1 (3625 - 4667)				
			mRNA-1273	OK120841.1	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#1104251-C1 / RNAscope™ Probe-S-encoding-mRNA-1273-C1 (44 - 1431)				
5	胎盤	ISH	BNT162b2およびmRNA-1273 (新型コロナウイルス（武漢株）標的プローブを利用)	NC_045512.2	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#848568 / RNAscope™2.5 LS Probe-V-nCoV2019-S (21631 - 23303)	SARS-CoV-2感染者の胎盤組織	未測定	-	C2
6	胎盤	ddPCR$	BNT162b2	情報なし	Forward 1:5'-CAGCTACCAGACACAGACAAA-3' Reverse 1: 5'-GCGATAGAGTTGTTGGAGTAGG-3' Forward 2: 5'-GTGACACAGCGGAACTTCTA-3' Reverse 2: 5'-GGGTCGTACACGGTATTGTT-3' Probe 1: 5'-/56-FAM/AGCCAGAGC/ZEN/ATCATTGCCTACACA/3IBkFQ/-3' Probe 2: 5'-/56-FAM/TCATCACCA/ZEN/CCGACAACACCTTCG/3IBkFQ/-3'	High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with random primers (Thermo Fisher Scientific)	-	-	情報なし	ワクチン非接種試料	-	D
			mRNA-1273	情報なし	Forward 1:5'-GACCTTCCTGCTGAAGTACAA-3' Reverse 1: 5'-AAGTTGCTGGTCTGGTAGATG-3' Forward 2: 5'-GTGGAGCAGGACAAGAACA-3' Reverse 2: 5'-AGGATCTGGCTGAAGTTGAAG-3' Probe 1: 5'-/56-FAM/ACCAAGTGC/ZEN/ACCCTGAAGAGCTTC/3IABkFQ/-3' Probe 2-1: 5'-/56-FAM/CGCCCAGGT/ZEN/GAAGCAGATCTACAA/3IBkFQ/-3' Probe 2-2: 5'-/56-HEX/CGCCCAGGT/ZEN/GAAGCAGATCTACAA/3IBkFQ/-3'							
		ISH	BNT162b2	PP544445.1	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#1104241-C1 / RNAscope Probe-S-encoding-BNT-162b2-C1 (3625 - 4667)	ワクチンをスパイクした胎盤外植片	パンデミック前の、未接種かつ未感染者由来胎盤組織	-	E
			mRNA-1273	OK120841.1	-	-	Advanced Cell Diagnostics	#1104251-C1 / RNAscope Probe-S-encoding-mRNA-1273-C1 (44 - 1431)				

*ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; ISH, in situ hybridization; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR

$分析手法の引用元である評価文献9より分析条件を抜粋した。

#ランクA：分析法の妥当性が実証され、定量測定法として十分にバリデートされている、ランク B：定量測定は可能であるが、十分なバリデーションが実施されていない、ランク C1：選択性は検証されているものの、定量測定およびバリデーションが不十分、ランク C2：選択性がない定性的方法、ランク D：分析手法に関する記載が不十分、ランク E：分析手法に関する記載が全くない。

表2. 体液においてCOVID-19 mRNA ワクチンを検出した文献

文献番号	評価体液	評価手法*	標的分子 (アクセッション番号)	プライマー	プローブ	cDNA合成キット （販売元）	陽性対照	陰性対照	バリデーション	ランク#
7	乳汁	RT-qPCR	mRNA-1273 vaccine BNT162b2 vaccine (情報なし)	Forward: 5'-AACGCCACCAACGTGGTCATC-3' Reverse: 5'-GTTGTTGGCGCTGCTGTACAC-3' (a shared primer set for both mRNA vaccines)	未使用	qScript cDNA synthesis kit with oligo (dT) and random primers (Quantabio)	ワクチンをスパイクした非接種者由来乳汁	非接種者由来乳汁	凍結融解安定性	A
8	乳汁	RT-qPCR	mRNA-1273 vaccine BNT162b2 vaccine (情報なし)	情報なし	情報なし	High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with random primers (Thermo Fisher Scientific)	臨床使用後に残存したワクチン、ワクチンスパイクしたCOVID-19流行前乳汁	非接種者由来乳汁	-	D
9	乳汁	ddPCR	mRNA-1273 vaccine (情報なし)	Forward 1:5'-GACCTTCCTGCTGAAGTACAA-3' Reverse 1: 5'-AAGTTGCTGGTCTGGTAGATG-3' Forward 2: 5'-GTGGAGCAGGACAAGAACA-3' Reverse 2: 5'-AGGATCTGGCTGAAGTTGAAG-3'	Probe 1: 5'-/56-FAM/ACCAAGTGC/ZEN/ACCCTGAAGAGCTTC/3IABkFQ/-3' Probe 2-1: 5'-/56-FAM/CGCCCAGGT/ZEN/GAAGCAGATCTACAA/3IBkFQ/-3' Probe 2-2: 5'-/56-HEX/CGCCCAGGT/ZEN/GAAGCAGATCTACAA/3IBkFQ/-3'	High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit with random primers (Thermo Fisher Scientific)	ワクチンをスパイクした乳汁	COVID-19流行前の乳汁、非接種者由来乳汁	野生型SARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードするmRNAに対する特異性	A
			BNT162b2 vaccine (情報なし)	Forward 1:5'-CAGCTACCAGACACAGACAAA-3' Reverse 1: 5'-GCGATAGAGTTGTTGGAGTAGG-3' Forward 2: 5'-GTGACACAGCGGAACTTCTA-3' Reverse 2: 5'-GGGTCGTACACGGTATTGTT-3'	Probe 1: 5'-/56-FAM/AGCCAGAGC/ZEN/ATCATTGCCTACACA/3IBkFQ/-3' Probe 2: 5'-/56-FAM/TCATCACCA/ZEN/CCGACAACACCTTCG/3IBkFQ/-3'					
10	血液	RT-qPCR	BNT162b2 vaccine[$] (Not specified)	Fortward: 5′-GTGGATCTGCCCATCGGCATC-3' Reverse: 5′-GTCCATCCGCTGCTGCTATCG-3'	未使用	GoScript™ ReverseTranscription System with random and oligo(dT15) primers (Promega)	ワクチンmRNA由来の合成一本鎖DNA	ワクチン未接種かつSARS-CoV-2未感染の健常ボランティア	-	B
11	血液	RNA sequencing	mRNA-1273 vaccine[$] (OK120840) BNT162b2 vaccine[$] (OK120840)	-	-	NEBNext Ultra II directional RNA library prep kit (New England BioLabs)	情報なし	陰性対照（詳細不明）、HCV陽性患者	-	C1

*ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR

#ランクA：分析法の妥当性が実証され、定量測定法として十分にバリデートされている、ランク B：定量測定は可能であるが、十分なバリデーションが実施されていない、ランク C1：選択性は検証されているものの、定量測定およびバリデーションが不十分、ランク C2：選択性がない定性的方法、ランク D：分析手法に関する記載が不十分、ランク E：分析手法に関する記載が全くない。

$The Assemblies‐of‐putative‐SARS‐CoV2‐spike‐encoding‐mRNA‐sequences‐for‐vaccines‐BNT‐162b2‐and‐mRNA‐1273 (https://github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273) を、RT-qPCRまたはRNA配列解析に使用した。