

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20768

研究課題名（和文）COVID-19重症化を予防する中和活性レベルの特定とワクチン接種計画への展開

研究課題名（英文）Identification of neutralizing activity levels to prevent COVID-19 progression and expansion of vaccination programs

研究代表者

川筋 仁史（Kawasuji, Hitoshi）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：40957916

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、COVID-19感染を予防し得る中和活性レベルの推定と中和活性多検体処理技術の構築である。COVID-19ワクチン接種後抗体追跡調査では、ワクチン接種後のブレイクスルー感染者と非感染者の感染前中和活性を比較することで、血清200倍希釈で中和活性が50%を下回った場合にブレイクスルー感染を引き起こすリスクが高くなることを明らかにした。また、指先全血を濾紙に吸収させた乾燥血液を用いて中和活性を評価できることを見出し、時間および温度安定性を確認するなど、採取から測定までの一連のプロセス最適化を行い、成果公開を行なった（Kawasuji, Vaccine 2024）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、COVID-19感染リスクが増加する中和活性レベルが明らかになるとともに、個人および集団の免疫獲得状況を迅速かつ安定的に多検体処理可能な技術構築に取り組み、指先採血を吸収させた濾紙乾燥血液で中和活性が評価できることを見出した。指先採血は、簡便かつ感染リスクを下げられる方法として、新興感染症で必ず課題となる免疫獲得状況を広く知るための安全な手段につながり、ワクチン接種が必要な対象者の選定や最適な接種時期の計画立案など、ワクチン予防効果不透明性の課題を克服できるとともに、今後の様々な微生物へのワクチン接種計画にも応用の可能性が開ける。

研究成果の概要（英文）：This study showed that the participants who developed breakthrough infection (BI) had lower levels of neutralizing activities compared to the controls without BI. These differences were consistently observed before and after the fifth dose of bivalent vaccine, and during not only BA.5 but also XBB sub-lineage endemic periods. Given the above results, the neutralizing activities below 50% using the 200-fold diluted sera might be one of the indicators of high risk of COVID-19 BI.

Furthermore, this study demonstrated that dried blood spot (DBS) sample collection could be used to evaluate neutralizing activities against WT and Omicron variants (BA.5 and XBB.1.5). DBS sampling has the advantages of less invasive collection (i.e., self-collection), low cost, and easy transport and storage, making it a practical alternative to blood collection via traditional venipuncture. These advantages would also make DBS appealing for use in resource-limited settings and in potential future pandemics.

研究分野：感染症学

キーワード：COVID-19 2価ワクチン 指先採血 乾燥濾紙血液 ブレイクスルー感染

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正確な免疫獲得状況の評価は、感染拡大に対するワクチン接種計画の立案や社会活動制限緩和のための科学的指標となり得る。しかしながら、COVID-19 パンデミックでは海外での流行が先行するため、新薬評価などは海外のエビデンスに頼らざるを得ない部分があった。また、これまでわが国のワクチン接種計画や社会行動計画は、イスラエルや米国等の諸外国のデータを参考に計画されてきた。しかしながら、これらの国の既感染率の推移は、わが国の既感染率の推移とは異なっており、新たなパンデミックが発生した場合においても、感染流行や免疫獲得の程度には国ごとに地域差が生じると考えられ、各地域において、個人および集団の免疫獲得状況を迅速かつ安定的に多量評価可能な技術をあらかじめ構築しておくことが必要である。

COVID-19 において、現在広く利用される抗体検査では中和能は評価できない。我々はこれまで、全血でも評価でき、一度に 384 ウェル評価可能かつバイオセーフティーレベルを落として扱えるシュードタイプウイルスを用いた中和抗体評価法 (CRNT 法: chemiluminescent reduction neutralizing test) を確立した (Tani, *Virology* 2021 ほか)。また当院スタッフの協力を得て、ワクチン接種後の抗体量・中和活性追跡調査を行い、mRNA 起源株ワクチン 1・2 回目接種 (Kawasuji, *Microbiol Spectr* 2021) や 3 回目接種 (Kawasuji, *J Infect Chemother* 2022) における安全性と免疫原性を経時的に評価してきた。

しかしながら、免疫獲得状況が分かったとしてもワクチンを打つべきかどうかの判断は困難である。それは、感染や重症化のリスクのある免疫状態とはどのような状態かが不明なためである。現在、感染や重症化を予防できる抗体量および中和活性のレベルは未だ明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ワクチン接種者での COVID-19 感染および重症化リスクが生じる中和活性レベルを明らかにするとともに、ワクチン接種計画の立案につなげるため、個人および集団の免疫獲得状況を迅速かつ安定的に多量評価可能な技術を構築することである。

3. 研究の方法

本研究では、COVID-19 患者ならびにワクチン接種者の検体を活用して、(1) 感染を予防し得る中和活性レベルの特定、(2) ワクチン接種後の抗体量・中和活性追跡調査と合わせた感染リスク増加時期の推定、(3) 社会実装に向けた多検体処理技術の構築、を行った。

4. 研究成果

(1) 感染を予防し得る中和活性レベルの特定

パンデミック初期では、発症早期の中和抗体誘導が重症患者で遅延していることを確認しており (Kawasuji, *Sci Rep* 2021) ワクチン接種者においても中和活性低下が発症や重症化と関連していると想定された。しかし、オミクロン株 (BA.1 系統) 流行期に発症 5 日以内に入院した COVID-19 患者を対象に、ワクチン 2 回接種後に感染したワクチン接種者群とワクチン未接種者群に分け、中和活性や末梢血濾胞性ヘルパー T 細胞割合を評価したところ、パンデミック初期の結果とは異なり、いずれも重症患者で有意に高い結果が見出され、迅速な液性免疫応答と重症病態とに関連性が認められた (Kawasuji, *Front Immunol* 2024)。さらに、オミクロン株 (BA.5 系統) 流行期以降は、COVID-19 による肺炎を呈する患者はほぼ認められず、誤嚥性肺炎を併せた高齢者が患者集団の多くを占めていた。以上から、COVID-19 自体による重症化を予防しうる中和活性レベルの推定が難しい状況となった。

一方、ワクチン評価においては、当院スタッフの協力を得て、2 価ワクチン (起源株 / オミクロン株 BA.1) 4 回目接種 (Kawasuji, *Microbiol Spectr* 2023) の免疫原性・安全性を評価した。この報告は、臨床試験を除き、実臨床においては世界に先駆けての報告となり、日本人のエビデンスとして迅速な成果公開に繋がられた。さらに、我々は、2 価 (起源株 / オミクロン株 BA.4-5) ワクチン 5 回目接種前後の抗体量・中和活性追跡調査を行うとともに、追跡調査中にブレイクスルー感染を引き起こした感染者とブレイクスルー感染を引き起こさなかった非感染者における感染前の抗体量、中和活性を比較することで、ブレイクスルー感染を引き起こしうる抗体量・中和活性レベルを特定することとした。

これまで初回接種から同一スケジュールで起源株ワクチンを 4 回目まで接種し、4 回目接種 3 か月後 (3mA4D) に抗体量・中和活性評価を受けた既感染者を除く医療従事者 133 名を対象に、5 回目として 2 価 (起源株 / オミクロン株 BA.4-5) ワクチンを接種した 2 週間後 (2wA5D) と 6 か月後 (6mA5D) に採血を行い、抗スパイクタンパク受容体結合ドメイン (RBD) 抗体量測定と CRNT 法を用いた BA.5、XBB.1.5 に対する中和活性評価を行った。また、既感染者を確認するため、抗ヌクレオカプシド (N) 抗体も同時に測定した。なお、当院感染制御部では、スタッフ全員の感染状況 (発症・診断日時、症状の有無、感染経路等) を把握している。SARS-CoV-2 抗原または PCR 陽性かつ抗 N 抗体陽性 (C.O.I 1.0) を診断感染者、感染歴はないが、抗 N 抗体が陽転化し

た者を未診断感染者と定義し、両者をブレイクスルー感染者として評価した。

3mA4D から 5 回目接種までの期間 (BA.5 流行期) でブレイクスルー感染を引き起こした対象者は 11 名であり、感染前 (3mA4D) の抗 RBD 抗体量および BA.5 に対する中和活性を感染者 (BIs) 11 名と非感染者 (Control) 122 名で比較した結果、抗 RBD 抗体量に差がない一方、BA.5 に対する中和活性はいずれの希釈倍率 (血清 100 倍、200 倍、400 倍希釈) でもブレイクスルー感染者で有意に低かった (Figure 2A, B; Kawasuji, Vaccine 2024)。また、6mA5D から追跡終了時点 (2023 年 9 月 30 日) までの期間 (XBB 系統流行期) でブレイクスルー感染を引き起こした対象者は 9 名であり、感染前 (6mA5D) の抗 RBD 抗体量および XBB.1.5 に対する中和活性を感染者 (BIs) 9 名と非感染者 (Control) 29 名で比較した結果、同様に抗 RBD 抗体量に差がない一方、XBB.1.5 に対する中和活性は、血清 100 倍、200 倍希釈においてブレイクスルー感染者で有意に低かった (Figure 2C, D; Kawasuji, Vaccine 2024)。血清 400 倍希釈では全体の中和活性が低くなり、有意差がつかなかったと想定された。これらの結果より、最適な希釈倍率かつ明確な指標として、血清 200 倍希釈で中和活性が 50% を下回った場合、すなわち、中和抗体価 (NT_{50}) が 200 未満の場合にブレイクスルー感染を引き起こすリスクが高くなると考えられた。

(2) ワクチン接種後の抗体量・中和活性追跡調査と合わせた感染リスク増加時期の推定

3mA4D、2wA5D、6mA5D それぞれの時点における抗 RBD 抗体量ならびに BA.5、XBB.1.5 に対する中和活性を評価した。6mA5D 時点の抗体量は、3mA4D 時点での抗体量と同程度まで減少していたが、血清 200 倍、400 倍希釈における 6mA5D 時点の BA.5、XBB.1.5 に対する中和活性は、3mA4D 時点よりも有意に高かった (Figure 3B, C, D; Kawasuji, Vaccine 2024)。一方、XBB.1.5 に対する中和活性は、BA.5 に比べて有意に低く、いずれの希釈倍率においても、2wA5D 時点の XBB.1.5 に対する中和活性と 6mA5D 時点の BA.5 に対する中和活性が同程度であった (Figure 3B, C, D; Kawasuji, Vaccine 2024)。血清 200 倍希釈における 6mA5D 時点の XBB.1.5 に対する中和活性 (中央値) は 45.0 であり、2 価 (起源株 / オミクロン株 BA.4-5) ワクチン接種後 6 か月以上経過した場合には、半数以上が前述のブレイクスルー感染のリスクが高くなるカットオフ値 (50% 未満) を下回っていた。

(3) 社会実装に向けた多検体処理技術の構築

抗体評価には血液から細胞成分を除いた血清を利用するのが一般的であるが、CRNT 法は、侵襲が少なく自己採取可能な指先採血 (全血) でも評価でき、変異株を含む中和活性を一度に 384 件測定可能である。我々は、社会実装に向けた多検体処理技術の構築のため、少量検体採取から回収・輸送方法、中和抗体測定方法の一連のプロセスを検討し、安価、保管・輸送の簡便性、長期間の安定性から濾紙に吸収させた乾燥濾紙血液 (DBS: dried blood spots) を用いた評価が最適と考えた。実際、指先全血をスタンプ法により採血用濾紙に吸着させたのち、溶媒 (10% ウシ胎児血清とペニシリン 100 U/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL を添加したダルベッコ改変イーグル培地) に DBS を溶出させることで、中和活性を評価できることを見出した (Figure 4A; Kawasuji, Vaccine 2024)。濾紙 3 種類 (No. 545、No. 590、No. 424) を用いて条件を最適化し、DBS を 4 mm パンチで切り取り、100 μ L の溶媒で溶出した場合、いずれの濾紙においても DBS 溶出液は血清 20 倍希釈に相当することを確認した。次にワクチン接種後抗体追跡調査でのワクチン接種者 3 名を対象に、100 倍~25600 倍希釈での武漢株 (Wild-type: WT) に対する中和活性を血清と DBS 溶出液とで評価したところ、いずれの濾紙、希釈倍率においても高い相関性が確認された (Figure 4B, C, D; Kawasuji, Vaccine 2024)。次に、WT 以外の変異株に対しても評価可能であるか、また時間および温度安定性を確認するため、DBS を 室温で 1 か月静置 (1M)、または 室温で 1 か月静置後、高温 (40) でさらに 1 か月静置 (2M/HT) したのち、DBS を溶出させ、時間および温度安定性を評価した。その結果、1M において、No. 545 と No. 424 に吸収させた DBS 溶出液を用いて評価した BA.5、XBB.1.5 に対する中和活性は、抗 RBD 抗体量及び血清の中和活性と相関を認め、2M/HT では、No. 545 に吸収させた DBS のみが、BA.5 だけでなく XBB.1.5 に対しても血清での中和活性および抗 RBD 抗体量と相関性を維持していた (Figure 5; Kawasuji, Vaccine 2024)。

DBS を用いた中和活性評価系は、簡便かつ感染リスクを下げられる方法として、新興感染症で必ず課題となる免疫獲得状況を広く知るための安全な手段につながる。実用面では、極めて安価で、簡便、保存安定性という特性をもった検体収集が可能となる。これらの特性は、地域的な調査等への活用にとどまらず、国内外からの検体収集も可能とし、将来の新興感染症出現時にも免疫獲得状況の迅速評価に活用できる技術となると考えられた。

上記研究成果 (1) ~ (3) を論文として成果公開を行なった (Kawasuji, Vaccine 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawasuji Hitoshi, Morinaga Yoshitomo, Tani Hideki, Yamada Hiroshi, Yoshida Yoshihiro, Ezaki Masayoshi, Koshiyama Yuki, Takegoshi Yusuke, Kaneda Makito, Murai Yushi, Kimoto Kou, Nagaoka Kentaro, Niimi Hideki, Yamamoto Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Low pre-infection levels of neutralizing antibody in breakthrough infections after bivalent BA.4/5 vaccine and practical application of dried blood spots	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2024.05.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawasuji Hitoshi, Morinaga Yoshitomo, Nagaoka Kentaro, Tani Hideki, Yoshida Yoshihiro, Yamada Hiroshi, Takegoshi Yusuke, Kaneda Makito, Murai Yushi, Kimoto Kou, Niimi Hideki, Yamamoto Yoshihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 High interleukin-6 levels induced by COVID-19 pneumonia correlate with increased circulating follicular helper T cell frequency and strong neutralization antibody response in the acute phase of Omicron breakthrough infection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2024.1377014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawasuji Hitoshi, Morinaga Yoshitomo, Tani Hideki, Saga Yumiko, Yamada Hiroshi, Yoshida Yoshihiro, Takegoshi Yusuke, Kaneda Makito, Murai Yushi, Kimoto Kou, Ueno Akitoshi, Miyajima Yuki, Nagaoka Kentaro, Ono Chikako, Matsuura Yoshiharu, Niimi Hideki, Yamamoto Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Neutralizing Antibody Response of the Wild-Type/Omicron BA.1 Bivalent Vaccine as the Second Booster Dose against Omicron BA.2 and BA.5	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0513122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.05131-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川筋仁史, 森永芳智, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 上野亨敏, 宮嶋友希, 長岡健太郎, 仁井見英樹, 山本善裕.
2. 発表標題 OVID-19ワクチン接種6か月後における抗体量と各変異株に対する中和活性評価.
3. 学会等名 第70回日本化学療法学会総会; 2022 Jun 3-5; 岐阜.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兼田磨熙杜, 長岡健太郎, 村井佑至, 上野亨敏, 川筋仁史, 宮嶋友希, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 COVID-19におけるCasirivimab/imdevimabによる治療効果の検討.
3. 学会等名 第70回日本化学療法学会総会; 2022 Jun 3-5; 岐阜.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本 鴻, 長岡健太郎, 竹腰雄佑, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 上野亨敏, 川筋仁史, 宮嶋友希, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 オミクロン株によるSARS-CoV-2感染に対する早期免疫応答の検討.
3. 学会等名 第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会; 2022 Nov 3-5; 長崎.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兼田磨熙杜, 長岡健太郎, 竹腰雄佑, 村井佑至, 木本 鴻, 上野亨敏, 川筋仁史, 宮嶋友希, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 COVID-19における胸部CT画像所見とSARS-CoV-2ウイルス分布との相関性.
3. 学会等名 第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会; 2022 Nov 3-5; 長崎.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高比良弥紀, 川筋仁史, 竹腰雄佑, 兼田磨熙杜, 木本 鴻, 上野亨敏, 宮嶋友希, 長岡健太郎, 仁井見英樹, 谷 英樹, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 鼻咽頭拭い液および唾液の感染阻害作用とCOVID-19臨床病態との関連性.
3. 学会等名 第65回日本感染症学会中日本地方会学術集会; 2022 Nov 3-5; 長崎.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川筋仁史
2. 発表標題 日本感染症医薬品協会奨励賞受賞講演「COVID-19ワクチン個別最適化に向けた微量全血での中和活性評価系の確立と実証」
3. 学会等名 公益財団法人日本感染症医薬品協会メディカルサイエンスセミナー; 2022 Nov 24; 東京.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林裕和, 川筋仁史, 竹腰雄祐, 兼田磨熙杜, 木本 鴻, 上野亨敏, 川筋仁史, 宮嶋友希, 長岡健太郎, 仁井見英樹, 谷 英樹, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 若手研究シンポジウム「COVID-19 ワクチン4 回目接種における 2 価ワクチン の BA.2, BA.5 に対する中和活性評価」.
3. 学会等名 第 97 回日本感染症学会総会・学術講演会・第 71 回日本化学療法学会学術 集会; 2023 Apr 28-30; 横浜.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川筋仁史, 森永芳智, 竹腰雄祐, 兼田磨熙杜, 木本 鴻, 上野亨敏, 宮嶋友希, 長岡健太郎, 仁井見英樹, 山本善裕.
2. 発表標題 COVID-19既感染者と未感染者におけるワクチン4回目接種の効果と持続性.
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会・第71回日本化学療法学会学術集会; 2023 Apr 28-30; 横浜.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹腰雄祐, 長岡健太郎, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 木本 鴻, 上野亨敏, 川筋仁史, 宮嶋友希, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 COVID-19における咽頭痛と感染初期免疫応答の相関性.
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会・第71回日本化学療法学会学術集会; 2023 Apr 28-30; 横浜.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 腰山裕貴, 川筋仁史, 長岡健太郎, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫に対する抗CD20モノクローナル抗体投与後に再燃を繰り返し、長期間の抗ウイルス薬内服が必要であったCOVID-19の1例.
3. 学会等名 第91回呼吸器合同北陸地方会; 2023 Oct 14-15; 富山.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川筋仁史, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 パネルディスカッション「臨床現場での疑問、気づきを臨床研究に～現場にリサーチマインドを持ち込み、育むために～」
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第71回日本化学療法学会西日本支部総会; 2023 Nov 9-11; 富山.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮津祐希, 木本 鴻, 江崎真佳, 腰山 裕貴, 竹腰雄祐, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 兼田磨熙杜, 川筋仁史, 長岡健太郎, 山本善裕.
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫に対する化学療法後に再燃を繰り返し、30日間の抗ウイルス薬内服が必要であったCOVID-19の1例.
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第71回日本化学療法学会西日本支部総会; 2023 Nov 9-11; 富山.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 腰山 裕貴, 長岡健太郎, 江崎真佳, 竹腰雄祐, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 木本 鴻, 川筋仁史, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 第7-8波流行期におけるCOVID-19呼吸不全例の検討.
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第71回日本化学療法学会西日本支部総会; 2023 Nov 9-11; 富山.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春若純菜, 川筋仁史, 江崎真佳, 腰山 裕貴, 竹腰雄祐, 兼田磨熙杜, 村井佑至, 木本 鴻, 長岡健太郎, 仁井見英樹, 森永芳智, 山本善裕.
2. 発表標題 5回目接種における2価ワクチンのXBB1.5に対する中和活性評価.
3. 学会等名 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第71回日本化学療法学会西日本支部総会; 2023 Nov 9-11; 富山.
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------