



Cross-Neutralizing Breadth and Longevity Against SARS-CoV-2 Variants After Infections

倉橋, 幸也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8869号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490094>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Cross-Neutralizing Breadth and Longevity Against SARS-CoV-2 Variants After Infections

SARS-CoV-2 感染後におけるウイルス株間での抗体交差反応と中和抗体の持続

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
臨床ウイルス学
(指導教員：森 康子 教授)

倉橋 幸也

はじめに

重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）は、COVID-19 パンデミック（coronavirus disease 2019, 世界的大流行）を引き起こしているウイルスである。COVID-19 の多くは無症状もしくは軽症であるが、重篤になる場合もあり、2019 年 11 月から 2021 年 12 月中旬までに世界で 540 万人もの患者が亡くなったとされている。

このパンデミックを収束させるために、ワクチン接種や回復者血漿療法、中和活性をもつモノクローナル抗体を用いた治療の臨床試験が行われている。その一方で SARS-CoV-2 も変異を続けており、世界保健機関は伝播性や免疫回避性を高める変異が加わった株の一部を、懸念される変異株（VOC）と分類した。

SARS-CoV-2 感染回復者の血清に含まれる中和活性は半年から 1 年程度継続するという他の研究があるが、VOC に対する交差中和活性は有するのか、また、それらがどの程度持続するのかは不明な点が多い。そこで、我々は SARS-CoV-2 感染回復者の血清を用いて、それらに含まれる様々な VOC に対する交差中和活性およびその持続に関して解析した。

方法

COVID-19 の診断と重症度の定義：鼻咽頭ぬぐい液の PCR で SARS-CoV-2 のゲノムを特定できた患者を COVID-19 と診断した。低酸素血症や他の臨床症状がない場合を「無症候」、肺炎や低酸素血症はないが軽微な病状を呈した場合を「軽症」、室内気での酸素飽和度は 90%以上であったが肺炎の臨床症状を呈していた場合を「中等症」、室内気での酸素飽和度が 90%を保てない肺炎の場合を「重症」、人工呼吸器管理を要した場合を「超重症」と定義した。

研究場所と対象患者：2020 年 3 月から 2021 年 1 月の間に SARS-CoV-2 に感染し、兵庫県立加古川医療センターに入院した患者を対象とした。発症後 1-3 か月、3-6 か月、6-8 か月時点で患者から血液を採取した。

ウイルス株：SARS-CoV-2 起源株のスパイクタンパク質に D614G 変異が入り、世界各国と同様に、日本でも初期に流行した従来株（以下、D614G）を大阪大学微生物研究所より、B.1.1.7（アルファ）、B.1.351（ベータ）、P.1（ガンマ）を国立感染症研究所より分与頂いた。

中和試験：バイオセフティーレベル 3 の規則に準じた。患者血清を非動化した後に二段階希釈をした。そして 100TCID₅₀ 相当の SARS-CoV-2 を混合し 37 度で 1 時間インキュベートした。その混合液を、TMPRSS2 を発現させた VeroE6 細胞に加えて、6 日間培養した。中和抗体価は細胞変性効果を示さない最大希釈倍率（Log₂ スケール）とした。カットオフ値は 1 とし、1 未満は検出限界未満（not detected、以下 ND）とした。

統計解析：連続変数は中央値と四分位数で、カテゴリ変数は実数と割合で表記した。変異株間での中和抗体価が ND となった割合の比較には、Cochran の Q 検定と Benjamini-Hochberg 法を用いた。変異株間や採血時期毎の中和抗体価を比較するためには、Friedman 検定と Benjamini-Hochberg 法を用いた。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。以上の統計解析は STATA（14.2 版）を用いた。サンプルサイズの設定は行わなかった。

倫理：神戸大学医学研究科と兵庫県立加古川医療センターの倫理委員会の承認を得た。（承認番号：B200200）また、研究参加者からは書面同意もしくはオプトアウト方式での同意を得た。

結果

患者の特徴：患者 42 名から得た血清 97 検体を解析した。年齢は 56（49-62）歳で、半数が女性だった。患者からは 2 回もしくは 3 回連続して採血した。重症度の内訳は、無症候 4 名、軽症 15 名、中等症 5 名、重症 15 名、超重症 3 名だった。発症後時期を 3 群（発症後 1-3 か月、3-6 か月、6-8 か月）に分類し、それぞれ 47（43-54）日、117（110-132）日、209（199-219）日となった。主な既往歴として、高血圧（28.6%）、糖尿病（26.2%）、喘息や慢性閉塞性肺疾患を含む呼吸器疾患（19.0%）が挙げられた。

D614G および VOC に対する中和活性の持続：全 42 名中 28 名の患者血清において、発症後 3 か月以上にわたり D614G に対する中和活性および VOC に対する交差中和活性が維持されていた。

次に重症度を、無症候と軽症を合わせた「肺炎無」群 19 例と中等症、重症、超重症を合わせた「肺炎有」群 23 例に分け、D614G および VOC に対する中和抗体価を比較した。発症後 1-3 か月、3-6 か月では両群ともに B.1.351 に対する中和抗体価が他に比べて有意に低値であった。

さらに患者血清に含まれる SARS-CoV-2 に対する中和活性が ND を示す割合について解析した。「肺炎有」群では、すべての VOC に対して交差中和活性が維持されていた。一方で、「肺炎無」群で ND となる割合は、発症後 1-3 か月時点で D614G に対して 0%、B.1.1.7 に対して 11.8%、P.1 に対して 17.6%、B.1.351 に対して 47.1%であり、B.1.351 に対して ND を示す割合は他の 3 つに比べて有意に高かった。発症後 3-6 か月時点では、それぞれ ND を示す割合は、5.3%、15.8%、26.3%、68.4%で、発症後 1-3 か月と同様に B.1.351 に対する ND となる割合が有意に高かった。発症後 6-8 か月になると、各々、20%、20%、30%、60%となり有意差は出なかった。

VOC に対する交差中和活性が維持されていた 28 名に注目して、採血時期毎による変異株に対する中和抗体価を比較した。発症後 1-3 か月時点で、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価（Log2 スケール）は、5（5-6）、5（4-5）、4（4-5）、3（2-4）で、B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。発症後 3-6 か月時点で、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価（Log2 スケール）は、4（4-5.5）、4（3-5）、5（4-6）、3（2-4）で、ここでも B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。発症後 6-8 か月時点では、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価（Log2 スケール）は、4（2-5）、5（3-6）、4（3-6）、3（2-3）で、ここでは B.1.1.7 に比して B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。

最後に、先ほどと同じ 28 名に関して、変異株毎における採血時期による中和抗体価を比較した。発症後 6-8 か月の血清に含まれる D614G に対する中和抗体価は、発症後 1-3 か月の血清と比べて有意に低下していた。しかし、VOC に対する中和抗体価は各々で発症後 1-3 か月、3-6 か月、6-8 か月の間で有意な変化はなかった。

考察

「肺炎有」群では全例 VOC に対する交差中和活性が長期にわたり維持されていたが、「肺炎無」群では 19 例中 14 例で獲得されていなかった、もしくは維持できていなかった。これらは、SARS-CoV-2 に対する弱い免疫応答が原因だったと考えられるだろう。また、いずれの群も優位に B.1.351 への交差中和活性が低かったことは、他の研究結果と合致していた。

さらに我々の研究から、SARS-CoV-2 感染後、急速かつ大量に産生される、感染した株に対して特異的なエピトープ（抗原決定基）を認識する中和抗体は急速に減少するかもしれないが、複数の変異株に共通するエピトープを認識する中和抗体は長期間維持される可能性が示唆された。

なお、今回の研究参加者は日本の疫学情報をもとに、42 名全員が D614G に感染していたと考えたが、鼻咽頭ぬぐい液の PCR で得たウイルスゲノムの情報は確認しておらず、VOC に感染していた可能性を完全に否定することはできなかった。また、重症度別のサンプル数の偏りや検体数の少なさが今回の研究の限界として挙げられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3364 号	氏 名	倉 橋 幸 也
論 文 題 目 Title of Dissertation	Cross-Neutralizing Breadth and Longevity Against SARS-CoV-2 Variants After Infections SARS-CoV-2 感染後におけるウイルス株間での抗体交差反応と中和 抗体の持続		
審 査 委 員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 篠 原 正 和 勝 = 郁 夫 宮 良 高 維		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景・目的】

重症急性呼吸器症候群（SARS）コロナウイルス 2（SARS-CoV-2）は、COVID-19 パンデミック（coronavirus disease 2019, 世界的大流行）を引き起こしているウイルスである。COVID-19 の多くは無症状もしくは軽症であるが、重篤になる場合もあり、2019 年 11 月から 2021 年 12 月中旬までに世界で 540 万人もの患者が亡くなったとされている。このパンデミックを収束させるために、ワクチン接種や回復者血漿療法、中和活性をもつモノクローナル抗体を用いた治療の臨床試験が行われている。その一方で SARS-CoV-2 も変異を続けており、世界保健機関は伝播性や免疫回避性を高める変異が加わった株の一部を、懸念される変異株（VOC）と分類した。SARS-CoV-2 感染回復者の血清に含まれる中和活性は半年から 1 年程度継続するという他の研究があるが、VOC に対する交差中和活性は有するのか、また、それらがどの程度持続するのかは不明な点が多い。そこで、我々は SARS-CoV-2 感染回復者の血清を用いて、それらに含まれる様々な VOC に対する交差中和活性およびその持続に関して解析した。

【方法・結果】

2020 年 3 月から 2021 年 1 月の間に SARS-CoV-2 に感染し、兵庫県立加古川医療センターに入院した患者を対象とした。発症後 1-3 か月、3-6 か月、6-8 か月時点で患者から血液を採取した。SARS-CoV-2 起源株のスパイクタンパク質に D614G 変異が入り、世界各国と同様に、日本でも初期に流行した従来株（以下、D614G）を大阪大学微生物研究所より、B.1.1.7（アルファ）、B.1.351（ベータ）、P.1（ガンマ）を国立感染症研究所より分与頂いた。神戸大学医学研究科と兵庫県立加古川医療センターの倫理委員会の承認を得た。（承認番号：B200200）また、研究参加者からは書面同意もしくはオプトアウト方式での同意を得た。

患者の特徴：患者 42 名から得た血清 97 検体を解析した。年齢は 56（49-62）歳で、半数が女性だった。患者からは 2 回もしくは 3 回連続して採血した。重症度の内訳は、無症候 4 名、軽症 15 名、中等症 5 名、重症 15 名、超重症 3 名だった。発症後時期を 3 群（発症後 1-3 か月、3-6 か月、6-8 か月）に分類し、それぞれ 47（43-54）日、117（110-132）日、209（199-219）日となった。主な既往歴として、高血圧（28.6%）、糖尿病（26.2%）、喘息や慢性閉塞性肺疾患を含む呼吸器疾患（19.0%）が挙げられた。D614G および VOC に対する中和活性の持続：全 42 名中 28 名の患者血清において、発症後 3 か月以上にわたり D614G に対する中和活性および VOC に対する交差中和活性が維持されていた。次に重症度を、無症候と軽症を合わせた「肺炎無」群 19 例と中等症、重症、超重症を合わせた「肺炎有」群 23 例に分け、D614G および VOC に対する中和抗体価を比較した。発症後 1-3 か月、3-6 か月では両群ともに B.1.351 に対する中和抗体価が他に比べて有意に低値であった。さらに患者血清に含まれる SARS-CoV-2 に対する中和活性が ND を示す割合について解析した。「肺炎有」群では、すべての VOC に対して交差中和活性が維持されていた。一方で、「肺炎無」群で ND となる割合は、発症後 1-3 か月時点で D614G に対して 0%、B.1.1.7 に対して 11.8%、P.1 に対して 17.6%、B.1.351 に対して 47.1%であり、B.1.351 に対して ND を示す割合は他の 3 つに比べて有意に高かった。

発症後 3・6 か月時点では、それぞれ ND を示す割合は、5.3%、15.8%、26.3%、68.4%で、発症後 1・3 か月と同様に B.1.351 に対する ND となる割合が有意に高かった。発症後 6・8 か月になると、各々、20%、20%、30%、60%となり有意差は出なかった。VOC に対する交差中和活性が維持されていた 28 名に注目して、採血時期毎による変異株に対する中和抗体価を比較した。発症後 1・3 か月時点で、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価 (Log2 スケール) は、5 (5・6)、5 (4・5)、4 (4・5)、3 (2・4) で、B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。発症後 3・6 か月時点で、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価 (Log2 スケール) は、4 (4・5.5)、4 (3・5)、5 (4・6)、3 (2・4) で、ここでも B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。発症後 6・8 か月時点では、D614G、B.1.1.7、P.1、B.1.351 に対する中和抗体価 (Log2 スケール) は、4 (2・5)、5 (3・6)、4 (3・6)、3 (2・3) で、ここでは B.1.1.7 に比して B.1.351 に対する中和抗体価が有意に低かった。最後に、先ほどと同じ 28 名に関して、変異株毎における採血時期による中和抗体価を比較した。発症後 6・8 か月の血清に含まれる D614G に対する中和抗体価は、発症後 1・3 か月の血清と比べて有意に低下していた。しかし、VOC に対する中和抗体価は各々で発症後 1・3 か月、3・6 か月、6・8 か月の間で有意な変化はなかった。

【考察】

「肺炎有」群では全例 VOC に対する交差中和活性が長期にわたり維持されていたが、「肺炎無」群では 19 例中 14 例で獲得されていなかった、もしくは維持できていなかった。これらは、SARS-CoV-2 に対する弱い免疫応答が原因だったと考えられるだろう。また、いずれの群も優位に B.1.351 への交差中和活性が低かったことは、他の研究結果と合致していた。さらに我々の研究から、SARS-CoV-2 感染後、急速かつ大量に産生される、感染した株に対して特異的なエピトープ (抗原決定基) を認識する中和抗体は急速に減少するかもしれないが、複数の変異株に共通するエピトープを認識する中和抗体は長期間維持される可能性が示唆された。なお、今回の研究参加者は日本の疫学情報をもとに、42 名全員が D614G に感染していたと考えたが、鼻咽頭ぬぐい液の PCR で得たウイルスゲノムの情報は確認しておらず、VOC に感染していた可能性を完全に否定することはできなかった。また、重症度別のサンプル数の偏りや検体数の少なさが今回の研究の限界として挙げられた。

本研究は、SARS-CoV-2 感染回復者の血清に含まれる中和活性について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった VOC に対する交差中和活性について、また、それらがどの程度持続するのかについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。