

氏名	さかもと あつひこ 坂本 篤彦		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1983 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Longitudinal Dynamics of SARS-CoV-2 IgG Antibody Responses after the Two-Dose Regimen of BNT162b2 Vaccination and the Effect of a Third Dose in Health Care Workers in Japan （日本の医療従事者における BNT162b2 ワクチン 2 回接種後の SARS-CoV-2 IgG 抗体の経時的動態と 3 回目接種の効果に関する研究）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	高田 徹
	（副査） 福岡大学	教授	藤田 昌樹
	福岡大学	講師	小柳 緑

内 容 の 要 旨

【目的】

SARS-CoV-2 mRNA ワクチン(BNT162b2)の2回接種に対する液性免疫応答（抗体獲得）と抗体価の経時的減弱について評価する。さらに、追加接種（3回目接種）の効果について評価する。

【対象と方法】

福岡大学の病院職員 457 名を対象とし、ワクチン接種前、2 回目接種 28-56 日後(2D-1M)・90-120 日後(2D-3M)・180-210 日後(2D-6M)の血清抗 SARS-CoV-2 spike-protein receptor-binding domain(RBD)抗体を測定した。ワクチン接種日の報告がなかった者、ワクチン接種前に既に抗体が陽性であったものなど 26 名を除外した 431 名を解析対象とした。2 回目接種のおよそ 8 ヶ月後に 3 回目接種が行われることとなったことから、改めて参加者を募り、同意の得られた 370 名について 3 回目接種 28-56 日後(3D-1M)の抗体を測定した。3 回目接種については、この 370 名中、3 回目 1 ヶ月後までに SARS-CoV-2 に感染したと考えられた 10 名を除いた 360 名を解析対象とした。これらの研究参加者は 20 歳以上 65 歳未満の若年者であり、悪性腫瘍や糖尿病などの免疫機能低下を引き起こしうる疾患の者は除外した。

抗体の測定は、RBD のリコンビナント蛋白を作成して抗原とし、希釈した血清を加えて

RBD に結合した抗体を、Horseradish peroxidase でラベルしたヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて酵素免疫測定法 (ELISA) で検出した。測定値として以下の 3 つの値を用いた。

- ① 200 倍希釈した血清を用いた 450nm における吸光度 (ABS_{450})
- ② 血清を 200 倍からさらに 6 段階の 4 倍段階希釈を行った血清サンプルにおける 450nm の吸光度の合計 (SUM)
- ③ (抗 SARS-CoV-2 モノクローナル IgG 抗体を用いて検量線を作成して換算したモノクローナル抗体当量 (ng/ml)) * (希釈率) / 200 (A. U.)

【結果】

1. SARS-CoV-2 発生前 (2018 年以前) の血清 199 例を negative control (NC), ワクチンを接種していない COVID-19 発症者 14 例 (発症 14 日目以降) を positive control とし、抗 RBD-IgG 抗体を測定した。NC の平均値+3SD をカットオフ値とし、その感度は 100%, 特異度は 99% であった。
2. 2D-1M における抗 RBD-IgG 抗体陽転化率は 100% であった。抗体価の中央値 (A. U.) は ワクチン接種前測定感度未満 (<0.938), 2D-1M 129.9 (四分位範囲 (IQR) : 90.1-205.8), 2D-3M 38.7 (IQR: 26.0-66.5), 2D-6M 17.5 (IQR: 9.9-27.0) であった。2D-6M までに抗体が陰転化した者は 1 名に過ぎなかった。抗体価の半減期は 2D-1M から 2D-3M において 37.4 日、2D-3M から 2D-6M において 72.9 日と、経時的に有意な延長が認められた。ワクチン 3 回目接種後、3D-1M における抗体価 (A. U.) は 296.9 (IQR: 192.0-476.7) と、2D-1M に比べて 2.2 倍、2D-6M と比べて 17 倍に上昇していた。
3. 2D-1M における抗体価をもとに、mild responder (抗体価が平均値-1SD 未満)、moderate responder (平均値±1SD)、high responder (平均値+1SD 以上) の 3 群にわけて 3D-1M の抗体価を検討した。2D-1M と 3D-1M の抗体価を比較すると、mild responder においては著明な上昇、moderate responder においてはわずかな上昇が見られた一方、high responder においては 2D-1M と 3D-1M で抗体価に有意な上昇は見られなかった。
4. 抗体価に影響を与える因子について検討した。性別、年齢、BMI、喫煙歴について検討したところ、2D-1M の抗体価は男性が女性より有意に低かった。また、高齢者は若年者より低かった。高度肥満者では高い抗体価が認められた。これらの因子について多変量解析を行ったところ、年齢と性別が 2D-1M の抗体価に有意に関連する因子であった。一方、3D-1M で同様に多変量解析を行ったところ、年齢や性別と抗体価との有意な相関は見られなくなっていた。

【結論】

BNT162b2 の 2 回接種により被験者の全員の抗 RBD-IgG が陽転化した。抗体価の半減期はピークから接種 3 ヶ月後までが 37 日であったのに対し、接種 3 ヶ月から 6 ヶ月後までは 73 日と延長しており接種 6 ヶ月後にも陰転化した者はほとんどいなかった。3 回目接

種後の抗体価のピーク値は2回目接種後のピーク値よりも高かったが、2回目接種後の抗体価が Mean+1SD 以上の者では追加接種によるピーク値の上昇は見られなかった。また、2回目接種後に見られた抗 RBD-IgG 抗体価に対する年齢と性別（男性）の負の影響は、3回目接種後には消失していた。以上より、ワクチン2回目接種の高い抗体誘導能と半年以上の長期にわたる抗体維持が明らかになった。また、IgG 抗体価の上昇を目的とした場合、3回目の追加接種は特に2回目接種で抗体価の上昇が相対的に低かった男性や高齢者に対して有用な可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本論文は、福岡大学病院職員 457 名を対象に、SARS-CoV-2 mRNA ワクチン（BNT162b2, ファイザー社）の2回目接種ならびに3回目の接種に対する液性免疫応答を調査・解析して報告したものである。著者らは、2回目接種で全員が抗体陽転化しその半年後にも陰転化した者は1名にすぎなかったこと、2回目接種後の抗体価減衰速度は経時的に延長して接種90日目以降には IgG 抗体の半減期はそれ以前の 37.4 日から 72.9 日まで延長していたこと、2回目接種後に見られた性差や年齢差は3回目接種後には抗体価の底上げ効果によって消失すること、等を見出した。これらの結果を踏まえ、本論文では、SARS-CoV-2 mRNA ワクチンの追加接種がそれ以前の接種で反応性の悪かった高齢男性等に対してより有用であること、健常者に対する反復接種の意義に関してはさらなる学術的検討が必要であること等が主張されている。

1. 斬新さ

SARS-CoV-2 mRNA ワクチン接種後の抗体価を追跡した報告は少なくない。その中で本論文は、同ワクチンに対する液性免疫応答が2回目接種後には性別・年齢に相関する一方で3回目接種後にはその相関が消失することを報告した。3回目接種(2022年1月)の4ヶ月後(2022年5月)にタイムリーに出版され、出版時点において最新の有用な知見を供するものであった。

2. 重要性

SARS-CoV-2 mRNA ワクチンは本邦では2021年2月に特例承認されて広く接種が行われているところであり、その事後検証が重要であるのは論を俟たない。本論文は、本邦における同ワクチンに対する病院職員の液性免疫応答を検討した学術論文の中で、そのデザイン（前向きコホート）、コホートの規模、堅牢な正確性等の点から、重要な論文の一つと考えられる。

3. 研究方法の正確性

本研究は福岡大学病院職員 457 名を前向きに追跡したコホート研究である。母集団からは、COVID-19 発症者のほか、経過中に SARS-CoV-2 N 抗体が陽性となった者も除かれ、SARS-CoV-2 曝露歴と関連しないワクチン接種のみによる免疫応答が評価されるように注意が払われている。測定系は発現・精製された抗原タンパクの精度、検体希釈などの測定条件等について検証がなされた上で多数の陰性/陽性コントロールを測定してカットオフ値が定められ、高い感度と特異度を確認後に in-house の ELISA 法で行われている。統計解析については、古典的なパラメトリック/ノンパラメトリック解析や回帰分析を基本として用い、必要に応じて多変量解析が行われている。以上の通り、本研究は方法の正確性に十分な配慮がなされている。

4. 表現の明確さ

解析結果は図表を用いて正確かつ視覚的にもわかりやすく表現されている。また、そこから得られる考察や結論についても明確に述べられている。申請者のプレゼンテーションも明確なものであった。

5. 主な質疑応答

以上の研究内容に対して、審査員により、研究方法、結果の解釈、臨床的な意義等に関する質疑が行われた。下記のような多数の質問があり、活発な議論が行われた。

Q: 本研究の世界及び日本での位置づけはどのようなものか？

A: 本論文の執筆の時点では、ワクチン 2 回目接種後半年の時点で、抗体が検出できなくなるという報告からしっかり残っているという報告までであるような状況であった。そのような背景に対して、本論文で提示した時期の抗体価の推移について評価が必要と考えた。

Q: ワクチン接種後の IgM 抗体価はどうであったか？

A: 2 回接種 1 ヶ月後の検体で一部を測定している。上がっている人も上がっていない人もいた。測定時期がワクチン 2 回目接種 28-56 日後なので、感染後の上昇と単純には比べられないが、感染後よりも低い傾向にあるようだった。

Q: ワクチン接種 1 ヶ月後のピークの抗体価を解析しているが、ピークの抗体価と感染防御や重症化抑制は関連するのか？それとも抗体価の AUC が関連するのか？

A: 3 回目接種後にブレイクスルーが多発し、ピーク値と感染防御の関連については case-control 研究で解析中である。3 回目接種後 1 ヶ月のピーク値と、その直後に起こったブレイクスルー感染において、抗体価と感染リスクには相関が見られなかった。

Q: 抗体価が下がると感染しやすくなるので追加の接種を行うのではないかと、
どうか？

A: そうだと思うが、抗体価が下がっている時期は流行期ではなくブレイクスルー感染
が起きていなかった。ブレイクスルー感染は3回目接種後に多発したので、本研究の
母集団では抗体価が下がっている時期の評価ができなかった。

Q: 抗体価の減衰が2相性に起こるとい理論で解析しているが、実際には曲線状に減
衰しているのではないか？

A: ご指摘の通りである。液性免疫応答が起こり、次第に寿命の長い memoryB 細胞や
long lived plasma cell から抗体が産生されようになる。その移り変わりを見ている
ので、決して二層性に減衰するわけではなく、連続的に変化していくものとする。解
析の便宜上、2つの時期に分けて検討を行ったものである。

Q: 最終的に3回目の接種を終えた時点で、年齢とか性別の影響が減衰しているとい
ことだった。現在では多い人で5回目の接種までしているが、今はほとんどの方でこ
のように抗体価のピークがプラトーになっていると考えるか？

A: この論文の母集団のような若年の健常者においてはほぼプラトーに達しているの
ではないかと考える。一方で、相対的に免疫が弱い方が、3回目接種で2回目接種から抗
体価のピークが上昇したと考えている。これが極端に免疫が低下している場合、例えば
臓器移植後で免疫抑制剤内服中の方や免疫不全症の方などでは、追加接種によって免疫
応答がさらに惹起される効果が3回目のみならず4回目や5回目でもあるのではないかと
考えている。実際、我々が検討している腎移植後患者の母集団では、2回接種で半分
程度、3回目接種で8割程度抗体陽性になる。しかし、抗体価が低い。そのような集団
においてはワクチンの繰り返し接種による免疫応答の改善が期待できるのではないかと
考えている。従って、そのような患者層を選んで追加接種を行っていくことには意
義があるのではないかと考える。

Q: BMI が 30 以上の肥満傾向がある方のほうが抗体価が高くなっているが、インフルエ
ンザのワクチンでは逆のことが言われているようである。この現象は、説明ができるの
か？

A: BMI が高い方が抗体価が高いというより、BMI30 を超えるような極端な肥満の方の
抗体価が高い、と考えている。その背景として疾患自体のことを考えると COVID-19 は
高度肥満の方で重症化しやすく、そのような方では抗体価がそうでない方よりかなり上
がっているということがわかっている。従って、COVID-19 という疾患特有の特徴がある
のかもしれない。その機序は明らかになっていないが、仮説としては高度肥満の方に見
られる慢性炎症が関連してこのような抗体価の上昇が見られる可能性などが考えられ

る。また、mRNA ワクチンはインフルエンザで用いられるタンパクワクチンよりも免疫誘導能が高い。そのような異なった機序のワクチンであることも関連しているかもしれない。BMI が高い方のほうが mRNA ワクチン接種後の抗体価が高いことは他の論文でも一部指摘されているが、その機序については明らかになっていない。

Q: Figure 3 で N 蛋白質の方に 2D1M のデータがないが、どうしてか？

A: 解析の段階で、診断されていない SARS-CoV-2 感染者を除外するために N 蛋白抗体の測定を追加した。その際に、ワクチン接種前の測定から 2D1M の測定まで 1 ヶ月程度しか間隔が空いていないこともあり、測定にかかる労力も考慮して 2D1M の測定は行わなかった。

Q: 方法論が書かれた引用文献に、一般的な ELISA 法による測定系のことが書かれているが、必ずしも本研究のようにワクチンを接種された対象に特化したプロトコールではない。審査論文を通じて検証を行った結果、測定条件等について他のスタディでも普遍的に使えるのではないかと思える部分があったら教えてほしい。

A: 本研究では、この引用論文に沿った測定系を用いている。しかし、ご指摘の通り、実際の測定条件については、希釈も含め条件検討を行った上で我々の研究に合わせて modify した。世界中で使えるかという点、民族差などもあるかもしれない、希釈倍率などについては一概に適応できるとは言えない。研究を通して、条件検討を行って研究目的にあった測定系にしていくことは大切だということ学んだ。

Q: モノクローナル抗体に置き換えて定量してあるが、実際に作られているのはポリクローナルである。そこで、この研究で実際に測定されている IgG は、作られている IgG 抗体の一部を見ていると考えて良いのか？

A: モノクローナルのものだけを定量しているわけではない。吸光度に対応するモノクローナル抗体の量を求めて計算を行い、定量値として置き換えている。従って、モノクローナル抗体ではなく、IgG 抗体の全体量を反映する測定値であると考えている。

Q: 考察でワクチンを反復接種すると免疫寛容といったような問題が起こるかもしれないという指摘があった。Supplementary Fig1 において、moderate responder と high responder で 2 回目接種後より 3 回目接種後のほうが抗体価が下がったように見えるのは、そういったことが考えられると思っよいのか？

A: In-house の測定なので、どうしても誤差が出る。個々のデータでは、上がったたり下がったりしてものが見られるが、測定間の誤差があり、個別のデータを見て上がっているとか下がっているとか決めることはできないと考える。従って、例えば high responder では、集団として見ると変化がない、というのが真実だと考えている。

Q: 研究結果から類推すると、抗体の減衰速度を見て再接種までの期間を考えたりできるのかな、とも思うが、どうか？

A: ワクチン接種の目的として、中和抗体を作って中和活性を維持して感染自体を減らそう、制御しようというのであれば、抗体価がどのように減少するのかそしてそれと感染との相関がどうなのかを見て投与間隔を検討していく必要があると考える。しかし、その方法論で SARS-CoV-2 の感染を制御するのは困難であることが明らかになりつつあるのは周知の通りである。一方、重症化や死亡を抑制するのもワクチンの重要な目的であり、実際にこのワクチンが成し遂げていることである。その部分については、論文のデータで示した通り 2 回目接種で液性免疫については免疫記憶がしっかりなされている、また細胞性免疫についても同様に長期に免疫記憶が維持されていることが報告されている。一旦しっかりと記憶免疫を形成しておけば、実際に感染が起こった時に重症化や死亡を抑制することができるかと類推しているし、実際にワクチンは半年や1年といった長期にわたって重症化や死亡を抑制することが報告されている。それらのことから、少なくとも健常者においてはそれほど接種間隔を短くする必要はないのではないか、と考えている。

以上、本論文は、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ及び質疑応答の結果を踏まえ、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。