

## 14. SARS-CoV-2 の変異解析とその変異が中和抗体活性に与える影響

○鈴木 雅和、平山 達也、佐々 誠紀、安井 善宏（愛知県衛生研究所）

皆川 洋子（旧所属 愛知県衛生研究所 現所属 さくら総合病院）

### 【研究目的】

SARS-CoV-2 は、世界中の人々の間で感染を繰り返すことにより、宿主の免疫機構から逃避する様々な変異を獲得した。本研究では、免疫逃避が示唆されるアミノ酸置換による中和抗体活性への影響を検討するため、当所で分離した変異株に対して、県民から集めた血清の中和抗体価を調べる。中和抗体価をモニタリングすることにより、ワクチン施策などの流行抑制に有効な感染対策を考案するための一助とする。

### 【研究の必要性】

SARS-CoV-2 は、2019 年 11 月に中華人民共和国湖北省武漢市で初めて発見されたウイルスで、ヒトに感染し重篤な呼吸器症状を引き起こす。発生以降、急速に世界的流行を引き起こし、2023 年 4 月末現在、全世界において 7 億人以上が感染し、約 700 万人が死亡した。愛知県においても、2023 年 4 月末現在約 200 万人が感染し、約 4 千人が死亡した。2020 年以降、様々な新しい特性を獲得した「変異株」が複数出現し、その一部は日本においてこれまでに 8 度あった流行波の原因となっている。これら変異株の中には、起源株に対し病原性の強いアルファ株やデルタ株、病原性は起源株ほど強くないものの感染力が極めて強いオミクロン株等があり、更にこれらの組換え株も報告されている。当研究所では、これまでに約 4 千件の SARS-CoV-2 の全ゲノム解析を行ってきた。その結果、第 6 波(オミクロン株出現)以降、S タンパク質(宿主細胞への結合と融合を担うタンパク質)に、ACE2 受容体(宿主細胞への侵入に関わる主要な受容体)への親和性を増大させる変異だけでなく、宿主の免疫機構からの逃避が示唆されている変異を多く確認した。特に、2023 年 1 月以降、これら宿主の免疫機構からの逃避が示唆される変異をもつウイルスが顕著に増加しており、これらは、既存のワクチンでは対応できない、あるいはワクチン効果を低減させる可能性があるため、変異株に対する中和抗体活性を調査する必要がある。

### 【研究計画】

2023 年第 19 週～2024 年第 34 週に愛知県内の医療機関で採取された SARS-CoV-2 陽性検体 1,478 件について、SARS-CoV-2 の全ゲノム解析を行った。国立感染症研究所新型コロナウイルスゲノム解読プロトコルに準じて、Qiaseq FX DNA Library (QIAGEN) を用いてライブラリを作製、イルミナ社の次世代シーケンスシステムを用いて、塩基配列を取得した。得られた全ゲノム配列は、NextClade により解析を行い、PANGO 系統(pango lineage)を取得

し、PANGO 系統と病原体定点(インフルエンザ/COVID-19 定点)の患者報告数の推移と比較し、ウイルス中和試験に用いるウイルス系統を選定した。

2023 年第 27 週～第 37 週に愛知県内で採取された小児(0～15 歳)血清及びアンケート調査(129 件)を研究対象とした。血清及びアンケート結果の使用は、当研究所の倫理審査委員会の承認(23E-7)を得て実施した。ウイルス中和試験には、VeroE6/TMPRSS2 細胞、SARS-CoV-2(WT521 株)を使用し、高度安全実験室(BSL3)で令和 5 年度感染症流行予測調査実施要領 COVID-19 の血清学的検査に準じて、起源株に対する中和抗体活性(血清希釈倍率 5 ～2,048 倍)を測定した。次に、起源株に対する中和抗体値が 5 倍以上を示した血清(48 件)について、上記で選定した系統に対する中和抗体活性を測定し、ウイルス系統間で中和抗体値を比較した。中和抗体値 5 倍未満は、中和抗体値 2.5 として評価した。さらに、アンケート調査により、新型コロナウイルス感染症罹患歴有群、及びワクチン接種歴有(罹患歴なし)群に分け、それぞれの群内で、ウイルス系統による中和抗体値を比較した。有意差は中和抗体値の対数値(底 2)を Wilcoxon Signed Rank Test により検定した。

### 【実施内容・結果】

PANGO 系統の推移と病原体定点(インフルエンザ/COVID-19 定点)の患者報告数との比較を図 1 に示した。2023 年第 19 週～2023 年第 46 週(第 9 波)では、XBB 系統が主流であり、全体の 72% を占めた。第 9 波のピーク以降は、XBB 系統は漸減し、EG. 5 系統が増加した。2023 年第 47 週～2024 年第 18 週(第 10 波)では、EG. 5 系統から BA. 2. 86 系統及び JN. 1 系統への置換し、2024 年第 19 週～現在(第 11 波)では、KP. 3 系統が全体の 91% を占めた。研究対象の血清が採取された後に流行した系統であること、BA. 2. 86 系統の子系統が JN. 1 系統であることから、ウイルス中和試験に用いるウイルス系統は、EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統、KP. 3 系統の 3 系統を選定した。

起源株、EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体値の全データ(N=48)幾何平均は、それぞれ 25.6 倍、8.8 倍、11.1 倍、4.1 倍であった(図 2A)。EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体値は、起源株に対する中和抗体値と比較して、有意に低かった(P<0.01)。EG. 5 系統及び BA. 2. 86 系統に対する中和抗体値は、KP. 3 系統に対する中和抗体値と比較して、有意に低かった(P<0.01)。また、BA. 2. 86 系統に対する中和抗体値は、EG. 5 系統に対する中和抗体値と比較して有意に高かった(P<0.05)。

新型コロナウイルス感染症罹患歴有群(N=26)では、起源株、EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体値の幾何平均は、それぞれ 22.3 倍、11.8 倍、15.2 倍、4.5 倍であった(図 2B)。KP. 3 系統に対する中和抗体値は、起源株、EG. 5 系統及び BA. 2. 86 系統に対する中和抗体値と比較して、有意に低かった(P<0.01)。起源株、EG. 5 系統及び BA. 2. 86 系統間では、中和抗体値に有意な差はみられなかった。

ワクチン接種有(罹患歴なし)群(N=8)では、起源株、EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体値の幾何平均は、それぞれ 56.6 倍、5.5 倍、5.0 倍、3.5 倍であった(図 2C)。EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体値は、起源株に対する中和抗体値と比較して、有意に低かった(P<0.01)。EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統間では、中和抗体値に有意な差はみられなかった。

## 【考察と今後の課題】

研究対象とした血清は、XBB 系統流行時に採取された血清である。罹患歴有群において、起源株、EG. 5 系統及び BA. 2. 86 系統に対する中和抗体価に有意な差が見られなかった理由は、S タンパク質以外の構造タンパク質(M、E、N タンパク質)に対する中和抗体も保持していたためと考えられる。また、血清採取時点で認可されていた小児用ワクチンが、起源株対応ワクチンであった。ワクチン接種歴有(罹患歴なし)群において、EG. 5 系統、BA. 2. 86 系統及び KP. 3 系統に対する中和抗体価が低くなった理由は、ワクチンが S タンパク質に対する抗体のみを誘導したためと考えられる。そのため、新型コロナウイルス感染症の予防及びまん延防止には、流行株に応じたワクチンの開発と、適切なワクチン選択が求められる。

EG. 5 系統は、従前の XBB 系統に F456L 変異を持つ系統である。F456 は、7 個のモノクローナル抗体のエピトープとなっており<sup>1)</sup>、抗原性の変化が示唆される。EG. 5 系統に対する中和抗体価は、罹患歴有群において起源株と比較して有意な差がなく、ワクチン接種歴有(罹患歴なし)群において有意に低下したことから、F456 変異は XBB 系統から EG. 5 系統の置換への影響は限定的であったと考えられる。

BA. 2. 86 系統は、XBB 系統と比較して S タンパク質の RBD 領域に 24 アミノ酸の違いがあり、抗原性が大きく異なり、ワクチンや感染による中和抗体による免疫から逃避する懸念があった。罹患歴有群において、BA. 2. 86 系統に対する中和抗体価は、起源株に対する中和抗体価と比較した場合も、直前に流行した EG. 5 系統に対する中和抗体価と比較した場合も有意な差はみられなかった。複数の報告<sup>2)3)4)</sup>で、BA. 2. 86 系統は免疫から逃避する可能性が XBB 系統と比較して僅かな違いと論じており、本研究の結果もこれらの報告と同様といえる。一方、BA. 2. 86 系統は、ACE2 受容体への結合能が XBB 系統や EG. 5 系統と比べて高いとの報告<sup>2)</sup>があり、第 10 波の主流が EG. 5 系統とならずに、BA. 2. 86 系統となった原因の 1 つは、抗原性の違いではなく、ACE2 受容体への結合能が寄与したと考えられる。

KP. 3 系統は、BA. 2. 86 系統に L455S、F456L 及び Q493E 変異を持つ系統である。KP. 3 系統に対する中和抗体価は、罹患歴有群及びワクチン接種歴有(罹患歴なし)群のいずれでも、起源株、EG. 5 系統及び BA. 2. 86 系統に対する中和抗体価と比較して有意に低くなかった。この結果は、複数の報告<sup>5)6)</sup>で中和抗体からの免疫逃避の可能性を指摘されている点と一致している。L455、F456 及び Q493 は、それぞれ 6、7、8 個のモノクローナル抗体のエピトープとなっており<sup>1)</sup>、これらのアミノ酸の変異が免疫逃避に寄与したと考えられる。また、Q493E 変異は、これまでの流行の原因となった系統には見られなかった変異である。以上のことから、KP. 3 系統およびその亜系統は、従来のワクチンや感染による免疫を逃避する可能性高いと考えられ、第 11 波を形成する要因の 1 つとなったと推定される。

2024 年 8 月に、JN. 1 系統(KP. 3 系統の親系統)に対応したワクチンが認可された。従来のワクチンと比較して KP. 3 系統に対してより強い免疫を誘導すると考えられ、早期の普及が望まれる。しかし、新型コロナウイルスは、今後も新たな変異を獲得し、宿主免疫機構から逃避するよう変化すると考えられる。そのため、継続的にゲノムサーベイランスを実施し、アミノ酸変異による中和抗体価への影響を評価することは、ワクチン施策などの流行抑制に有効な感染対策の基礎資料として重要となる。

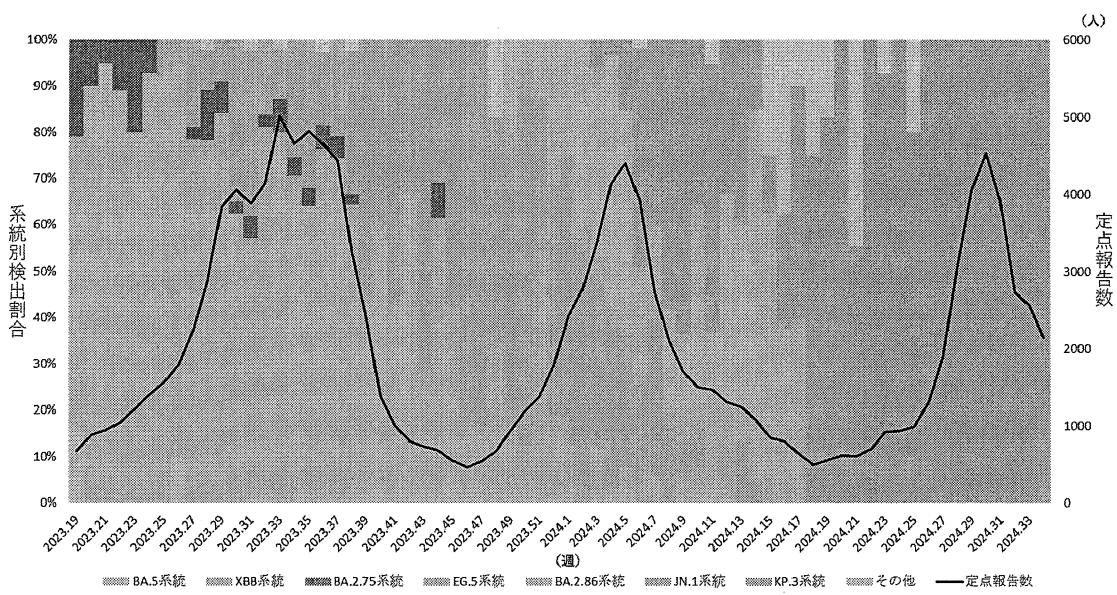


図 1 PANGO 系統と病原体定点（インフルエンザ/COVID-19 定点）の患者報告数の推移

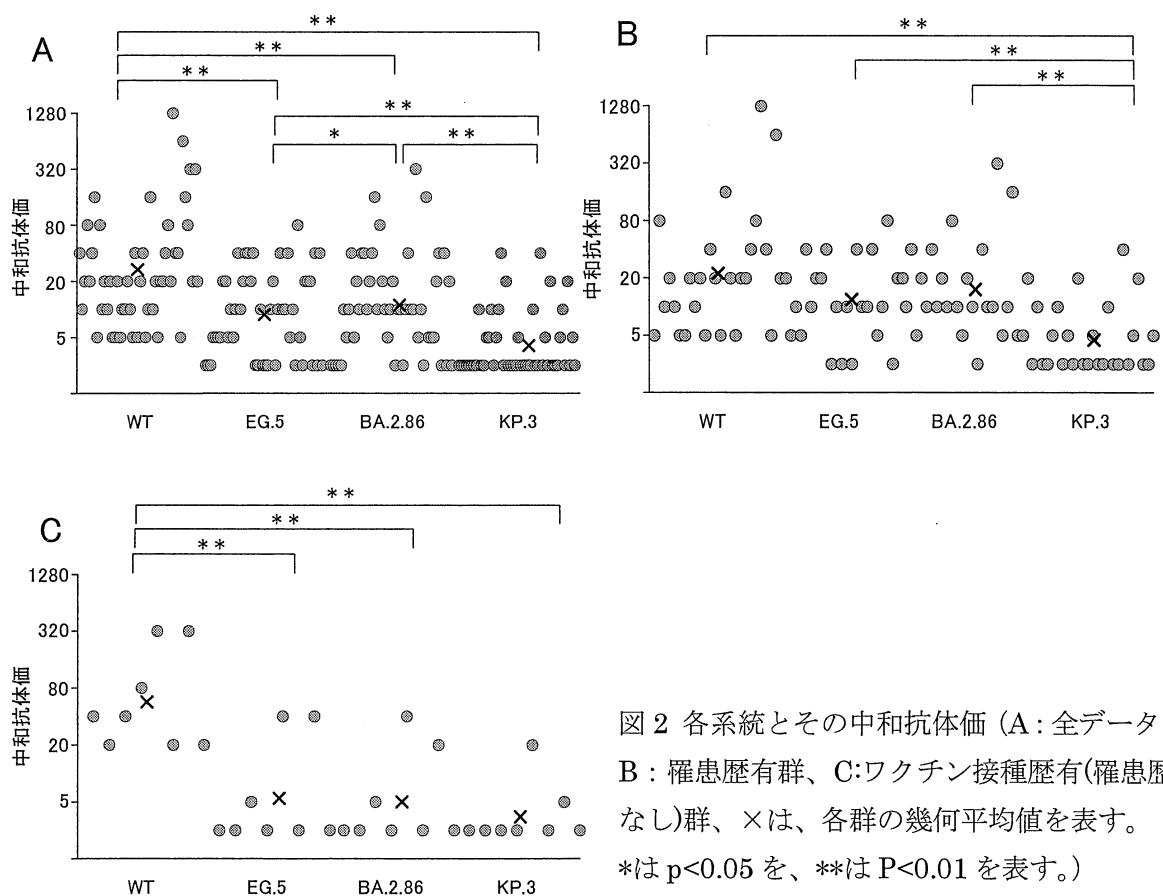


図 2 各系統とその中和抗体価 (A: 全データ、  
B: 罹患歴有群、C:ワクチン接種歴有(罹患歴  
なし)群、×は、各群の幾何平均値を表す。  
\*は  $p < 0.05$  を、\*\*は  $P < 0.01$  を表す。)

### 【謝辞】

新型コロナウイルスゲノムサーベイランスおよび血清提供に協力頂いた医療機関及び関係各所の皆様に感謝致します。

### 【参考文献】

- 1) Barnes et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies: Nature 2020 Dec;588(7839):682-687.
- 2) Wang, Q. et al. Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike. Nature, 10.1038/s41586-023-06750-w
- 3) Hu, Y. et al. Less neutralization evasion of SARS-CoV-2 BA.2.86 than XBB sublineages and CH.1.1. Emerging microbes & infections, 12(2), 2271089
- 4) Yang S. et al. Antigenicity and infectivity characterization of SARS-CoV-2 BA.2.86. bioRxiv, 2023-09
- 5) Kaku, Y. et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 KP.3, LB.1, and KP.2.3 variants: The Lancet. Infectious diseases, 24(8), e482–e483
- 6) Kaku, Y. et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 KP.3.1.1 variant: The Lancet. Infectious diseases, S1473-3099(24)00505-X

### 【経費使途明細】

使 途	金 額
プラスチック（フィルターチップ、PCR チューブ）等消耗品	
FastGene 0.2mL 12 連 PCR チューブ	18,900 円
FastGene チップ	23,400 円
FastGene 1.5mL マイクロチューブ	9,250 円
遺伝子解析に係る消耗品	
FastGene 0.2mL 8 連 PCR チューブ	30,500 円
Qubit RNA HS Assay Kit	14,100 円
Vortex Adapter for 24 tubes	21,600 円
ピペット	74,500 円
中和抗体法・細胞培養に係る消耗品	
ピペット	74,400 円
バーコードリーダー	5,678 円
消費税	27,232 円
振込手数料	440 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円