

## 事後評価結果概要

000-003\_河岡 義裕（国立国際医療研究センター）：

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する弱毒生ワクチンの開発 II

### 【研究概要】

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のパンデミックの中で、mRNA ワクチンや組換えタンパクワクチンなどの様々なモダリティによる新規ワクチンが承認されたが、重症化は予防できるものの感染や発症を完全に予防することはできないと考えられる。実際、mRNA ワクチン接種後の感染患者から排出されるウイルス量は、ワクチン未接種者の感染患者から排出されるウイルス量と同程度であることが明らかになっており、mRNA ワクチンでは上気道でのウイルス増殖を完全に抑制できない可能性が高いと考えられる。このような状況を改善するために、経鼻弱毒生ワクチンは、上気道における粘膜免疫を効率的に誘導し、上気道でのウイルス増殖を効率的に抑制することが期待できる。

これまでにハムスターにおける病原性が低下した起源株を基にした SARS-CoV-2 弱毒株を樹立し、その遺伝的安定性、弱毒安定性、免疫原性および感染防御能を検証してきた。

弱毒株の弱毒性を規定する遺伝的背景を明らかにするために、親株および弱毒株を基に、弱毒化に関わる可能性のあるアミノ酸変異について 1 アミノ酸変異株を Bacterial artificial chromosome を用いたリバーシジェネティクス法により作製し、それらのハムスターにおける病原性を親株や弱毒株と比較した。感染ハムスターの体重変化、呼吸・肺機能評価システムによる呼吸機能の評価および肺の病理解析から、弱毒化に寄与するアミノ酸変異を同定した。さらに、感染 3 日後の肺および鼻甲介におけるウイルスのゲノム配列を Deep sequence により確認したところ、Revertant の出現はなく、弱毒変異の遺伝的安定性が示された。

起源株を基にした弱毒株により誘導される免疫が、抗原性が変化した流行株にも有効であるかを調べるために、オミクロン株である BA.1 系統、BQ.1.1 系統および XBB.1.5 系統のウイルスによる攻撃試験を実施した。攻撃感染後のハムスターの体重変化、呼吸機能および肺・鼻甲介におけるウイルス力価から、起源株を基に作出した弱毒株が、これらの系統のウイルスに対して高い感染防御能が示された。

次に、非臨床試験として、ハムスターを用いた弱毒性確認試験、神経毒力試験、反復投与毒性試験、薬理薬効試験及びヒト ACE2 発現マウスを用いた免疫誘導試験を計画した。それぞれの試験計画については、PMDA（医薬品医療機器総合機構）との面談を行い、実施内容を決定した。それぞれの試験については、GLP（Good Laboratory Practice：優良試験所基準）またはそれに準じて実施する必要があるため、対応可能な CRO（Contract Research Organization：医薬品開発業務受託機関）に依頼した。ハムスターを用いた弱毒性確認試験

では、弱毒株をハムスターに経鼻接種し、感染ハムスターの体重測定、ウイルスゲノム RNA 量の測定、肺の病理解析を実施した。ハムスターの臓器におけるウイルスゲノム RNA 量、体重変化、病理学的解析の結果、ハムスターにおける弱毒性が確認された。ハムスターを用いた神経毒力試験では、ハムスターに弱毒株を経鼻接種し、その 7 日後に脳および嗅球の組織病理学的解析を行った。その結果、ハムスターにおける神経病原性は確認されなかった。ハムスターを用いた反復投与毒性試験は GLP 基準で実施した。弱毒生ワクチンを 4 週間隔で 2 回経鼻接種し、それぞれの接種後にハムスターの体重、体温、呼吸機能、血液学的検査、生化学的検査、全身組織の病理学的検査を実施した。それぞれの試験群の結果を陰性コントロール群と比較したところ、顕著な違いは認められなかったことから、ハムスターへの 2 回の経鼻接種では明確な毒性を示さないと結論付けられた。ハムスターを用いた薬理薬効試験では、弱毒株で免疫したハムスターの免疫 3 週間後における S 蛋白質に対する ELISA 抗体価および中和抗体価を測定した後に、親株による攻撃感染を行った。免疫ハムスター群では、S 蛋白質に対する ELISA 抗体および中和抗体が検出された。攻撃感染後の免疫ハムスターの体重変化、肺・鼻甲介・嗅球におけるウイルス RNA 量・ウイルス力価、肺の病理解析により、弱毒株の経鼻免疫により、感染防御に資する抗体応答が誘導されることが明らかとなった。ヒト ACE2 を発現するマウスを用いた免疫誘導試験では、ヒト ACE2 発現マウスに弱毒株を経鼻接種し、3 週間後に ELISA 抗体価、中和抗体価、細胞性免疫を測定したところ、血中に中和抗体および S 蛋白質に対する ELISA 抗体が検出された。誘導された抗体のサブクラスを検討したところ、IgG1 抗体価より IgG2a 抗体価が高く、Th1 型の免疫が誘導されていることが明らかとなった。また、S 蛋白質および N 蛋白質に対する細胞性免疫が誘導されていた。よって、弱毒株は Th1 依存的に中和抗体と T 細胞応答を誘導していることが確認された。以上の非臨床試験により、弱毒株の免疫原性および適格性が確認された。現在、第 1 相臨床試験実施に向けて、臨床試験薬の製造を行っている。

ワクチンの有効性を推測するために、感染者やワクチン接種者の血清、並びにスパイク蛋白質に対するヒトモノクローナルを用いて流行株の抗原性を解析した。試験に用いる流行株を得るため、SARS-CoV-2 感染患者の呼吸器検体を取得し、ヒトの TMPRSS2 および ACE2 を発現する Vero 細胞を用いてウイルス分離を試みた。その結果、B. 1. 1. 7 系統（アルファ株）、R. 1 系統、B. 1. 627. 2 系統（デルタ株）、BA. 1 系統、BA. 2 系統、BA. 4 系統、BA. 5 系統、BF. 7 系統、BA. 2. 3. 20 系統、BQ. 1. 1 系統、XBB 系統、CH. 1. 1 系統、CJ. 1 系統、BM. 1. 1 系統、CK. 1. 1 系統などの流行株を計 822 株分離した。これらの変異株の抗原性を解析したところ、B. 1. 1. 7 系統、B. 1. 351 系統、B. 1. 617. 2 系統および P. 1 系統と起源株との比較では、B. 1. 351 系統の抗原性が最も変化していた。次にオミクロン株である BA. 1、BA. 2、BA. 4 および BA. 5 の抗原性を比較したところ、BA. 1 や BA. 2 の抗原性は起源株から著しく変化しており、BA. 4 および BA. 5 ではさらなる抗原性変化が確認された。その後に分離された変異株の抗原性解析から、流行株の抗原性は時間と共に徐々に起源株から変化していることが明らかとなった。

さらに、論文で公表されたエピトープ同定済みのスパイク蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体を 28 種類作製し、流行株の抗原性を解析した。作製した 28 種類の抗体のうち 26 種類が ELISA において起源株と反応した。それらを用いてオミクロン株 (BA. 1、BA. 2、BA. 5) の抗原性を検討したところ、6 種類の抗体 (COV2-2130、2-7、REGN10987、S309、2-36、LYCoV1404) 以外の 20 種類の抗体は 3 種類のオミクロン株に対して中和活性を失っていた。さらに、多くの流行株に対して中和活性を維持していた治療用抗体 LYCoV1404 (bebtelovimab) も、BQ. 1.1 および XBB 系統のウイルスに対する中和活性を失っていることが明らかとなった。

#### 【配分額】

1,317 (百万) 円

#### 【総合評価】

起源株を基に樹立した SARS-CoV-2 弱毒株の温度感受性、低温順化および弱毒性に寄与するアミノ酸変異を同定し、さらに感染 3 日後の肺および鼻甲介におけるウイルスのゲノム配列から、Revertant の出現は確認されず、弱毒変異の遺伝的安定性を確認できた。生ワクチンとして開発を進めるうえで重要なデータをハムスター等の動物実験で取得し、有望なワクチンとなり得る可能性を示した。また CRO にて、ハムスターを用いた弱毒性確認試験、神経毒力試験、反復投与毒性試験、薬理薬効試験およびヒト ACE2 発現マウスを用いた免疫誘導試験を非臨床試験として実施し、良好な成績を得た。治験に向けての GMP 製造も開始するなど、当初の目標を確実に達成している。

一方で、本弱毒株によるハムスターへの免疫でオミクロン株に対する中和抗体は検出されず、ELISA でも S タンパク質に対する抗体は検出されていないことから、オミクロン株に対する感染防御効果が十分か懸念される。また、弱毒化ワクチンが中和抗体を十分に誘導しなくても、細胞性免疫により変異株にハムスターで有効性を示したが、国内臨床試験における免疫原性の評価で、S タンパク質特異的抗体価及びウイルス中和抗体価を測定している現状を考慮した場合、同様な追加の薬効評価結果の提示があれば 臨床試験に進むことが可能なものの検証が必要である。

今後は、他ワクチンに対する優位性 (高い感染防御効果・伝播阻止効果) を非臨床・臨床においてどのように示すかとの検証、また、カルタヘナ対応も重要である。mRNA ワクチンやタンパク質ワクチンで十分な免疫能を有することが明らかになっている中で弱毒生ワクチンの開発意義 (有効性と安全性、リスク・ベネフィット) を明確に示すことも必要となる。

※当該事後評価は、二次公募を対象としたものであり、令和 3 年 4 月 1 日以降の期間における研究進捗を評価したものである。