



症例報告。COVID-19に対するBNT162b2 mRNAワクチン接種後の多巣性壊死性脳炎と心筋炎について

Michael Mörz

症例報告

ゲオルク・シュモル病理学研究所、ドレスデン市立病院、フリードリヒ通り 41、01067 ドレスデン、 ドイツ; michael.moerz@klinikum-dresden.de

概要:本報告では、3回目のCOVID-19ワクチン接種後3週間で死亡した76歳のパーキンソン病(PD)の症例を紹介する。この患者は2021年5月にChAdOx1 nCov-19ベクターワクチンを初回接種 し、その後、BNT162b2 mRNAワクチンを7月と12月に2回接種した。死亡前の臨床症状が曖昧で あったため、遺族から剖検を依頼された。死後の検査でPDが確認された。さらに、誤嚥性肺炎と 全身性動脈硬化症の徴候が認められた。しかし、脳の病理組織学的分析では、急性血管炎(主に リンパ球性)と、グリアおよびリンパ球反応を含む顕著な炎症を伴う原因不明の多巣性壊死性脳 炎という、これまで疑われていなかった所見が発見された。心臓では、慢性心筋症の兆候に加え 、軽度の急性リンパ組織球性心筋炎と血管炎が見られた。この患者にはCOVID-19の既往はなかっ たが、SARS-CoV-2抗原(スパイク蛋白とヌクレオカプシド蛋白)の免疫組織化学的検査を行った ところ、スパイク蛋白のみが検出された.驚いたことに、脳と心臓の炎症巣内、特に小血管の内 皮細胞ではスパイク蛋白のみが検出され、ヌクレオカプシド蛋白は検出されなかった。ヌクレオ カプシド蛋白が検出されなかったことから、スパイク蛋白の存在は、ウイルス感染ではなく、ワ クチン接種によるものと考えざるを得ない。この結果は、遺伝子ベースのCOVID-19ワクチンによ る脳炎と心筋炎の既報を裏付けるものである。

キーワードCOVID-19ワクチン接種、壊死性脳炎、心筋炎、スパイクプロテイン検出、ヌクレオ カプシドタンパク質検出、剖検

引用Mörz, M. A Case Report:BNT162b2 mRNAワクチン 接種後の多巣性壊死性脳炎および心 筋炎の症例報告。 COVID-19です。*ワクチン*2022, 10, 1651. https://doi.org/10.3390/ vaccines10101651

アカデミックエディターシム・ソンリョル

受領しました。2022年8月31日 受理:2022年9月27日 発行:2022年10月1日

出版社からのコメント:MDPIは、 出版された地図や機関名における管 轄権の主張に関して中立的な立場を とっています。



著作権: © 2022 著者によるものです 。 ライセンシー: MDPI, Basel, Switzerland.この記事は、クリエイ ティブ・コモンズ表示 (CC BY) ライ センンス (https://creativecommons.org/license s/by/4.0/) の条件に基づいて配布され るオープンアクセス記事です。 1.はじめに

2019年に重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)が出現し、その後 COVID-19が世界的に広がったことから、ワクチンの迅速な開発・展開により、 COVID-19パンデミックの進行を食い止める必要性が認識されるようになった。最近の ゲノミクスの進歩は、DNAベースの非反復性ウイルスベクター、およびmRNAベース のワクチンなど、これらの新規ワクチンを作成するための遺伝子ベースの戦略を促進し 、さらに積極的に短縮されたスケジュールで開発されました[1-4]。

WHOの緊急時使用リスト作成手続き(EUL)は、品質、安全性、有効性、実績の 証拠に基づいて医薬品の受け入れ可能性を決定するものであり[5]、これらのワクチンは 開発開始後1~2年で市場に出ることが許可されました。第3相臨床試験の公表された結 果では、重篤な副作用はわずかしか報告されていない[2,6-8]。しかし、その後、重篤な 、あるいは致命的な有害事象が発生する可能性があることが明らかになりました。臨床 医は、患者の有害事象を早期に発見し管理するために、このような症例報告に注意する 必要があります。さらに しかし、COVID-19接種に関連する死亡例については、組織学的な検討も含め、漠然とした状況でも十分な死後調査を検討する必要がある。今回、2種類のCOVID-19ワクチン を合計3回接種し、2回目のmRNA-BNT162bワクチン接種後3週目に死亡した76歳の高齢 者の症例を報告する。剖検と組織学的検査により、予期せぬ新型脳炎と小血管の病理学 的変化を伴う軽度の心筋炎が発見された。これらの所見は、SARS-CoV-2スパイク蛋白 の免疫組織化学的証明により、先行するCOVID-19ワクチン接種との因果関係が確立さ れた.本研究で紹介した方法は、曖昧な症例においてCOVID-19ワクチン接種によるも のか感染によるものかを区別するのに有用であると思われる。

2. 材料と方法

2.1. 定期的な組織検査

ホルマリン固定した組織をルーチンに処理し、パラフィン包埋組織を5µmに切り出 し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)で染色し、組織病理学的検査を行った。

2.2. 免疫組織化学

免疫組織化学的染色は、心臓と脳について、完全自動免疫染色システム(Ventana Benchmark, Roche)を用いて行った。すべての抗体に抗原賦活法(Ultra CC1, Roche Ventana)が用いられた。使用した抗体の標的抗原と希釈倍率を表1にまとめた。一次抗 体とのインキュベーションは、各ケースで30分間行われた。SARS-CoV-2陽性COVID-19 患者の組織は、SARS-CoV-2-spikeおよびnucleocapsidに対する抗体のコントロールとし て使用した(図1)。in vitroでトランスフェクトした培養細胞(以下参照)を、vac-cineに よるスパイクタンパク質発現の検出のための陽性対照として、またヌクレオカプシドタ ンパクの検出のための陰性対照として使用した。スライドを光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE 80i)で観察し、カメラシステムMotic® Europe Motic MP3により代表画像を取 り込んだ。

表1.免疫組織化学に使用した一次抗体。組織切片は、表に記載したように希釈した当該抗体と30 分間インキュベートした。

標的抗原	メーカー	クロー	希釈	インキュベーシ
		ン		ョン時間
CD3 (Tリンパ球が発現する。)	サイトメッド	ZM-45	1:200	30分
CD68(単球系細胞で発現。)	ダコ	PG-M1	1:100	30分
SARS-CoV-2-スパイクサブユニット	プロサーキッ	9083	1:500	30分
1	F			
SARS-CoV-2-ヌクレオキャプシド	プロサーキッ	35-720	1:500	30分
	F			



図1.急性症状のSARS-CoV-2感染者(PCRで確認)の鼻腔塗抹標本。繊毛上皮の存在に注意。2つのSARS-CoV-2抗原(スパイクおよびヌクレオカプシドタンパク質)に対する免疫組織化学的検査では、感染後に予想されるように両者に陽性反応が見られた。(a)スパイクタンパク質の検出。スパイクサブユニット1 SARS-CoV-2タンパク質の検出の陽性対照。鼻粘膜の繊毛上皮の数カ所にDABの茶色い粒状の沈着が見られる(赤矢印)。ヌクレオキャプシドに比べ、DAB顆粒は少なく、DABの粒状沈着が密でない。(b) ヌクレオカプシドタンパク質の検出。ヌクレオカプシドSARS-CoV-2タンパク質の検出のための陽性対照。鼻粘膜のいくつかの繊毛上皮は、免疫組織化学的にDABの密集した茶色がかった粒状の沈着を示す(例の赤い矢印)。スパイク検出と比較すると、DABの顆粒はより細かく、より密に詰まっていることがわかる。倍率は400x.

2.3. ワクチン誘発スパイクタンパク質の免疫組織化学的検出のための陽性対照試 料の調製について

細胞培養とトランスフェクション卵巣癌細胞株(OVCAR-3およびSK-OV3、CSL cell Lines Service、ハイデルベルク、ドイツ)を、Glutamax(Sigma-Aldrich、セント ルイス、米国)、10%FCS(Gibco、上海、中国)およびゲンタマイシン(最終濃度 20µg/mL、Gibco)を補充したDMEM/HAMS-F12培地で平底75cm2細胞培養フラス コ(セルスター)内で70%のコンフルエンスまで培養し、湿式細胞培養器内で37℃、5 %のCO2 で処理した。トランスフェクションのために、培地を完全に除去し、 BNT162b2(ファイザー/バイオテック)の場合には1:500、mRNA-1273(モデナ)、 Vaxzevria(アストラゼネカ)、Jansen(COVID-19ワクチンJansen)の場合には1:100 に希釈した注射液を元の瓶から直接含む2mLの新しい培地で細胞を1時間インキュベー トした。その後、さらに15mLの新鮮な培地を細胞培養物に加え、さらに3日間コンフル エンスまで細胞を増殖させた。

トランスフェクト細胞からの組織ブロックの調製。トランスフェクト細胞から細胞 培養液を除去し、単層をPBSで2回洗浄し、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) 1 mLを加えて トリプシン処理し、PBS/10% FCS 10 mLで収穫し、PBSで2×洗浄し、280×gで10分間ずつ 遠心分離した。細胞ペレットは2 mLのPBS/4%ホルマリンで8℃にて一晩固定し、PBSで 1回洗浄した。遠心分離後に残った細胞ペレットを200µLずつPBSに懸濁し、400µLの2% アガロースin PBS溶液(40℃前後に予冷)と混合し、直ちに小(1cm)ディッシュに移 して固定を行った。固定されアガロース包埋された細胞ペレットは、組織サンプルと並 行してパラフィン包埋を行うまで4%ホルマリン/PBSで保存された。

2.4. 事例紹介と解説

2.4.1. クリニカルヒストリー

本報告は、パーキンソン病(PD)の既往を持つ76歳男性が、3回目のCOVID-19ワ クチン接種後3週間で逝去した症例である。2021年5月の初回接種(ChAdOx1 nCov-19 ベクターワクチン)当日、顕著な循環器系の副作用が出現し、主治医への相談が繰り返 されました。2021年7月の2回目の接種(BNT162b2 mRNAワクチン/Comirnaty)後、 家族は明らかな行動・心理的変化を指摘した(例:もう触られたくない、不安の増大、 無気力、近親者にも社会的引きこもりを経験した)。さらに、PDの症状が著しく悪化 し、重度の運動障害と車椅子のサポートが何度も必要になった。最初の2回のワクチン 接種後もこれらの副作用から完全に回復することはなかったが、それでも2021年12月に 再度ワクチン接種を行った。3回目の接種(BNT162b2の2回目の接種)から2週間後、夕 食時に突然倒れました。驚くべきことに、咳や食べ物の誤嚥の兆候はなく、ただ黙って 倒れていた。その後、多少回復したが、1週間後、再び食事中に突然倒れた。救急隊が 呼ばれ、長時間の蘇生処置が行われたが、成功した。 (1時間以上)、病院に搬送され、直接人工コ・マを入れたが、その後間もなく死亡した 。臨床診断は誤嚥性肺炎による死亡であった。家族によると、過去にCOVID-19の臨床 ・検査診断歴はなかったという。

2.4.2. 解剖

剖検は、生前の症状が曖昧であったため、家族から依頼され承諾したものである。 剖検は巨視的および顕微鏡的調査を含む標準的な手順で行われた。脳(前頭葉皮質、黒 質、ruber核)および心臓(左心室および右心室心臓組織)を含む、組織学的検査用の 肉眼的脳組織が準備された。

3. 結果

3.1. 解剖所見

解剖学的仕様体重、身長、体内器官のスペックは表2の通りであった。

表 2.解剖学的仕様。

項目	測定
体重	60kg
高さ	175cm
心臓の重さ	410 g
脳内重量	1560 g
肝臓重量	1500 g

脳。脳組織の巨視的検査では、右海馬の部位に外接する脳実質の壊死を認めた。黒 質では色素ニューロンの脱落が見られた。顕微鏡的には、左前頭部に炎症性の破片反応 を伴うラクナ壊死の領域がいくつか検出された(図2)。Nucleus ruberをH&Eで染色す ると、神経細胞死、ミクログリア、リンパ球の浸潤が認められた(Figure 3)。さらに 、左右の前頭葉皮質、脳室傍、黒質、核にミクログリアとリンパ球の反応と、時に好中 性顆粒球を含む混合浸潤を伴うリンパ球性血管炎がみられた(図4)。また、脳毛細血 管に炎症性変化が見られる箇所では、内皮内のアポトーシス細胞死の兆候も見られた(図4)。髄膜所見は特記すべきものはなかった。これらの所見は、多巣性壊死性脳炎を 示唆するものであった。さらに、大脳血管に程度の差こそあれ慢性動脈硬化性病変が認 められたが、これについては「血管系」の項で詳しく述べる。

パーキンソン病(PD)。脳組織のマクロ観察および組織学的検査により、色素ニ ューロンの消失を伴う黒質の両側蒼白化が認められた。また、色素を貯蔵するマクロフ ァージや、グリア脱皮反応を伴う神経細胞壊死が散見された。これらの所見はPDを示 唆するものであり、臨床診断を確定するものであった。

胸腔。胸部は漏斗状で、肋骨の連続骨折(右は第2~5肋骨、左は第2~6肋骨)が認められるが、これは心肺蘇生を受けた患者によく見られる像である。気管内チューブは 適切に挿入されていた。左大腿静脈に中心静脈カテーテルを定期的に留置した形跡があった. 左橈骨動脈に動脈カテーテルを定期的に留置した形跡がある。を行った. 尿道カテーテルも挿入されていた。右肩の前面に長さ9cmの皮膚痕があった。

肺。肺の顕微鏡検査では、濁った分泌物や膿性の斑点が見られ、実質は著しく脆く なっていた。胸膜には右側450mL、左側400mLの漿液性胸水が貯留していた。両側の粘 膜膿性気管支炎は、気管と気管支に多量の膿性分泌物を認めた.両側の慢性破壊性肺気 腫が検出された.両側の気管支肺炎は、下肺葉の多段階の展開と葉が分泌物と脆弱な実 質で満たされていることが認められた。さらに、さまざまな程度の慢性動脈硬化性病変 が認められ、これについては「血管系」の項で詳しく述べる。

心臓心臓の巨視的検査では、心房と心室の外反を含む急性および慢性心血管系不全 の症状が認められた。さらに、左室肥大を認めた(壁厚:18mm、心臓重量:410g、体 重:60kg、身長:1.75m)。肺水腫、脳浮腫、脳うっ血、慢性肝うっ血、腎組織浮腫、 下垂体組織浮腫などの組織うっ血(心不全によるものと思われる)を認めた。さらに、 ショック性腎臓障害の証拠もあった。心臓の組織学的検査では、細かい点状の線維化と 組織球浸潤を伴う軽度の心筋炎が認められた(図5)。さらに、「血管系」で詳述する 程度の差はあれ、慢性動脈硬化性病変が見られた。これらに加えて、心臓にはより急性 の心筋と血管の変化が見られた。それらは、泡沫組織球やリンパ球の浸潤、好酸球増多 、心筋細胞の過収縮を特徴とする軽度の心筋炎の徴候から成っていた。さらに、心臓の 毛細血管やその他の細い血管に軽度の急性血管炎が観察された。これらは、軽度のリン パ球-組織球の浸潤、顕著な内皮の腫脹と空胞化、多巣性の筋細胞変性と凝固壊死、およ び単一内皮細胞と血管筋細胞の核分裂で構成されていた(図5)。また、内皮表面に血 漿凝固塊・フィブリン塊の付着が見られることがあり、内皮の損傷を示唆する(図5)

血管系(大血管)。肺動脈は外反とリピドーシスを示した。腎臓ではわずかなび まん性の糸球体硬化と動脈硬化が認められ、腎皮質瘢痕(最大径10mm)を伴っていた 。この所見は全身の動脈硬化と全身性高血圧を示唆するものである。大動脈とその分枝 、冠状動脈などの大動脈には、さまざまな程度の動脈硬化と軽度から中等度の狭窄が認 められました。さらに、頸部動脈に軽度の結節性動脈硬化症が認められた。上行大動脈 ,大動脈弓,胸部大動脈には、中等度の結節性,部分的な石灰化動脈硬化がみられた. 脳底動脈は軽度の動脈硬化を示した.腹部大動脈と腸骨動脈には高度の結節性動脈硬化 と石灰化動脈硬化が、右冠動脈には中等度の狭窄がみられた。冠動脈の検査では、左冠 動脈でより多くの動脈硬化と狭窄が様々な程度で認められた。左冠動脈前下行枝(LAD) は高度の動脈硬化と中等度の狭窄を示した。左回旋動脈(左冠動脈回旋枝)の動脈硬 化と狭窄は軽度であった.軽度の脳底動脈硬化。腹部大動脈と腸骨動脈に高度の結節性 ・石灰化性動脈硬化症。右冠動脈の中等度の狭窄性動脈硬化症.リンパ球性動脈周囲炎 も検出された。



図2.前頭部の脳。全体像(a)ですでに、変性と炎症過程を示す、実質細胞数の増加を伴う顕著な空胞が認められる。高倍率画像(b)では、神経細胞およびグリア細胞のびまん性および帯状死、ミクログリアの活性化、顆粒球およびリンパ球による炎症性浸潤を伴う急性脳障害が確認される。1:神経細胞死(赤い細胞質を持つ細胞)、2:ミクログリアの増殖、3:リンパ球。H&E染色。倍率40×(a)、200×(b)。



図3.脳、神経核。全体像(a)では、炎症とグリア反応が進行していることを示す、細胞数の増加 を伴う顕著な局所的な壊死に注目。高倍率画像(b)では、神経細胞の死滅が明らかであり、グリ ア細胞の増加を伴っている。ミクログリアの活性化と、主にリンパ球系の炎症性細胞浸潤の存在 に注意。1:好酸球増多と細胞核の破壊を伴う神経細胞死と核溶解の徴候(核内容は細胞質内に分 布している);2:ミクログリア(例);3:リンパ球(例)。H&E染色。倍率40×(a)、400×(b)。



図4.脳、脳室周囲血管炎。血管炎の顕著な徴候を示す毛細血管を通る断面図。内皮細胞(5)は腫脹と空胞化を示し、核の肥大化とともに数が増加しており、活性化を示している。さらに、内皮層内には、リンパ球(1)、顆粒球(2)、組織球(4)からなる混合炎症細胞浸潤が存在する。隣接する脳組織にもリンパ球や活性化したミクログリアが存在し、炎症(脳炎)の徴候が見られる(3)。H&E。倍率:200×(a)、400×(b)。



図5.心臓の左心室。(a):間質性浮腫(7)と軽度のリンパ球-組織球浸潤(2+4)を認める。心筋細胞変性の徴候(5)、細胞質の過好酸球と単一収縮帯を伴う。(d):血管壁内のリンパ球浸潤(2)、内皮の腫脹と空胞化(3)、核分裂の兆候を伴う血管筋細胞の空胞化(1)により、急性変性とそれに伴う炎症の兆候を示す動静脈。血管内腔(d)では、内皮表面に付着した血漿凝固・フィブリン塊に注目し、内皮の損傷を示唆する。1:血管筋細胞(pyknotic)、2:リンパ球、3:腫脹した内皮細胞、4:マクロファージ、5:壊死した心筋細胞、6:好酸性顆粒球、7(青線):間質性浮腫。H&E染色。倍率:200倍(a)、(c)、40倍(b)、詳細拡大図(d)。

3.2. その他の所見

- 口腔内:舌筋下の出血を伴う舌咬合を検出(舌咬合はてんかん発作によく見られる)。
- 副腎:両側軽度皮質過形成。
- 結腸:S状結腸が糞便インパクションで細長くなっていた。
- 腎臓:わずかなびまん性糸球体硬化症と動脈硬化症、腎皮質瘢痕(直径最大 10mm)、両側の軽度活動性腎炎と尿嚢炎、およびショック腎の証拠があります。
- 肝臓:わずかなリポフスチン症。
- 脾臓:軽度の急性脾臓炎。
- 胃:軽度のびまん性胃粘膜出血。
- 甲状腺:チョコレート嚢胞(直径0.5cmまで)を伴う両側結節性甲状腺腫。
- 前立腺:良性結節性前立腺肥大症、慢性持続性前立腺炎。

3.3. 免疫組織化学的解析

SARS-CoV-2抗原(スパイク蛋白とヌクレオキャプシド)の存在について、脳と心臓の免疫組織化学的染色を行ったところ、SARS-CoV-2抗原が検出された。脳では、 SARS-CoV-2のスパイク蛋白サブユニット1が壊死部の内皮、ミクログリア、アストロサ イトで検出された(図6、7)。さらに、胸部、腹部大動脈、腸骨枝、脳底動脈に存在す るリンパ球性動脈周囲炎部位でもスパイクタンパク質を確認することができた(図8) 。SARS-CoV-2サブユニット1はマクロファージや血管壁の細胞、特に内皮(図9)、 Nucleus ruber(図10)に見いだされた。一方、SARS-CoV-2のヌクレオキャプシドプロ テインは、対応するどの組織切片にも検出されなかった(図11、12)。また、リンパ球 性心筋炎を示す心臓内皮細胞では、SARS-CoV-2のスパイク蛋白サブユニット1が検出さ れた(図13)。免疫組織化学染色では、SARS-CoV-2ヌクレオキャプシド蛋白は検出されな かった(図14)。



図6.前頭葉の脳。CD68(単球系細胞により発現)の免疫組織化学的染色。CD68陽性ミクログリア細胞の存在する地図状の組織破壊に注目。さらにミクログリアの帯状活性化(茶色の顆粒)。 ミクログリアの活性化は、脳内で組織破壊が起こったことを意味し、マクロファージ(脳内では ミクログリアと呼ばれる)により除去/消去される。茶色の顆粒:マクロファージ/ミクログリ ア。倍率は40×.



図7.脳。ルバー核。CD68(単球系細胞で発現)の免疫組織化学的検査では、豊富な陽性細胞を示し、ミクログリアの帯状活性化を示している(茶色の顆粒)。Mag-nification:40×.



図8.前頭葉の脳。CD3(Tリンパ球に発現)の免疫組織化学的検査により、特に内皮内に多数の CD3陽性リンパ球(茶色の顆粒、赤矢印は一例を示す)が認められるが、脳組織内にもリンパ球 性血管炎と脳炎を示すものが認められる。青点線:血管。倍率:200倍



図9.前頭部の脳。SARS-CoV-2スパイク蛋白の陽性反応。毛細血管を通る断面図(図11と同じ血管、5~20µmの連続切片)。毛細血管内皮細胞(赤矢印)および個々のグリア細胞(青矢印)において茶色の顆粒として検出されるSARS-CoV-2スパイクサブユニット1に対する免疫組織化学反応。倍率:200倍。



図10.脳、核 ruber.毛細血管の膨潤した内皮におけるSARS-CoV-2スパイクタンパク質の豊富な存在は、まばらな単核炎症細胞浸潤を伴う炎症の急性兆候を示す(図12と同じ血管、5~20µmの連続切片)。毛細血管内皮細胞(赤矢印)および個々のグリア細胞(青矢印)において茶色の顆粒として見えるSARS-CoV-2スパイク蛋白サブユニット1に対する免疫組織化学的実証。倍率:200倍



図11.前頭部の脳。SARS-CoV-2ヌクレオカプシド蛋白の免疫組織化学反応陰性。毛細血管を通る 断面図(図9と同じ血管、5~20µmの連続切片)。倍率:200倍。



図12.脳、ヌクレオール。SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質に対する免疫組織化学反応 陰性。毛細血管を通る断面(図11に示したものと同じ血管、5~20µmの連続切片)。倍率:200倍



図13.心臓左心室。SARS-CoV-2スパイク蛋白の陽性反応。毛細血管を通る断面(図14と同じ血管、5~20µmの連続切片)。SARS-CoV-2スパイクサブユニット1が茶色の顆粒であることを組織化学的に証明する。毛細血管内皮細胞におけるスパイクタンパク質の豊富な存在(赤矢印)、顕著な内皮の腫脹および少数の単核炎症細胞の存在に注意。Mag-nification:400×.



図14.心臓の左心室。SARS-CoV-2 ヌクレオカプシドタンパク質に対する免疫組織化学反応陰性。 毛細血管を通る断面(図13と同じ血管、5~20µmの連続切片)。倍率は400×.

3.4. 剖検に基づく診断

76歳の死亡した男性患者はPDであり、典型的な死後所見に相当する。主な死因は 再発性の誤嚥性肺炎であった.また,壊死性脳炎と血管炎が死亡の主要因と考えられた .さらに、心筋線維化を伴う軽度のリンパ組織球性心筋炎と全身性動脈硬化症が認めら れ、これらも高齢者の体調悪化の一因となったであろう。

最終診断は、両側気管支肺炎(J18.9)、Parkin- son病(G20.9)、壊死性脳炎(G04.9)、心筋炎(I40.9)の断端でした。

SARS-CoV-2抗原(スパイク蛋白とヌクレオキャプシド)の免疫組織化学的解析に より、壊死性脳炎を伴う病変や小血管(脳、心臓)の急性炎症性変化には、スパイク蛋 白SARS-CoV-2サブユニット1が豊富に含まれていることが判明した.SARS-CoV-2のヌ クレオキャプシド蛋白は一貫して存在しなかったので、罹患組織におけるスパイク蛋白 の存在はSARS-CoV-2の感染によるものではなく、むしろ遺伝子ベースのCOVID-19ワク チンによる組織へのトランスフェクションによるものと考えなければならない。重要な ことは、スパイク蛋白は急性炎症反応のある部位(脳、心臓、小血管)、特に内皮細胞 、ミクログリア、アストロサイトでのみ証明されたことである。このことは、スパイク 蛋白がこの患者の病変の発生と病気の経過に少なくとも一役買っている可能性を強く示 唆している。

4. ディスカッション

本例は、3回目のCOVID-19ワクチン接種から3週間後に死亡した76歳のパーキンソン病(PD)患者の症例報告である.死因は誤嚥性肺炎の再発とされたが、これは確かにPDによく見られることである[14,15].しかし、詳細な剖検調査によって、特に新生児脳炎と心筋炎という新たな病理学的所見が明らかになった.心筋炎の病理組織学的徴候は比較的軽度であったが、脳炎は顕著な多巣性壊死をもたらし、致命的な転帰につながった可能性がある.脳炎はしばしばてんかん発作を引き起こすが、剖検時に見つかった舌の咬傷は、本症例のてんかん発作の原因となったことを示唆している。

の症例です。COVID-19ワクチンによる脳炎でてんかん重積状態を呈した症例は過去に数 例報告されている[16-18].

本症例の臨床経過では、COVID-19ワクチン接種と相関するいくつかの顕著な事象 が認められた. 2021年5月の初回接種(ChAdOx1 nCov-19ベクターワクチン)当日から すでに心血管系の症状が出現し、医療的ケアを必要とし、その回復も緩やかなものであ った. 2021年7月の2回目のワクチン接種(BNT162b2 mRNAワクチン)後、家族は顕著 な行動・心理的変化を認め、PD症状の著しい進行が突然始まり、重度の運動障害と車 椅子でのサポートが繰り返し必要な状態に陥りました。ここから完全に回復することは ありませんでしたが、それでも2021年12月に再びワクチン接種を行いました。この3回 目の接種(BNT162b2の2回目の接種)の2週間後、夕食をとっているときに突然倒れた 。驚くべきことに、咳などの食物誤嚥の兆候はなく、ただ椅子から倒れただけであった 。このため、この突然の倒れは本当に誤嚥性肺炎によるものなのか、という疑問が生じ た。激しい再救命処置の後、多少は回復したが、1週間後、再び食事中に突然無言で倒 れた。誘惑で蘇生に成功したが、長引いた後、病院に移され、そのまま人工的な昏睡状 態になったが、間もなく死亡した。臨床診断は誤嚥性肺炎による死亡であった。COVID ワクチン接種後の症状が曖昧であったため、家族は解剖を依頼した。脳と心臓の変化パ ターンから、特に小血管、特に内皮が冒されていると思われた。内皮機能異常は、ウイ ルス感染時の凝固促進状態、微小血管の漏出、臓器虚血を誘発し、臓器機能障害に大き く関与することが知られている[19,20]。これは重症のSARS-CoV-2感染においても同様 で、ウイルスとそのスパイクタンパク質に全身的にさらされると、内皮細胞が重要な役 割を果たす強い免疫反応が起こり、血管機能障害、免疫血栓症、炎症が引き起こされま す[21]。

この患者にはCOVID-19の既往はなかったが,SARS-CoV-2抗原(スパイク蛋白と ヌクレオカプシド蛋白)の免疫組織化学的検査が行われた.スパイク蛋白は脳(特に毛 細血管内皮)と心臓の小血管の急性炎症部位で実際に確認できた。しかし、注目すべき は、ヌクレオキャプシドが一様に存在しないことである。ウイルスに感染すると、両方 のタンパク質が一緒に発現し、検出されるはずである。一方,遺伝子型COVID-19ワク チンはスパイク蛋白のみをコードしているので,今回の症例で心臓と脳にスパイク蛋白 のみ(ヌクレオカプシド蛋白はない)が認められたのは,感染ではなくワクチン接種に よるものであると思われる.このことは、3回のワクチン接種(3回目は死亡の3週間前) を受けたが,感染症の検査や臨床診断が陽性でなかったという患者の病歴と一致して いる.

ワクチン反応と自然感染の識別は重要な問題であり、臨床免疫学ではすでに抗スパ イクおよび抗ヌクレオカプシドタンパク質ベースの血清検査を併用することが有用なツ ールとして証明されていた[22]。しかし、組織学においては、この免疫組織化学的アプ ローチはまだ報告されていないが、これは簡単で、剖検または生検試料におけるSARS-CoV-2スパイクタンパク質の潜在的起源を特定するのに非常に有用であると思われる。 さらに確認が必要な場合、例えば法医学的な状況では、rt-PCR法を用いて、罹患組織に おけるワクチンmRNAの存在を確認することができるかもしれない[23,24]。

今回のケースで、スパイクタンパクの存在が本当に遺伝子ベースのワクチンによっ て引き起こされたと仮定すると、付随する急性組織変化や炎症の原因もこれだったのか 、という疑問が生じます。遺伝子ベースのワクチンの目的は、スパイク蛋白に対する免 疫反応を引き起こすことだと言われています。しかし、このような免疫応答は、スパイ クタンパク質に対する抗体形成だけでなく、この外来抗原を発現する細胞に対する直接 的な細胞および抗体媒介性の細胞傷害をもたらすことになる。さらに、スパイク蛋白質 はそれ自体で、特に血管の周皮細胞や内皮細胞に対して明確な毒性を誘発することが示 唆されている[25,26]。 スパイクタンパク質の発現とそれに伴う細胞や組織の損傷は注射部位に限定される と広く考えられていますが、いくつかの研究では、注射後3ヶ月まで注射部位からかな り離れた場所にワクチンmRNAやそれにコードされたスパイクタンパク質があることが 分かっています[23,24,27-29]。また、mRNA-COVID-19ワクチンBNT162b2を用いたラッ トの生体内分布研究により、ワクチンが注射部位にとどまらず、脳を含むすべての組織 や臓器に分布することが示されました[30]. ヒトにおけるCOVID-19ワクチンの世界的な 展開後、ヒトにおいても、注射部位(三角筋)から離れたいくつかの組織でspikeタン パク質が検出されている.例えば、心筋炎患者の心筋生検[28]、筋炎患者の骨格筋[23]、皮膚ではmRNA-COVID-19ワクチン接種後の帯状疱疹病変の突発と関連していた [29].

この患者の基礎疾患はパーキンソン病であり、脳炎や死後検査で検出された心筋炎 にパーキンソン病が関与していたとすれば、それはどのようなものだったのだろうかと 考えることができる。今回の症例では、脳炎が急性であったのに対し、PDは長期にわ たる経過をたどっていた。逆に、PDが二次性壊死性脳炎を引き起こしたというもっと もらしいメカニズムや症例報告はない。一方、COVID-19ワクチン接種後に自己免疫性 脳炎や頭蓋脊髄炎を発症した症例は多数報告されている[12,31]. 中枢神経系以外の臓器 における自己免疫疾患も報告されており、例えばmRNAワクチン接種後に急性散在性脳 脊髄炎、重症筋無力症、甲状腺炎という複数の自己免疫疾患を一度に発症した症例が印 象的であった[32]. ここで紹介する症例では、スパイク蛋白は主に血管内皮とグリア細 胞にまばらに検出され、神経細胞には検出されなかったことに注意されたい。しかしな がら、神経細胞死は脳病巣に広く認められ、観察された細胞および組織障害に免疫学的 バイスタンダー活性化、すなわち自己免疫の寄与が示唆された。

心筋症の発症にPDが寄与していることは実際に証明されており、絶対的に否定す ることはできない。しかし、今回の症例のように、小血管の病的変化を伴う炎症性心筋 症はまれである。むしろ、PD患者における心不全の最も顕著な原因は、心臓の自律神 経機能障害に起因するものである [33,34] 。PDは左心室肥大および拡張機能障害の増加 と有意に関連しているようである [34] 。本症例では、心室の拡張と肥大が認められた が、むしろ慢性高血圧の顕性徴候に関連しているようであった。一方、心筋の炎症反応 は、多くの症例で遺伝子ベースのCOVID-19ワクチン接種とよく関連していた[9,35-37] 。ある症例では、SARS-CoV-2のスパイク蛋白がワクチン接種者の心臓で免疫組織化学 的に証明されたこともある[28]。

5. 結論

遺伝子組換え型COVID-19ワクチンとの関連で,脳炎や脳脊髄炎が多数報告されて おり,その多くはワクチン接種との因果関係があると考えられている[31,38,39].しかし 、今回の報告は、脳炎病巣内にスパイク蛋白が存在することを証明し、感染ではなくワ クチン接種に起因するとした最初の報告である。これらの知見は、遺伝子ベースの COVID-19ワクチンの原因的役割を裏付けるものであり、この診断法は、他の臓器への ワクチン誘発性障害にも関連する可能性がある。

資金提供この研究は、特に資金援助を受けていません。

インスティテューショナル・レビュー・ボード (Institutional Review Board) の声明ザクセン州 医学会議 (Ethikkommission Landesärztekammer Sachsen) によると、権利者からインフォーム ドコンセントを得て、すべてのデータが匿名化されていれば、au-topsyのケースレポートには明 確な倫理承認は必要ない。 **インフォームド・コンセントの表明**この症例報告に関わる被験者の権利者からインフォームドコン セントを取得した。

データ利用可能性ステートメント。データはリクエストに応じて提供します。

謝辞本論文の作成にあたり、貴重なコメントと示唆をいただいたHany A. SalemとDavid O. Fischer に感謝の意を表したい。

利益相反著者は、利益相反がないことを宣言する。

参考文献

- 1. Chen, W.-H.; Strych, U.; Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline.概要。概要*Curr.Trop.Med.Rep.* 2020, 1-4。https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6。
- 2. Sultana, J.; Mazzaglia, G.; Luxi, N.; Cancellieri, A.; Capuano, A.; Ferrajolo, C.; de Waure, C.; Ferlazzo, G.; Trifirò, G. COVID-19 予防に関するワクチン接種の潜在効果。COVID-19の予防におけるワクチン接種の潜在的効果:根拠、臨床的証拠、リスク、 および公衆衛生上の考慮事項。*Expert Rev. Vaccines* **2020**, *19*, 919-936。https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1825951。
- 3. WHO COVID-19 ワクチン トラッカー と 風景。 利用可能 online: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (accessed on 2 June 2022).
- 4. Lurie, N.; Saville, M.; Hatchett, R.; Halton, J. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed (パンデミック速度でコビド 19ワクチンを開発する)。*N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1969-1973。https://doi.org/10.1056/NEJMp2005630。
- 5. 世界保健機関(WHO)。診断ラボラトリー緊急使用リスト。オンラインで利用可能: https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul (accessed on 2 June 2022).
- 6. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. mRNA-1273 SARS-CoV-2 ワクチンの有効性と安全性について.N. Engl. J. Med.2021, 384, 403-416。 https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389。
- 7. O'Reilly, P. COVID-19 に対するワクチンを検討するための第 III 相試験。 ISRCTN 2020. https://doi.org/10.1186/ISRCTN89951424.
- 8. COVID-19の病理所見に関するシステマティック・レビュー.病態生理学的年表と疾患進行の可能なメカニズム。 *Mod.Pathol.*2020, 33, 2128-2138。https://doi.org/10.1038/s41379-020-0603-3。
- 9. Choi, S; Lee, S; Seo, J.-W; Kim, M.-J; Jeon, Y.H; Park, J.H; Lee, J.K; Yeo, N.S. 韓国におけるBNT162b2 mRNA COVID-19 ワクチン接種後の心筋炎による急死。病理組織学的所見を中心とした症例報告. J. Korean Med.Sci. 2021, 36, e286. https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e286.
- 10. Fillon, A; Sautenet, B; Barbet, C; Moret, L; Thillard, E.M.; Jonville-Béra, A.P.; Halimi, J.M. COVID-19 ワクチン接種後のデノボ および再発性壊死性血管炎。*Clin.Kidney J.* **2022**, *15*, 560-563。https://doi.org/10.1093/ckj/sfab285。
- 11. Gao, J.-J.; Tseng, H.-P.; Lin, C.-L.; Hsu, R.-F.; Lee, M.-H.; Liu, C.-H.。COVID-19ワクチン接種後の急性脳炎. 症例報告および 文献レビュー. *Hum.Vaccines Immunother*.2022, 2082206. https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2082206.
- Jarius, S.; Bieber, N.; Haas, J.; Wildemann, B. 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2型(SARS-CoV-2)予防接種後のMOG脳 脊髄炎。症例報告および文献の包括的レビュー. J. Neurol.2022, 269, 5198-5212。https://doi.org/10.1007/s00415-022-11194-9。
 13. 押田 聡、赤松 祐樹、松本 祐樹、鈴木 孝夫、佐々木 孝、近藤 祐樹、藤原 聡、樫村 弘、久保 義人、小笠原 孝。 K.抗COVID-19 mRNAワクチン接種後3日以内に頭蓋内動脈瘤が破裂した。3症例の報告。

外科Neurol.Int. 2022, 13, 117. https://doi.org/10.25259/SNI_1144_2021.

- 14. Won, J.H.; Byun, S.J.; Oh, B.-M.; Park, S.J.; Seo, H.G. Parkinson's diseaseにおける誤嚥性肺炎のリスクと死亡率。全国規模のデ ータベース研究。*Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6597. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86011-w.
- 15. 松本 裕之、仙石 亮、齋藤 祐子、角田 佳代子、村山 聡、今福 一郎:パーキンソン病における突然死。パーキンソン病における突然死:レトロスペクティブな剖検研究. J. Neurol. Sci. 2014, 343,149-152。https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.05.060。
- 16. Fan, H.-T.; Lin, Y.-Y.; Chiang, W.-F.; Lin, C.-Y.; Chen, M.-H.; Wu, K.-A.; Chan, J.-S.; Kao, Y.-H.; Shyu, H.-Y.; Hsiao, P.-J. COVID-19ワクチンによる脳炎とてんかん重積状態。*QJM Mon.J. Assoc. Physicians* **2022**, *115*, 91-93。 https://doi.org/10.1093/qjmed/hcab335。
- 17. Liu, B.D.; Ugolini, C.; Jha, P. Two Cases of Post-Moderna COVID-19 Vaccine Encephalopathy Associated With Nonconvulsive Status Epilepticus (非痙攣性てんかんを伴うCOVID-19ワクチン脳症の2例). *Cureus* 2021, 13, e16172。 https://doi.org/10.7759/cureus.16172。
- 18. Werner, J.; Brandi, G.; Jelcic, I.; Galovic, M. SARS-CoV-2ワクチン接種後の自己免疫性脳炎による新型難治性てんかん状態:最初のケースレポートです。Front.Neurol.2022, 13, 946644. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.946644.
- 19. 動脈閉塞性血栓症(Kim, D.; Bresette, C.; Liu, Z.; Ku, D.N. APL Bioeng. 2019, 3, 041502. https://doi.org/10.1063/1.5115554.
- 20. Ludewig, B.; Zinkernagel, R.M.; Hengartner, H. Arterial inflammation and atherosclerosis(動脈硬化と炎症).*Trends Cardiovasc.Med.* **2002**, *12*, 154-159. https://doi.org/10.1016/s1050-1738(01)00166-9.
- 21. Pons, S.; Fodil, S.; Azoulay, E.; Zafrani, L. 血管内皮。重症SARS-CoV-2感染における臓器機能不全の礎石。*Crit.Care Lond.Engl.* 2020, 24, 353. https://doi.org/10.1186/s13054-020-03062-7.

- Dörschug, A.; Frickmann, H.; Schwanbeck, J.; Yilmaz, E.; Mese, K.; Hahn, A.; Groß, U.; Zautner, A.E. S-Gene RNA-based SARS-CoV-2 Vaccination後の個人からの血清のスパイク-タンパク質-ベースおよび核キャップシッド-ベースの血清学アセス メントによる比較評価(Transparent Assessment- ment with Sigma, Nucleocap- Based Serological Assays). *Diagnostics* 2021, 11, 426. https://doi.org/10.3390/diagnostics11030426.
- 23. Magen, E; Mukherjee, S; Bhattacharya, M; Detroja, R; Merzon, E; Blum, I; Livoff, A; Shlapobersky, M; Baum, G; Talisman, R; et al. BNT162b2 mRNA COVID-19 ワクチン関連筋炎の稀なケースの臨床的および分子的特徴付け(Philips of a rare case of BNT162b2 mRNA Covids-19 Vaccine-Associated Myositis)。*Vaccines* **2022**, *10*, 1135. https://doi.org/10.3390/vaccines10071135.
- 24. Röltgen, K; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M; Costales, C.; Yang, F; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. ヒ ト SARS-CoV-2 感染および vac- cination における免疫インプリント、変異体認識の幅、胚中心応答。*Cell* **2022**, *185*, 1025-1040.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018.
- Lei, Y; Zhang, J; Schiavon, C.R.; He, M; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE2. *bioRxiv* 2020, bioRxiv: 2020.12.04.409144. https://doi.org/10.1101/2020.12.04.409144.
- SARS-CoV-2スパイクタンパク質は、CD147レセプターを介したシグナル伝達により、ヒト心臓周皮細胞の機能を破壊することが明らかになった。COVID-19微小血管疾患の非感染性メカニズムの可能性。 *臨床.Sci.* 2021, 135, 2667-2689。 https://doi.org/10.1042/CS20210735。
- 27. Bansal, S.; Perincheri, S.; Fleming, T.; Poulson, C.; Tiffany, B.; Bremner, R.M.; Mohanakumar, T. Cutting Edge: An-tibody開発 前にBNT162b2 (ファイザー-バイオNTech) ワクチンによってCOVID Spike Proteinを有する循環エクソソームが誘導された こと。mRNA ワクチンによる免疫活性化の新たなメカニズム。J. Immunol.Baltim.Md 1950 2021, 207, 2405-2410。 https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637。
- 28. Baumeier, C; Aleshcheva, G; Harms, D; Gross, U; Hamm, C; Assmus, B; Westenfeld, R; Kelm, M; Rammos, S; Wenzel, P.; et al. COVID-19 ワクチン接種後の心筋内炎症について:心筋内生検による証明されたケースシリーズ。心筋内生検で証明された ケースシリーズ。*Int.J. Mol.Sci.* 2022, 23, 6940. https://doi.org/10.3390/ijms23136940.
- COVID-19ワクチン接種後の水痘帯状疱疹ウイルス感染の持続と病変部におけるコード化スパイク蛋白の存在. J. Cutan.Immunol.Allergy 2022, n/a. https://doi.org/10.1002/cia2.12278.
- 30. TGA Therapeutic Goods Administration, オーストラリア政府 2021:BNT162b2 [mRNA] COVID-19ワクチン(COMIRNATY™)の非臨床評価報告書 提出番号: PM-2020-05461-1-2 スポンサー: Pfizer Australia Pty Ltd. https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-2389-06.pdf.(2022年6月2日にアクセス)
- 31. Ancau, M.; Liesche-Starnecker, F.; Niederschweiberer, J.; Krieg, S.M.; Zimmer, C.; Lingg, C.; Kumpfmüller, D.; Ikenberg, B.; Ploner, M.; Hemmer, B.; et al. ケースシリーズ: SARS-CoV-2ワクチン接種後の急性出血性脳脊髄炎。SARS-CoV-2ワクチン接種後の急性出血性脳脊髄炎. *Front.Neu- rol.*2021, *12*, 820049. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.820049.
- 32. メッセンジャーリボ核酸を用いた COVID-19 ワクチン接種後,急性散在性脳脊髄炎,重症筋ジストロフィー,甲状腺炎を含む複数の自己免疫症候群を発症した.症例報告。Front.Neu- rol.2022, 13, 913515. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.913515.
- 33. Scorza, F.A.; Fiorini, A. C.; Scorza, C. A.; Finsterer, F.: Cardiac abnormalities in Parkinson's disease and Parkinsonism.J. *Clin.Neurosci.***2018** Jul;53:1-5.DOI: 10.1016/j.jocn.2018.04.031
- 34. Piqueras-Flores J.; López-García, A.; Moreno-Reig, Á.; González-Martínez, A.; Hernández-González, A.; Vaamonde-Gamo, J.; Alfonso Jurado-Románet, A.: Parkinson's disease における心臓の構造的・機能的変化. *Neurol.Res.* 2018; 40(1):53-61。 https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1390933。
- 35. Burstein, B.; Barbosa, R.S.; Samuel, M.; Kalfon, E.; Philippon, F.; Birnie, D.; Mangat, I.; Redfearn, D.; Sandhu, R.; Macle, L.; et al. 電気生理処置後の静脈血栓症の予防法について。電気生理学的処置後の静脈血栓症の予防:国内診療の調査。J. Interv.Card. 電 気生理。J. Arrhythm.J. Arrhythm.Pacing **2018**, 53, 357-363。https://doi.org/10.1007/s10840-018-0461-9。
- 36. Kang, H.K.; Rhodes, C.; Rivers, E.; Thornton, C.P.; Rodney, T. 米国の大学学部生における精神健康障害の有病率。日本精神科 看護学会誌J. Psychosoc.Ment.Health Serv.2021, 59, 17-24。https://doi.org/10.3928/02793695-20201104-03。
- 37. Sung, J.G.; Sobieszczyk, P.S.; Bhatt, D.L. COVID-19ワクチン接種後24時間以内の急性心筋梗塞の発生。Am.J. Cardiol.2021, 156, 129-131。https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2021.06.047。
- 38. 多施設共同ケースコントロール研究。 *を発表した。 J. Nurs.Stud.*2021, 114, 103825. https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2020.103825.
- 39. Walter, A.; Kraemer, M. Comirnaty ワクチン接種後の神経科医の菱形脳炎。視点の変化。Neurol.Res. Pract.2021, 3, 56. https://doi.org/10.1186/s42466-021-00156-7.





A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against COVID-19

Michael Mörz

Case Report

Institute of Pathology 'Georg Schmorl', The Municipal Hospital Dresden-Friedrichstadt, Friedrichstrasse 41, 01067 Dresden, Germany; michael.moerz@klinikum-dresden.de

Abstract: The current report presents the case of a 76-year-old man with Parkinson's disease (PD) who died three weeks after receiving his third COVID-19 vaccination. The patient was first vaccinated in May 2021 with the ChAdOx1 nCov-19 vector vaccine, followed by two doses of the BNT162b2 mRNA vaccine in July and December 2021. The family of the deceased requested an autopsy due to ambiguous clinical signs before death. PD was confirmed by post-mortem examinations. Furthermore, signs of aspiration pneumonia and systemic arteriosclerosis were evident. However, histopathological analyses of the brain uncovered previously unsuspected findings, including acute vasculitis (predominantly lymphocytic) as well as multifocal necrotizing encephalitis of unknown etiology with pronounced inflammation including glial and lymphocytic reaction. In the heart, signs of chronic cardiomyopathy as well as mild acute lympho-histiocytic myocarditis and vasculitis were present. Although there was no history of COVID-19 for this patient, immunohistochemistry for SARS-CoV-2 antigens (spike and nucleocapsid proteins) was performed. Surprisingly, only spike protein but no nucleocapsid protein could be detected within the foci of inflammation in both the brain and the heart, particularly in the endothelial cells of small blood vessels. Since no nucleocapsid protein could be detected, the presence of spike protein must be ascribed to vaccination rather than to viral infection. The findings corroborate previous reports of encephalitis and myocarditis caused by gene-based COVID-19 vaccines.

Keywords: COVID-19 vaccination, necrotizing encephalitis, myocarditis, detection of spike protein, detection of nucleocapsid protein, autopsy

1. Introduction

The emergence of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 2019 with the subsequent worldwide spread of COVID-19 gave rise to a perceived need for halting the progress of the COVID-19 pandemic through the rapid development and deployment of vaccines. Recent advances in genomics facilitated gene-based strategies for creating these novel vaccines, including DNA-based nonreplicating viral vectors, and mRNA-based vaccines, which were furthermore developed on an aggressively shortened timeline [1–4].

The WHO Emergency Use Listing Procedure (EUL), which determines the acceptability of medicinal products based on evidence of quality, safety, efficacy, and performance [5], permitted these vaccines to be marketed as soon as 1–2 years after development had begun. Published results of the phase 3 clinical trials described only a few severe side effects [2,6–8]. However, it has since become clear that severe and even fatal adverse events may occur; these include in particular cardiovascular and neurological manifestations [9–13]. Clinicians should take note of such case reports for the sake of early detection and management of such adverse events among their patients. In addi-

Citation: Mörz, M. A Case Report: Multifocal Necrotizing Encephalitis and Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccination against COVID-19. *Vaccines* **2022**, *10*, 1651. https://doi.org/10.3390/ vaccines10101651

Academic Editor: Sung Ryul Shim

Received: 31 August 2022 Accepted: 27 September 2022 Published: 1 October 2022

Publisher'sNote:MDPIstaysneutral with regard to jurisdictionalclaims in published maps andinstitutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/license s/by/4.0/). tion, a thorough post-mortem examination of deaths in connection with COVID-19 vaccination should be considered in ambiguous circumstances, including histology. This report presents the case of a senior aged 76 years old, who had received three doses overall of two different COVID-19 vaccines, and who died three weeks after the second dose of the mRNA-BNT162b-vaccine. Autopsy and histology revealed unexpected necrotizing encephalitis and mild myocarditis with pathological changes in small blood vessels. A causal connection of these findings to the preceding COVID-19 vaccination was established by immunohistochemical demonstration of SARS-CoV-2 spike protein. The methodology introduced in this study should be useful for distinguishing between causation by COVID-19 vaccination or infection in ambiguous cases.

2. Materials and Methods

2.1. Routine Histology

Formalin-fixed tissues were routinely processed and paraffin-embedded tissues were cut into 5 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examination.

2.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on the heart and brain, using a fully automated immunostaining system (Ventana Benchmark, Roche). An antigen retrieval (Ultra CC1, Roche Ventana) was used for every antibody. The target antigens and dilution factors for the antibodies used are summarized in Table 1. Incubation with the primary antibody was carried out for 30 min in each case. Tissues from SARS-CoV-2-positive COVID-19 patients were used as a control for the antibodies against SARS-CoV-2-spike and nucleocapsid (Figure 1). Cultured cells that had been transfected in vitro (see hereafter) served as a positive control for the detection of vaccine-induced spike protein expression and as a negative control for the detection of nucleocapsid protein. The slides were examined with a light microscope (Nikon ECLIPSE 80i) and representative images were captured by the camera system Motic[®] Europe Motic MP3.

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry. Tissue sections were incubated 30 min with the antibody in question, diluted as stated in the table.

Target Antigen	Manufacturer	Clone	Dilution	Incubation Time
CD3 (expressed by T-Lymphocytes)	cytomed	ZM-45	1:200	30 min
CD68 (expressed by monocytic cells)	DAKO	PG-M1	1:100	30 min
SARS-CoV-2-Spike subunit 1	ProSci	9083	1:500	30 min
SARS-CoV-2-Nucleocapsid	ProSci	35-720	1:500	30 min



Figure 1. Nasal smear from a person with acute symptomatic SARS-CoV-2-infection (confirmed by PCR). Note the presence of ciliated epithelium. Immunohistochemistry for two SARS-CoV-2 antigens (spike and nucleocapsid protein) revealed a positive reaction for both as to be expected after infection. (a) Detection of the spike protein. Positive control for spike subunit 1 SARS-CoV-2 protein detection. Several ciliated epithelia of the nasal mucosa show brownish granular deposits of DAB (red arrow). Compared to nucleocapsid, the DAB-granules are fewer and less densely packed granular deposits of DAB. (b) Detection of nucleocapsid protein. Positive control for nucleocapsid SARS-CoV-2 protein detection. Several ciliated epithelia of the nasal mucosa show dense brownish granular deposits of DAB in immunohistochemistry (examples red arrows). Compared to spike detection, the granules of DAB are finer and more densely packed. Magnification: 400x.

2.3. Preparation of Positive Control Samples for the Immunohistochemical Detection of the Vaccine-Induced Spike Protein

Cell culture and transfection: Ovarian cancer cell lines (OVCAR-3 and SK-OV3, CSL cell Lines Service, Heidelberg, Germany) were grown to 70% confluence in flat bottom 75 cm² cell culture flasks (Cell star) in DMEM/HAMS-F12 medium supplemented with Glutamax (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% FCS (Gibco, Shanghai, China) and Gentamycin (final concentration 20 μ g/mL, Gibco), at 37 °C, 5% CO₂ in a humidified cell incubator. For transfection, the medium was completely removed, and cells were incubated for 1 h with 2 mL of fresh medium containing the injection solutions directly from the original bottles, diluted 1:500 in the case of BNT162b2 (Pfizer/Biotech), and 1:100 in cases of mRNA-1273 (Moderna), Vaxzevria (AstraZeneca), and Jansen (COVID-19 vaccine Jansen). Then, another 15 mL of fresh medium was added to the cell cultures and cells were grown to confluence for another 3 days.

Preparation of tissue blocks from transfected cells: The cell culture medium was removed from transfected cells, and the monolayer was washed twice with PBS, then trypsinized by adding 1 mL of 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco), harvested with 10 mL of PBS/10% FCS, and washed 2× with PBS and centrifugation at $280 \times g$ for 10 min each. Cell pellets were fixed overnight in 2 mL in PBS/4% Formalin at 8 °C and then washed in PBS once. The cell pellets remaining after centrifugation were suspended in 200 µL PBS each, mixed with 400 µL 2% agarose in PBS solution (precooled to around 40 °C), and immediately transferred to small (1 cm) dishes for fixation. The fixed and agarose-embedded cell pellets were stored in 4% Formalin/PBS till subjection to routine paraffin embedding in parallel to tissue samples.

2.4. Case Presentation and Description

2.4.1. Clinical History

This report presents the case of a 76-year-old male with a history of Parkinson's disease (PD) who passed away three weeks after his third COVID-19 vaccination. On the day of his first vaccination in May 2021 (ChAdOx1 nCov-19 vector vaccine), he experienced pronounced cardiovascular side effects, for which he repeatedly had to consult his doctor. After the second vaccination in July 2021 (BNT162b2 mRNA vaccine/Comirnaty), the family noted obvious behavioral and psychological changes (e.g., he did not want to be touched anymore and experienced increased anxiety, lethargy, and social withdrawal even from close family members). Furthermore, there was a striking worsening of his PD symptoms, which led to severe motor impairment and a recurrent need for wheelchair support. He never fully recovered from these side effects after the first two vaccinations but still got another vaccination in December 2021. Two weeks after the third vaccination (second vaccination with BNT162b2), he suddenly collapsed while taking his dinner. Remarkably, he did not show coughing or any signs of food aspiration but just fell down silently. He recovered from this more or less, but one week later, he again suddenly collapsed silently while taking his meal. The emergency unit was called, and after successful, but prolonged resuscitation attempts (over one hour), he was transferred to the hospital and directly put into an artificial coma but died shortly thereafter. The clinical diagnosis was death due to aspiration pneumonia. According to his family, there was no history of a clinical or laboratory diagnosis of COVID-19 in the past.

2.4.2. Autopsy

The autopsy was requested and consented to by the family of the patient because of the ambiguity of symptoms before his death. The autopsy was performed according to standard procedures including macroscopic and microscopic investigation. Gross brain tissue was prepared for histological examination including the brain (frontal cortex, Substantia nigra, and Nucleus ruber) as well as the heart (left and right ventricular cardiac tissue).

3. Results

3.1. Autopsy Findings

Anatomical Specifications: Body weight, height, and specifications of body organs were summarized in Table 2.

Table 2. Anatomical Specifications.

Item	Measure
Body weight	60 kg
Hight	175 cm
Heart weight	410 g
Brain weight	1560 g
Liver weight	1500 g

Brain: A macroscopic examination of brain tissue revealed a circumscribed segmental cerebral parenchymal necrosis at the site of the right hippocampus. Substantia nigra showed a loss of pigmented neurons. Microscopically, several areas with lacunar necrosis were detected with inflammatory debris reaction on the left frontal side (Figure 2). Staining of Nucleus ruber with H&E showed neuronal cell death, microglia, and lymphocyte infiltration (Figure 3). Furthermore, there were microglial and lymphocytic reactions as well as predominantly lymphocytic vasculitis, sometimes with mixed infiltrates including neutrophilic granulocytes (Figure 4) in the frontal cortex, paraventricular, Substantia nigra, and Nucleus ruber on both sides. In some places with inflammatory changes in brain capillaries, there were also signs of apoptotic cell death within the endothelium (Figure 4). Meninges' findings were unremarkable. The collective findings were suggestive of multifocal necrotizing encephalitis. Furthermore, chronic arteriosclerotic lesions of varying degrees were noted in large brain vessels, which are described in detail in section "Vascular system".

Parkinson's disease (PD): Macroscopic and histological examination of brain tissue revealed bilateral pallor of the substantia nigra with loss of pigmented neurons. In addition, pigment-storing macrophages as well as scattered neuronal necrosis with glial debris reaction were noted. These findings were suggestive of PD, confirming the clinical diagnosis.

Thoracic cavity: An examination of the chest showed a funnel-shaped chest with serial rib fractures (extending from the second to fifth ribs on the right, and from the second to sixth ribs on the left); which is a common picture of a patient who underwent cardiopulmonary resuscitation. An endotracheal tube was properly inserted. There was evidence of regular placement of a central venous catheter in the left femoral vein. There was evidence of regular placement of an arterial catheter in the left radial artery. The urinary catheter was inserted as well. There was a 9 cm long skin scar on the front of the right shoulder.

Lungs: Macroscopical lung examination revealed cloudy secretion and purulent spots with notably brittle parenchyma. The pleura showed bilateral serous effusion, amounting to 450 mL of fluid on the right side and 400 mL on the left side. Bilateral mucopurulent tracheobronchitis was evident with copious purulent secretion in the trachea and bronchi. Bilateral chronic destructive pulmonary emphysema was detected. Bilateral bronchopneumonia was noted in the lower lung lobes at multiple stages of development and lobe-filling with secretions and fragile parenchyma. Furthermore, chronic arteriosclerotic lesions of varying degrees were noted, which are described in detail in the section "Vascular system".

Heart: Macroscopic cardiac examination revealed manifestations of acute and chronic cardiovascular insufficiency, including ectasia of the atria and ventricles. Furthermore, left ventricular hypertrophy was noted (wall thickness: 18 mm, heart weight: 410 g, body weight: 60 kg, height: 1.75 m). There was evidence of tissue congestion (presumably due to cardiac insufficiency) in the form of pulmonary edema, cerebral edema, brain congestion, chronic hepatic congestion, renal tissue edema, and pituitary tissue edema. Moreover, there was evidence of shock kidney disorder. Histological examination of the heart revealed mild myocarditis with fine-spotted fibrosis and lympho-histiocytic infiltration (Figure 5). Furthermore, there were chronic arteriosclerotic lesions of varying degrees, which are described in detail under "Vascular system". In addition to these, there were more acute myocardial and vascular changes in the heart. They consisted of mild signs of myocarditis, characterized by infiltrations with foamy histiocytes and lymphocytes as well as hypereosinophilia and some hypercontraction of cardiomyocytes. Furthermore, mild acute vascular changes were observed in the capillaries and other small blood vessels of the heart. They consisted of mild lympho-histiocytic infiltrates, prominent endothelial swelling and vacuolation, multifocal myocytic degeneration and coagulation necrosis as well as karyopyknosis of single endothelial cells and vascular muscle cells (Figure 5). Occasionally, adhering plasma coagulates/fibrin clots were present on the endothelial surface, indicative of endothelial damage (Figure 5).

Vascular system (large blood vessels): The pulmonary arteries showed ectasia and lipidosis. The kidney showed slight diffuse glomerulosclerosis and arteriosclerosis with renal cortical scars (up to 10 mm in diameter). The findings are suggestive of generalized atherosclerosis and systemic hypertension. Major arteries including the aorta and its branches as well as the coronary arteries showed variable degrees of arteriosclerosis and mild to moderate stenosis. Furthermore, examination revealed mild nodular arteriosclerosis of cervical arteries. Ascending aorta, aortic arch, and thoracic aorta showed moderate, nodular, and partially calcified arteriosclerosis. The cerebral basilar artery showed mild arteriosclerosis. Nodular and calcified arteriosclerosis were of high grade in the abdominal aorta and iliac arteries and moderate grade with moderate stenosis in the right coronary arteries. Coronary artery examination showed variable degrees of arteriosclerosis and stenosis more on the left coronary arteries. The left anterior descending coronary artery (the anterior interventricular branch of the left coronary artery; LAD) showed high-grade and moderately stenosed arteriosclerosis. The arteriosclerosis and stenosis of the left circumflex artery (the circumflex branch of the left coronary artery) were mild. Mild cerebral basal artery sclerosis. High-grade nodular and calcified arteriosclerosis of the abdominal aorta and the iliac arteries. Moderate stenosed arteriosclerosis of the right coronary artery. Lymphocytic periarteritis was detected as well.



Figure 2. Frontal brain. Already in the overview image (**a**), prominent vacuolations with increased parenchymal cellularity are evident, indicative of degenerative and inflammatory processes. At higher magnification (**b**), acute brain damage is visible with diffuse and zonal neuronal and glial cell death, activation of microglia, and inflammatory infiltration by granulocytes and lymphocytes. 1: neuronal deaths (cells with red cytoplasm); 2: microglial proliferation; 3: lymphocytes. H&E stain. Magnification 40× (**a**) and 200× (**b**).



Figure 3. Brain, Nucleus ruber. In the overview image (**a**), note pronounced focal necrosis with increased cellularity, indicative of ongoing inflammation and glial reaction. At higher magnification (**b**), death of neuronal cells is evident and associated with an increased number of glial cells. Note activation of microglia and presence of inflammatory cell infiltrates, predominantly lymphocytic. 1: neuronal death with hypereosinophilia and destruction of cell nucleus with signs of karyolysis (nuclear content being distributed into the cytoplasm); 2: microglia (example); 3: lymphocyte (example). H&E stain. Magnification 40× (**a**) and 400× (**b**).



Figure 4. Brain, periventricular vasculitis. Cross section through a capillary vessel showing prominent signs of vasculitis. The endothelial cells (5) show swelling and vacuolation and are increased in number with enlargement of nuclei, indicative for activation. Furthermore, presence of mixed inflammatory cell infiltrates within the endothelial layer, consisting of lymphocytes (1), granulocytes (2), and histiocytes (4). The adjacent brain tissue also shows signs of inflammation (encephalitis) with presence of lymphocytes as well and activated microglia (3). H&E. Magnification: 200× (**a**) and 400× (**b**).



Figure 5. Heart left ventricle. (**a**): Mild lympho-histiocytic myocarditis.Pronounced interstitial edema (7) and mild lympho-histiocytic infiltrates (2 + 4). Signs of cardiomyocytic degeneration (5) with cytoplasmic hypereosinophilia and single contraction bands. (**d**): Arteriole with signs of acute degeneration and associated inflammation, associated by lymphocytic infiltrates (2) within the vascular wall, endothelial swelling and vacuolation (3), and vacuolation of vascular myocytes with signs of karyopyknosis (1). Within the vascular lumen (**d**), note plasma coagulation/fibrin clots adhering to the endothelial surface, indicative of endothelial damage. 1: pyknotic vascular myocytes, 2: lymphocytes, 3: swollen endothelial cells, 4: macrophages, 5: necrotic cardiomyocytes, 6: eosinophilic granulocytes, 7 (blue line): interstitial edema. H&E stain. Magnification: 200x (**a**) and (**c**), 40× (**b**), and detailed enlargement (**d**).

3.2. Other Findings

- Oral cavity: tongue bite was detected with bleeding under the tongue muscle (tongue bite is common with epileptic seizures).
- Adrenal glands: bilateral mild cortical hyperplasia.
- Colon: the elongated sigmoid colon was elongated with fecal impaction.
- Kidneys: slight diffuse glomerulosclerosis and arterio-sclerosis, renal cortical scars (up to 10 mm in diameter), bilateral mild active nephritis and urocystitis as well as evidence of shock kidney disorder.
- Liver: slight lipofuscinosis.
- Spleen: mild acute splenitis.
- Stomach: mild diffuse gastric mucosal bleeding.
- Thyroid gland: bilateral nodular goiter with chocolate cysts (up to 0.5 cm in diameter).
- Prostate gland: benign nodular prostatic hyperplasia and chronic persistent prostatitis.

3.3. Immunohistochemical Analyses

Immunohistochemical staining for the presence of SARS-CoV-2 antigens (spike protein and nucleocapsid) was studied in the brain and heart. In the brain, SARS-CoV-2 spike protein subunit 1 was detected in the endothelia, microglia, and astrocytes in the necrotic areas (Figures 6 and 7). Furthermore, spike protein could be demonstrated in the areas of lymphocytic periarteritis, present in the thoracic and abdominal aorta and iliac branches, as well as a cerebral basal artery (Figure 8). The SARS-CoV-2 subunit 1 was found in macrophages and in the cells of the vessel wall, in particular the endothelium (Figure 9), as well as in the Nucleus ruber (Figure 10). In contrast, the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 could not be detected in any of the corresponding tissue sections (Figures 11 and 12). In addition, SARS-CoV-2 spike protein subunit 1 was detected in the cardiac endothelial cells that showed lymphocytic myocarditis (Figure 13). Immunohistochemical staining did not detect the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (Figure 14).



Figure 6. Frontal brain. Immunohistochemistry for CD68 (expressed by monocytic cells). Note map-like tissue destruction with the presence of CD68-positive microglial cells. Furthermore zonal activation of microglia (brown granules). Activation of the microglia means that tissue destruction has taken place in the brain, which is cleared/removed by macrophages (called microglia in the brain). Brown granules: macrophages/microglia. Magnification: 40×.



Figure 7. Brain. Nucleus ruber. Immunohistochemistry for CD68 (expressed by monocytic cells) shows abundant positive cells, indicative of zonal activation of microglia (brown granules). Magnification: 40×.



Figure 8. Frontal brain. Immunohistochemistry for CD3 (expressed by T-Lymphocytes) shows numerous CD3-positive lymphocytes (brown granules, red arrow highlights an example), particularly within the endothelium, but also in the brain tissue, indicative of lymphocytic vasculitis and encephalitis. Blue dotted lines: blood vessels. Magnification: 200×.



Figure 9. Frontal brain. Positive reaction for SARS-CoV-2 spike protein. Cross section through a capillary vessel (same vessel as shown in Figure 11, serial sections of 5 to 20 μ m). Immunohistochemical reaction for SARS-CoV-2 spike subunit 1 detectable as brown granules in capillary endothelial cells (red arrow) and individual glial cells (blue arrow). Magnification: 200×.



Figure 10. Brain, Nucleus ruber. The abundant presence of SARS-CoV-2 spike protein in swollen endothelium of a capillary vessel shows acute signs of inflammation with sparse mononuclear inflammatory cell infiltrates (same vessel as shown in Figure 12, serial sections of 5 to 20 μ m). Immunohistochemical demonstration for SARS-CoV-2 spike protein subunit 1 visible as brown granules in capillary endothelial cells (red arrow) and individual glial cells (blue arrow). Magnification: 200×.



Figure 11. Frontal brain. Negative immunohistochemical reaction for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. Cross section through a capillary vessel (same vessel as shown in Figure 9, serial sections of 5 to 20 μ m). Magnification: 200×.



Figure 12. Brain, Nucleus ruber. Negative immunohistochemical reaction for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. Cross section through a capillary vessel (same vessel as shown in Figure 11, serial sections of 5 to 20 μ m). Magnification: 200×.



Figure 13. Heart left ventricle. Positive reaction for SARS-CoV-2 spike protein. Cross section through a capillary vessel (same vessel as shown in Figure 14, serial sections of 5 to 20 μ m). Immunohistochemical demonstration of SARS-CoV-2 spike subunit 1 as brown granules. Note the abundant presence of spike protein in capillary endothelial cells (red arrow) associated with prominent endothelial swelling and the presence of a few mononuclear inflammatory cells. Magnification: 400×.



Figure 14. Heart left ventricle. Negative immunohistochemical reaction for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. Cross section through a capillary vessel (same vessel as shown in Figure 13, serial sections of 5 to 20 μm). Magnification: 400×.

3.4. Autopsy-Based Diagnosis

The 76-year-old deceased male patient had PD, which corresponded to typical post-mortem findings. The main cause of death was recurrent aspiration pneumonia. In addition, necrotizing encephalitis and vasculitis were considered to be major contributors to death. Furthermore, there was mild lympho-histiocytic myocarditis with fine-spotted myocardial fibrosis as well as systemic arteriosclerosis, which will have also contributed to the deterioration of the physical condition of the senior.

The final diagnosis was abscedating bilateral bronchopneumonia (J18.9), Parkinson's disease (G20.9), necrotic encephalitis (G04.9), and myocarditis (I40.9).

Immunohistochemistry for SARS-CoV-2 antigens (spike protein and nucleocapsid) revealed that the lesions with necrotizing encephalitis as well as the acute inflammatory changes in the small blood vessels (brain and heart) were associated with abundant deposits of the spike protein SARS-CoV-2 subunit 1. Since the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 was consistently absent, it must be assumed that the presence of spike protein in affected tissues was not due to an infection with SARS-CoV-2 but rather to the transfection of the tissues by the gene-based COVID-19-vaccines. Importantly, spike protein could be only demonstrated in the areas with acute inflammatory reactions (brain, heart, and small blood vessels), in particular in endothelial cells, microglia, and astrocytes. This is strongly suggestive that the spike protein may have played at least a contributing role to the development of the lesions and the course of the disease in this patient.

4. Discussion

This is a case report of a 76-year-old patient with Parkinson's disease (PD) who died three weeks after his third COVID-19 vaccination. The stated cause of death appeared to be a recurrent attack of aspiration pneumonia, which is indeed common in PD [14,15]. However, the detailed autopsy study revealed additional pathology, in particular necrotizing encephalitis and myocarditis. While the histopathological signs of myocarditis were comparatively mild, the encephalitis had resulted in significant multifocal necrosis and may well have contributed to the fatal outcome. Encephalitis often causes epileptic seizures, and the tongue bite found at the autopsy suggests that it had done so in this case. Several other cases of COVID-19 vaccine-associated encephalitis with status epilepticus have appeared previously [16–18].

The clinical history of the current case showed some remarkable events in correlation to his COVID-19 vaccinations. Already on the day of his first vaccination in May 2021 (ChAdOx1 nCov-19 vector vaccine), he experienced cardiovascular symptoms, which needed medical care and from which he recovered only slowly. After the second vaccination in July 2021 (BNT162b2 mRNA vaccine), the family recognized remarkable behavioral and psychological changes and a sudden onset of marked progression of his PD symptoms, which led to severe motor impairment and recurrent need for wheelchair support. He never fully recovered from this but still was again vaccinated in December 2021. Two weeks after this third vaccination (second vaccination with BNT162b2), he suddenly collapsed while taking his dinner. Remarkably, he did not show any coughing or other signs of food aspiration but just fell from his chair. This raises the question of whether this sudden collapse was really due to aspiration pneumonia. After intense resuscitation, he recovered from this more or less, but one week later, he again suddenly collapsed silently while taking his meal. After successful but prolonged resuscitation attempts, he was transferred to the hospital and directly set into an artificial coma but died shortly thereafter. The clinical diagnosis was death due to aspiration pneumonia. Due to his ambiguous symptoms after the COVID-vaccinations the family asked for an autopsy.

Based on the alteration pattern in the brain and heart, it appeared that the small blood vessels were especially affected, in particular, the endothelium. Endothelial dysfunction is known to be highly involved in organ dysfunction during viral infections, as it induces a pro-coagulant state, microvascular leak, and organ ischemia [19,20]. This is also the case for severe SARS-CoV-2 infections, where a systemic exposure to the virus and its spike protein elicits a strong immunological reaction in which the endothelial cells play a crucial role, leading to vascular dysfunction, immune-thrombosis, and inflammation [21].

Although there was no history of COVID-19 for this patient, immunohistochemistry for SARS-CoV-2 antigens (spike and nucleocapsid proteins) was performed. Spike protein could be indeed demonstrated in the areas of acute inflammation in the brain (particularly within the capillary endothelium) and the small blood vessels of the heart. Remarkably, however, the nucleocapsid was uniformly absent. During an infection with the virus, both proteins should be expressed and detected together. On the other hand, the gene-based COVID-19 vaccines encode only the spike protein and therefore, the presence of spike protein only (but no nucleocapsid protein) in the heart and brain of the current case can be attributed to vaccination rather than to infection. This agrees with the patient's history, which includes three vaccine injections, the third one just 3 weeks before his death, but no positive laboratory or clinical diagnosis of the infection.

Discrimination of vaccination response from natural infection is an important question and had been addressed already in clinical immunology, where the combined application of anti-spike and anti-nucleocapsid protein-based serology was proven as a useful tool [22]. In histology, however, this immunohistochemical approach has not yet been described, but it is straightforward and appears to be very useful for identifying the potential origin of SARS-CoV-2 spike protein in autopsy or biopsy samples. Where additional confirmation is required, for instance in a forensic context, rt-PCR methods might be used to ascertain the presence of the vaccine mRNA in the affected tissues [23,24].

Assuming that, in the current case, the presence of spike protein was indeed driven by the gene-based vaccine, then the question arises whether this was also the cause the accompanying acute tissue alterations and inflammation. The stated purpose of the gene-based vaccines is to induce an immune response against the spike protein. Such an immune response will, however, not only results in antibody formation against the spike protein but also lead to direct cell- and antibody-mediated cytotoxicity against the cells expressing this foreign antigen. In addition, there are indications that the spike protein on its own can elicit distinct toxicity, in particular, on pericytes and endothelial cells of blood vessels [25,26]. While it is widely held that spike protein expression, and the ensuing cell and tissue damage will be limited to the injection site, several studies have found the vaccine mRNA and/or the spike protein encoded by it at a considerable distance from the injection site for up to three months after the injection [23,24,27–29]. Biodistribution studies in rats with the mRNA-COVID-19 vaccine BNT162b2 also showed that the vaccine does not stay at the injection site but is distributed to all tissues and organs, including the brain [30]. After the worldwide roll-out of COVID-19 vaccinations in humans, spike protein has been detected in humans as well in several tissues distant from the injection site

[30]. After the worldwide roll-out of COVID-19 vaccinations in humans, spike protein has been detected in humans as well in several tissues distant from the injection site (deltoid muscle): for instance in heart muscle biopsies from myocarditis patients [28], within the skeletal muscle of a patient with myositis [23] and within the skin, where it was associated with a sudden onset of Herpes zoster lesions after mRNA-COVID-19 vaccination [29].

The underlying diagnosis in this patient was Parkinson's disease, and one may ask what role, if any, this condition had played in the causation of the encephalitis, and the myocarditis detected at post-mortem examination. PD had been long-standing in the current case, whereas the encephalitis was acute. Conversely, there is no plausible mechanism and no case report of PD causing secondary necrotizing encephalitis. On the other hand, numerous cases have been reported of autoimmune encephalitis and encephalomyelitis after COVID-19 vaccination [12,31]. Autoimmune diseases in organs other than the CNS have been reported as well, for example, a striking case of a patient who after mRNA vaccination suffered multiple autoimmune disorders all at once—acute disseminated encephalomyelitis, myasthenia gravis, and thyroiditis [32]. In the case reported here, it may be noted that the spike protein was primarily detected in the vascular endothelium and sparsely in the glial cells but not in the neurons. Nevertheless, neuronal cell death was widespread in the encephalitic foci, which suggests some contribution of immunological bystander activation, i.e., autoimmunity, to the observed cell and tissue damage.

A contributory role of PD in the development of cardiomyopathy is indeed documented and cannot be ruled out with absolute certainty. However, inflammatory myocardial changes with pathological alterations in small blood vessels as seen in the current case are uncommon. Instead, the most prominent cause of cardiac failure in PD patients is rather due to cardiac autonomic dysfunction [33,34]. PD seems well to be significantly associated with increased left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction [34]. In the current case, ventricular dilatation and hypertrophy were present but seem rather related to manifest signs of chronic hypertension. In contrast, myocardial inflammatory reactions had been well-linked to gene-based COVID-19 vaccinations in numerous cases [9,35–37]. In one case, the spike protein of SARS-CoV-2 could also be demonstrated by immunohistochemistry in the heart of vaccinated individuals [28].

5. Conclusions

Numerous cases of encephalitis and encephalomyelitis have been reported in connection with the gene-based COVID-19 vaccines, with many being considered causally related to vaccination [31,38,39]. However, this is the first report to demonstrate the presence of the spike protein within the encephalitic lesions and to attribute it to vaccination rather than infection. These findings corroborate a causative role of the gene-based COVID-19 vaccines, and this diagnostic approach is relevant to potentially vaccine-induced damage to other organs as well.

Funding: This research received no specific funding.

Institutional Review Board Statement: According to the Saxonian State Chamber of Medicine (Ethikkommission Landesärztekammer Sachsen), no explicit ethical approval is required for autopsy case reports as long as informed consent was obtained from the entitled person and all data has been anonymized.

Data Availability Statement: Data are available upon request.

Acknowledgments: The author wishes to thank Hany A. Salem and David O. Fischer for supporting the preparation of this paper with valuable comments and suggestions.

Conflicts of Interest: The author declares he has no conflicts of interest.

References

- Chen, W.-H.; Strych, U.; Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: An Overview. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2020, 1–4. https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6.
- Sultana, J.; Mazzaglia, G.; Luxi, N.; Cancellieri, A.; Capuano, A.; Ferrajolo, C.; de Waure, C.; Ferlazzo, G.; Trifirò, G. Potential effects of vaccinations on the prevention of COVID-19: Rationale, clinical evidence, risks, and public health considerations. *Expert Rev. Vaccines* 2020, *19*, 919–936. https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1825951.
- 3. WHO. COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape. Available online: https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (accessed on 2 June 2022).
- 4. Lurie, N.; Saville, M.; Hatchett, R.; Halton, J. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. N. Engl. J. Med. 2020, 382, 1969–1973. https://doi.org/10.1056/NEJMp2005630.
- 5. World Health Organization (WHO). Diagnostics Laboratory Emergency Use Listing. Available online: https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul (accessed on 2 June 2022).
- Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. N. Engl. J. Med. 2021, 384, 403–416. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389.
- phase O'Reilly, Ρ. А III study investigate vaccine against COVID-19. ISRCTN 2020. 7. to а https://doi.org/10.1186/ISRCTN89951424.
- Polak, S.B.; Van Gool, I.C.; Cohen, D.; von der Thüsen, J.H.; van Paassen, J. A systematic review of pathological findings in COVID-19: A pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Mod. Pathol.* 2020, 33, 2128–2138. https://doi.org/10.1038/s41379-020-0603-3.
- Choi, S.; Lee, S.; Seo, J.-W.; Kim, M.-J.; Jeon, Y.H.; Park, J.H.; Lee, J.K.; Yeo, N.S. Myocarditis-induced Sudden Death after BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccination in Korea: Case Report Focusing on Histopathological Findings. *J. Korean Med. Sci.* 2021, 36, e286. https://doi.org/10.3346/jkms.2021.36.e286.
- 10. Fillon, A.; Sautenet, B.; Barbet, C.; Moret, L.; Thillard, E.M.; Jonville-Béra, A.P.; Halimi, J.M. De novo and relapsing necrotizing vasculitis after COVID-19 vaccination. *Clin. Kidney J.* **2022**, *15*, 560–563. https://doi.org/10.1093/ckj/sfab285.
- 11. Gao, J.-J.; Tseng, H.-P.; Lin, C.-L.; Hsu, R.-F.; Lee, M.-H.; Liu, C.-H. Acute encephalitis after COVID-19 vaccination: A case report and literature review. *Hum. Vaccines Immunother.* **2022**, 2082206. https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2082206.
- 12. Jarius, S.; Bieber, N.; Haas, J.; Wildemann, B. MOG encephalomyelitis after vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2): Case report and comprehensive review of the literature. *J. Neurol.* 2022, 269, 5198–5212. https://doi.org/10.1007/s00415-022-11194-9.
- Oshida, S.; Akamatsu, Y.; Matsumoto, Y.; Suzuki, T.; Sasaki, T.; Kondo, Y.; Fujiwara, S.; Kashimura, H.; Kubo, Y.; Ogasawara, K. Intracranial aneurysm rupture within three days after receiving mRNA anti-COVID-19 vaccination: Three case reports. *Surg. Neurol. Int.* 2022, *13*, 117. https://doi.org/10.25259/SNI_1144_2021.
- 14. Won, J.H.; Byun, S.J.; Oh, B.-M.; Park, S.J.; Seo, H.G. Risk and mortality of aspiration pneumonia in Parkinson's disease: A nationwide database study. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6597. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86011-w.
- 15. Matsumoto, H.; Sengoku, R.; Saito, Y.; Kakuta, Y.; Murayama, S.; Imafuku, I. Sudden death in Parkinson's disease: A retrospective autopsy study. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *343*,149–152. https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.05.060.
- Fan, H.-T.; Lin, Y.-Y.; Chiang, W.-F.; Lin, C.-Y.; Chen, M.-H.; Wu, K.-A.; Chan, J.-S.; Kao, Y.-H.; Shyu, H.-Y.; Hsiao, P.-J. COVID-19 vaccine-induced encephalitis and status epilepticus. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* 2022, 115, 91–93. https://doi.org/10.1093/qjmed/hcab335.
- 17. Liu, B.D.; Ugolini, C.; Jha, P. Two Cases of Post-Moderna COVID-19 Vaccine Encephalopathy Associated With Nonconvulsive Status Epilepticus. *Cureus* **2021**, *13*, e16172. https://doi.org/10.7759/cureus.16172.
- 18. Werner, J.; Brandi, G.; Jelcic, I.; Galovic, M. New-onset refractory status epilepticus due to autoimmune encephalitis after vaccination against SARS-CoV-2: First case report. *Front. Neurol.* **2022**, *13*, 946644. https://doi.org/10.3389/fneur.2022.946644.
- 19. Kim, D.; Bresette, C.; Liu, Z.; Ku, D.N. Occlusive thrombosis in arteries. *APL Bioeng.* 2019, *3*, 041502. https://doi.org/10.1063/1.5115554.
- 20. Ludewig, B.; Zinkernagel, R.M.; Hengartner, H. Arterial inflammation and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002, 12, 154–159. https://doi.org/10.1016/s1050-1738(01)00166-9.
- Pons, S.; Fodil, S.; Azoulay, E.; Zafrani, L. The vascular endothelium: The cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit. Care Lond. Engl.* 2020, 24, 353. https://doi.org/10.1186/s13054-020-03062-7.

- Dörschug, A.; Frickmann, H.; Schwanbeck, J.; Yilmaz, E.; Mese, K.; Hahn, A.; Groß, U.; Zautner, A.E. Comparative Assessment of Sera from Individuals after S-Gene RNA-Based SARS-CoV-2 Vaccination with Spike-Protein-Based and Nucleocapsid-Based Serological Assays. *Diagnostics* 2021, 11, 426. https://doi.org/10.3390/diagnostics11030426.
- Magen, E.; Mukherjee, S.; Bhattacharya, M.; Detroja, R.; Merzon, E.; Blum, I.; Livoff, A.; Shlapobersky, M.; Baum, G.; Talisman, R.; et al. Clinical and Molecular Characterization of a Rare Case of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine-Associated Myositis. *Vaccines* 2022, 10, 1135. https://doi.org/10.3390/vaccines10071135.
- Röltgen, K.; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* 2022, *185*, 1025–1040.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018.
- Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE2. *bioRxiv* 2020, bioRxiv: 2020.12.04.409144. https://doi.org/10.1101/2020.12.04.409144.
- Avolio, E.; Carrabba, M.; Milligan, R.; Kavanagh Williamson, M.; Beltrami, A.P.; Gupta, K.; Elvers, K.T.; Gamez, M.; Foster, R.R.; Gillespie, K.; et al. The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: A potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease. *Clin. Sci.* 2021, 135, 2667–2689. https://doi.org/10.1042/CS20210735.
- Bansal, S.; Perincheri, S.; Fleming, T.; Poulson, C.; Tiffany, B.; Bremner, R.M.; Mohanakumar, T. Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. J. Immunol. Baltim. Md 1950 2021, 207, 2405–2410. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637.
- Baumeier, C.; Aleshcheva, G.; Harms, D.; Gross, U.; Hamm, C.; Assmus, B.; Westenfeld, R.; Kelm, M.; Rammos, S.; Wenzel, P.; et al. Intramyocardial Inflammation after COVID-19 Vaccination: An Endomyocardial Biopsy-Proven Case Series. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6940. https://doi.org/10.3390/ijms23136940.
- Yamamoto, M.; Kase, M.; Sano, H.; Kamijima, R.; Sano, S. Persistent varicella zoster virus infection following mRNA COVID-19 vaccination was associated with the presence of encoded spike protein in the lesion. *J. Cutan. Immunol. Allergy* 2022, *n/a.* https://doi.org/10.1002/cia2.12278.
- TGA Therapeutic Goods Administration, Australian Government 2021: Non Clinical Evaluation Report of BNT162b2 [mRNA] COVID-19 vaccine (COMIRNATYTM) Submission No: PM-2020-05461-1-2 Sponsor: Pfizer Australia Pty Ltd. https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-2389-06.pdf. (accessed on 2 June 2022)
- Ancau, M.; Liesche-Starnecker, F.; Niederschweiberer, J.; Krieg, S.M.; Zimmer, C.; Lingg, C.; Kumpfmüller, D.; Ikenberg, B.; Ploner, M.; Hemmer, B.; et al. Case Series: Acute Hemorrhagic Encephalomyelitis After SARS-CoV-2 Vaccination. *Front. Neurol.* 2021, *12*, 820049. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.820049.
- Poli, K.; Poli, S.; Ziemann, U. Multiple Autoimmune Syndromes Including Acute Disseminated Encephalomyelitis, Myasthenia Gravis, and Thyroiditis Following Messenger Ribonucleic Acid-Based COVID-19 Vaccination: A Case Report. *Front. Neurol.* 2022, 13, 913515. <u>https://doi.org/10.3389/fneur.2022.913515</u>.
- Scorza, F.A.; Fiorini, A. C.; Scorza, C. A.; Finsterer, F.: Cardiac abnormalities in Parkinson's disease and Parkinsonism. J. Clin. Neurosci. 2018 Jul;53:1-5. DOI: 10.1016/j.jocn.2018.04.031
- Piqueras-Flores J.; López-García, A.; Moreno-Reig, Á.; González-Martínez, A.; Hernández-González, A.; Vaamonde-Gamo, J.; Alfonso Jurado-Románet, A.: Structural and functional alterations of the heart in Parkinson's disease. *Neurol. Res.* 2018; 40(1):53-61. https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1390933
- Burstein, B.; Barbosa, R.S.; Samuel, M.; Kalfon, E.; Philippon, F.; Birnie, D.; Mangat, I.; Redfearn, D.; Sandhu, R.; Macle, L.; et al. Prevention of venous thrombosis after electrophysiology procedures: A survey of national practice. *J. Interv. Card. Electrophysiol. Int. J. Arrhythm. Pacing* 2018, *53*, 357–363. https://doi.org/10.1007/s10840-018-0461-9.
- Kang, H.K.; Rhodes, C.; Rivers, E.; Thornton, C.P.; Rodney, T. Prevalence of Mental Health Disorders Among Undergraduate University Students in the United States: A Review. J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv. 2021, 59, 17–24. https://doi.org/10.3928/02793695-20201104-03.
- 37. Sung, J.G.; Sobieszczyk, P.S.; Bhatt, D.L. Acute Myocardial Infarction Within 24 Hours After COVID-19 Vaccination. *Am. J. Cardiol.* **2021**, *156*, 129–131. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2021.06.047.
- Cao, J.; Li, S.; Ma, Y.; Li, Z.; Liu, G.; Liu, Y.; Jiao, J.; Zhu, C.; Song, B.; Jin, J.; et al. Risk factors associated with deep venous thrombosis in patients with different bed-rest durations: A multi-institutional case-control study. *Int. J. Nurs. Stud.* 2021, 114, 103825. https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2020.103825.
- 39. Walter, A.; Kraemer, M. A neurologist's rhombencephalitis after comirnaty vaccination. A change of perspective. *Neurol. Res. Pract.* **2021**, *3*, 56. https://doi.org/10.1186/s42466-021-00156-7.