

唾液中の重症急性呼吸器症候群-コロナウイルス-2 スパイク1サブユニットに対する交差反応性免疫グロ ブリンAの検出

- 槻木圭一
- 山本辰生
- 半田啓介
- 岩宮麻里子
- 十里猿田
- 井野智
- 櫻井貴史

•

•

•

•

•

•

•



- 初版:2021年11月23日
- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979>
-

- **第一条**

- **著者**

- **測定指標**

- **備考**

- **メディア報道**

- **ピアレビュー**

- **抄録**

- Introduction

- 方法

- 結果

- 討論

- 結論

- 参考情報

- 謝辞

- 参考文献

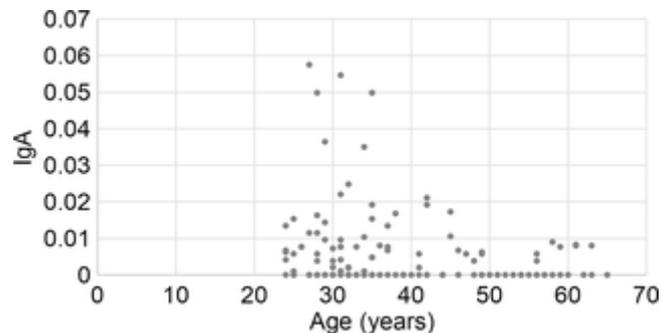
- 読者のコメント

- 図

抄録

粘液、母乳、唾液中に豊富に存在する分泌型免疫グロブリン A(SIgA)は、粘膜表面の感染に対する免疫をもたらす。SIgA を含むパンデミック前の母乳検体が SARS-CoV-2 と交差反応することが報告されているが、SARS-CoV-2 と交差反応する SIgA が唾液中に存在するかどうかは依然として不明である。我々は、唾液中の SIgA が SARS-CoV-2 のスパイク 1 サブユニットと交差反応するかどうかを、このウイルスに感染していない個人において明らかにすることを目的とした。本研究には、神奈川歯科大学附属病院の歯科医師および医師 137 名(男性 101 名、女性 36 名、平均年齢 38.7 歳、年齢範囲 24-65 歳)が登録された。唾液および血液検体を、それぞれ IgG および IgM についてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および免疫クロマトグラフィーにより分析した。その後、唾液検体で SARS-CoV-2 が PCR 陰性かつ IgM 陰性であることが確認された患者を同定した。IgA 陽性唾液検体の SARS-CoV-2 との交差反応性は、SARS-CoV-2 の受容体結合ドメインをカバーするビオチン標識スパイク組換えタンパク質(S1-mFc)を用いた酵素結合免疫吸着測定法により測定された。SARS-CoV-2 交差反応性 IgA 陽性者の割合は 46.7% であり、年齢と負の相関を示した($r=-0.218, p=0.01$)。50 歳以上の IgA 陽性患者の割合は 49 歳以下の患者と比較して有意に低かった($p=0.008$)。患者の唾液から精製された SIgA は、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質のアンジオテンシン変換酵素 2 受容体への結合を部分的に抑制する可能性があった。この研究では、SARS-CoV-2 に感染したことの無い個人の唾液中に SARS-CoV-2 と交差反応する SIgA が存在することが示され、SIgA が SARS-CoV-2 の感染予防に役立つ可能性が示唆された。

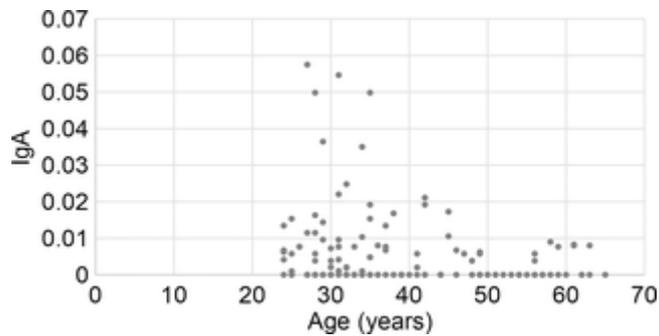
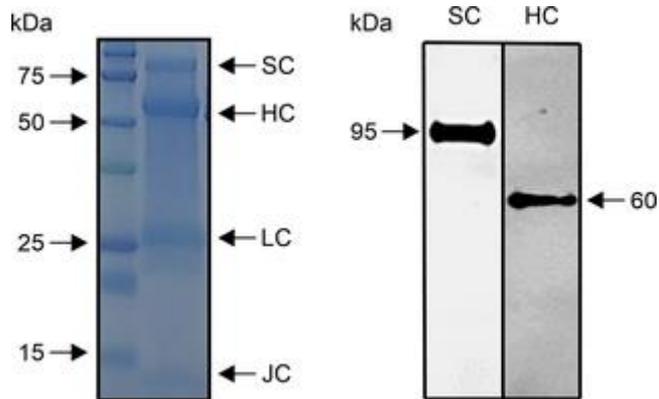
図



Variable		Total		IgA positive		p [*]
		n	%	n	%	
Age (years)	20-29	32	19	59.4	0.081	
	30-39	34	27	79.0		
	40-49	25	11	47.8		
	50-59	20	4	20.0		
	≥60	8	3	37.5		
	20-69	109	57	52.3		
Sex	Male	101	48	47.5	0.452	
	Female	36	16	44.4		
BCG	Yes	102	49	48.0	0.781	
	No	8	4	50.0		
	Unknown	27	11	40.7		
Hepatitis B	Yes	124	58	46.8	0.992	
	No	11	5	45.5		
	Unknown	2	1	50.0		
Influenza	Yes	127	60	47.2	0.458	
	No	19	4	21.1		
Hepatitis B and Influenza	Neither	1	1	100.0	0.114	
	Either	19	7	36.8		
	Both	115	55	47.8		
BCG, Hepatitis B, and Influenza	One	3	1	33.3	0.809	
	Two	21	11	52.4		
	Three	84	40	47.6		

*Chi square or Fisher exact test.

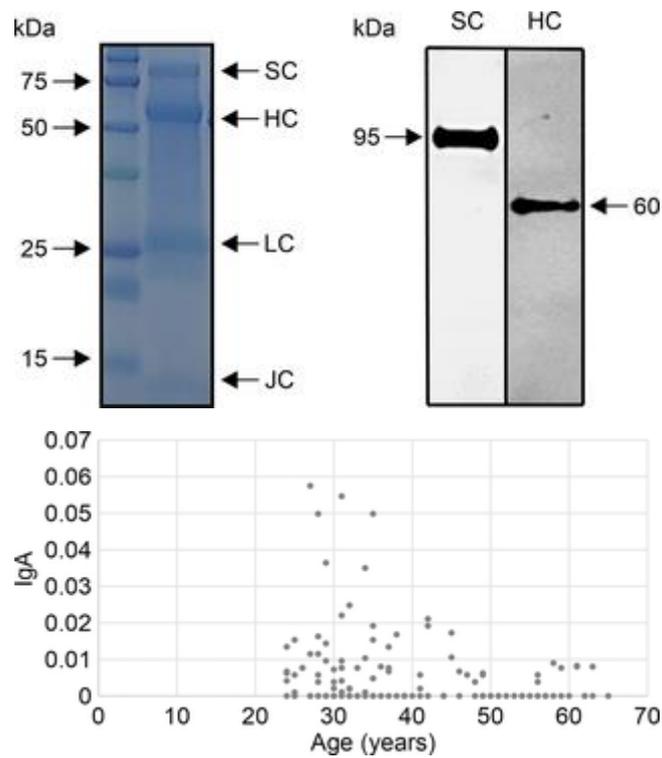
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240079.t001>



Variable		Total		IgA positive		p [*]
		n	%	n	%	
Age (years)	20-29	32	19	59.4	0.081	
	30-39	34	27	79.0		
	40-49	25	11	47.8		
	50-59	20	4	20.0		
	≥60	8	3	37.5		
	20-69	109	57	52.3		
Sex	Male	101	48	47.5	0.452	
	Female	36	16	44.4		
BCG	Yes	102	49	48.0	0.781	
	No	8	4	50.0		
	Unknown	27	11	40.7		
Hepatitis B	Yes	124	58	46.8	0.992	
	No	11	5	45.5		
	Unknown	2	1	50.0		
Influenza	Yes	127	60	47.2	0.458	
	No	19	4	21.1		
Hepatitis B and Influenza	Neither	1	1	100.0	0.114	
	Either	19	7	36.8		
	Both	115	55	47.8		
BCG, Hepatitis B, and Influenza	One	3	1	33.3	0.809	
	Two	21	11	52.4		
	Three	84	40	47.6		

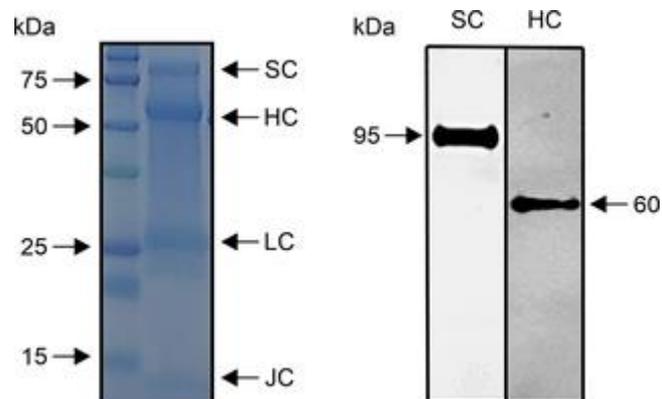
*Chi square or Fisher exact test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240079.t001>



Variable	Total		IgA positive		p [*]
	n	%	n	%	
Age (years)	20-29	32	19	59.4	0.001
	30-39	34	27	79.0	
	40-49	25	11	47.8	
	50-59	20	4	20.0	
	≥60	8	3	37.5	
Sex	20-49	109	57	52.3	0.008
	≥50	26	7	27.0	
Sex	Male	101	48	47.5	0.452
	Female	36	16	44.4	
Vaccination	BCG				0.793
	Yes	102	49	48.0	
	No/Unknown	8/27	4/11	50.0/40.7	
Hepatitis B	Yes	124	58	46.8	0.992
	No/Unknown	11/2	5/1	45.5/50.0	
	Influenza				
Yes	127	60	47.2		
Hepatitis B and Influenza	Neither	1	1	100.0	0.114
	Either	19	7	36.8	
	Both	115	55	47.8	
BCG, Hepatitis B, and Influenza	One	3	1	33.3	0.809
	Two	21	11	52.4	
	Three	84	40	47.6	

*Chi square or Fisher exact test.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979>



引用:槻木 K,Yamamoto T,Handa K,岩宮 M,猿田 J,Ino S,et al.(2021)唾液中の重症急性呼吸器症候群-コロナウイルス-2 スパイク 1 サブユニットに対する交差反応性免疫グロブリン A の検出 PLoS ONE 16(11):e0249979.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979>

編集者:伊藤悦郎、早稲田大学:早稲田大学(日本)

受理:2021年3月31日、受理:2021年10月6日、公表:2021年11月23日

Copyright:©2021 槻木 et al.これはオープンアクセスの論文であり、Creative Commons Attribution

License の条件の下で配布されている。Creative Commons Attribution License は、原著者と出所が明記されていれば、いかなる媒体においても無制限の使用、配布、複製を許可している。

データの利用可能性(Data Availability):すべての関連データは、原稿とその参考情報ファイルに含まれている。

資金提供:著者らは本研究に関して Kanagawa Dental University から資金提供を受けた。資金提供者は研究デザイン、データの収集と分析、公表の決定、原稿の準備などに関与しなかった。

競合する利益:著者らは、競合する利益は存在しないと宣言している。

Introduction

分泌型免疫グロブリン A(SIgA)は、免疫系の一面である粘膜免疫を介して感染を予防する。SIgA は、二量体 IgA、J 鎖、および分泌成分から構成され、唾液腺や乳腺などの腺組織から粘膜表面に分泌され、粘膜からの抗原の侵入を阻止する上で中心的な役割を果たしている[1]。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2(SARS-CoV-2)は、口腔、鼻腔、および肺を介してヒトに感染する[2]。舌および歯周組織の扁平上皮細胞は、SARS-CoV-2 受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2(ACE-2)、感染を促進するプロテアーゼである膜貫通型プロテアーゼセリン 2(TMPRSS2)、およびフリンを発現しており[3]、唾液は SARS-CoV-2 を保有している可能性がある[4]。唾液には感染を抑制するいくつかの物質(ラクトフェリン、リゾチーム、最も豊富に存在する SIgA など)も含まれており、これによりウイルスが口腔内に侵入するのを防げる可能性がある[5]。

COVID-19 のパンデミック前には、母乳中に SARS-CoV-2 に対する交差反応性 SIgA(crSA)が同定されていた[6,7]。さらに、SARS-CoV-2 に反応する CD4 陽性 T 細胞は、パンデミック前に曝露していなかった個人の約 40~60%で検出されており、このことは、T 細胞が感冒コロナウイルスや SARS-CoV-2 に対して交差反応性を有することを示唆している[8]。その後の知見[9,10]から、コロナウイルスへの過去の感染が IgG 交差反応性に関連する免疫学的記憶を作り出すことが示唆された。

SARS-CoV-2 に感染すると、COVID-19 が引き起こされ、無症状から致命的な急性呼吸不全に至るまで、独特の症状スペクトラムを形成する[11]。SARS-CoV-2 感染の重症度と有病率は、年齢層や国によって著しく異なる[12]。この大きな不均衡は免疫機序によって説明できるかもしれないが、まだ完全には解明されていない。免疫グロブリン G(IgG)は SARS-CoV-2 を排除できることから、このウイルスに対するワクチン開発が急務となっている[13]。しかしながら、SIgA による粘膜免疫については、SARS-CoV-2 感染からの回復とその予防という観点からは検討されていない。この分野で新たな知見が得られれば、COVID-19 の特徴に対する理解が深まる可能性がある。

そこで本研究では、SARS-CoV-2 と交差反応する SIgA を検出するための酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を開発することを目標とした。これは、SARS-CoV-2 のスパイク 1 サブユニットと交差反応する唾液中の SIgA が非感染者に存在するかどうかを明らかにするために利用できる可能性がある。

方法

参加者の選択

唾液および血液検体は、それぞれポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および免疫クロマトグラフィーを用いて検査した。唾液検体で PCR および IgM 検査により COVID-19 陰性が確認された個人が研究対象とされた。参加者は神奈川歯科大学附属病院の医師 5 名と歯科医師 132 名であった。IgA 腎症、選択的 IgA 欠損症、自己免疫疾患の患者、および過去 2 週間以内に感冒様症状がみられた患者は除外された。参加者 137 人(男性 101 人および女性 36 人[平均年齢 38.7 歳;範囲 24-65 歳])から十分なインフォームド・コンセントが得られた。本試験は、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を受けた(承認番号:#690)。本試験は、ICMJE の基準を満たす国内臨床試験 UMIN-CTR(承認番号:#R000046461)に登録されている。

ELISA 用の唾液採取

2020 年 8 月の午前 9 時から午後 12 時までの間、感染制御プロトコルの下で、Saliwatets®(Sarstedt AG&Co.,KG,Nümbrecht)を用いて検体を採取した。参加者には、検体採取前の少なくとも 1 時間は飲食および歯磨きを控えるよう指示した。唾液検体は直ちに 2000 × g で 15 分間遠心分離した後、-80°C で保存した。

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する crSA の ELISA のデザイン

Yamamoto らが報告したヒト IgA ELISA 定量セット(#E88-102;Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)を用いて、インフルエンザウイルスに対する IgA 交差反応性を検出できる ELISA システムを改変した [14]。唾液検体を炭酸塩-重炭酸塩緩衝液で 500 倍に希釈し、25°C で 1 時間インキュベートした。ELISA プレートのウェルを洗浄液で 5 回洗浄した。この抗原は、スパイクタンパク質受容体結合ドメイン(RBD)を有する SARS-CoV-2 のスパイク 1 サブユニットからなるスパイク 1-mFc 組換えタンパク質(#40591-V05H1;Sino Biological, Beijing, China)であった。製造業者が記載したキット(#BK01;同仁堂 Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いてビオチンで標識した。1 ウェル当たり 1 μg/mL の唾液サンプルを含む ELISA プレートにビオチン標識スパイク 1 を添加し、25°C で 1 時間インキュベートした。ウェルを洗浄液で 5 回洗浄した。次に、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート (SA202; Millipore, USA; 希釈, 1:1000)をウェルに加え、25°C で 1 時間反応させた。TMB 基質溶液をウェルに加え、25°C で 15 分間反応させた後、停止液で反応を停止させた。マイクロプレートの吸光度測定装置 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて、Spike 1 タンパク質結合 IgA を波長 450 nm で検出した。リン酸塩緩衝食塩水を含む陰性対照からのバックグラウンド吸光度を全ての唾液検体の吸光度から差し引いた。

IgA 精製およびウェスタンブロット法

IgA 精製キット(#20395)を用いて SIgA を精製した。米国マサチューセッツ州ウォルサム (Waltham,MA,USA)の製造販売業者による記載に従って製造する。サーモフィッシャー・サイエンティフィック精製した唾液検体を試料緩衝液(#NP0008)の混合物に添加した。サーモフィッシャー・サイエンティフィック)及び試料還元剤(#NP0009)サーモフィッシャー・サイエンティフィック)。試料を 96°Cで 5 分間加熱した後、標準プロトコールを用いてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)ゲルで泳動を行った。ゲルをクーマシーブリリアントブルー(#178-00551;FUJIFILM Wako Chemicals,Osaka,Japan)で染色した。IgA の重鎖に特異的な抗体を用いて、精製された物質が IgA であるかどうかを判定した。さらに、分泌成分に特異的な抗体を用いて、検出された IgA が分泌型(SIgA)であることを確認した。以下の一次抗体を用いてウェスタンブロット法を用いた:抗ヒト IgA ウサギモノクローナル抗体(ab184863;Abcam Plc,Cambridge,UK;1:500 希釈)および抗ヒト IgA SC マウスモノクローナル抗体(ab3924;Abcam,1:500 希釈)。二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギポリクローナル抗体(#P0448;Dako,Glostrup,Denmark;1:1000 希釈)又は抗マウスモノクローナル抗体(#P0447;Dako;1:1000 希釈)が用いられた。

ACE-2 スパイクタンパク質結合を阻害する SIgA 抗体の能力

スパイクタンパク質への ACE-2 の結合が精製 SIgA によって阻害されるかどうかを調べるために、定量的 ELISA の結果に基づいて、抗体陽性の上位 20 検体と抗体陰性の下位 20 検体を選択してプールした。プールされた陽性および陰性唾液検体中の抗体の最終濃度は、それぞれ 93.6 および 63.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

次に、SARS-CoV-2 スパイク-ACE-2 結合アッセイキット(#COV-SACE2-1;RayBiotech,Peachtree Corners,GA,USA)を用いて、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質への ACE-2 の結合を阻害する SIgA の能力を製造業者の指示に従って評価した。SARS-CoV-2 のスパイク中和ウサギ IgG モノクローナル抗体(#40592-R001;Sino Biological 社)を陽性対照として調製し、中和抗体を 0,0.0125,0.025,0.05,0.1 および 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加した。

結合阻害率(BI%)は、製造業者の指示に従って、 $[1-(\text{試験試薬ウェルの OD}/\text{陽性対照ウェル中に阻害物質が存在しない場合の OD})] \times 100$ として算出した。

質問票

参加者は唾液採取前に自己記入式質問票に回答し、過去 1 年以内に BCG(Bacillus Calmette-Guérin) ワクチン、B 型肝炎ワクチン、およびインフルエンザワクチンの接種歴があるかどうかを判定した。さらに、被験者に年齢と性別を記載した質問票への回答を依頼した。

統計解析

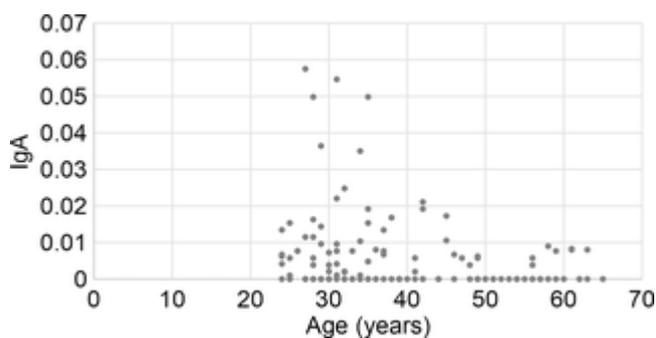
CrSA の相対 ELISA 値を決定するために陰性値を 0 に設定し、年齢との関連性を Spearman 順位相関を用いて分析した。ELISA および二値データにおける crSA の相対的陽性(>0)および陰性(0)値、年齢群、性別、BCG 接種状況、B 型肝炎ワクチン接種状況、およびインフルエンザワクチン接種状況との関連が検討された。ワクチン接種歴との関連は、カイニ乗検定またはフィッシャーの直接確率検定を用いて検討された。B 型肝炎ワクチンとインフルエンザワクチンの変数をどちらもない、どちらか一方、または両方として要約し、ワクチン接種回数と IgA 陽性または陰性との関連を検討した。BCG、B 型肝炎ワクチンおよびインフルエンザワクチンの変数を 0,1,2 または 3 に要約し、ワクチン接種回数と IgA 陽性または陰性との関連を検討した。有意水準は 5%と設定された。全てのデータは SPSS バージョン 26(IBM Corp.,Armonk,NY,USA)を用いて統計解析が行われた。

結果

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する crSA

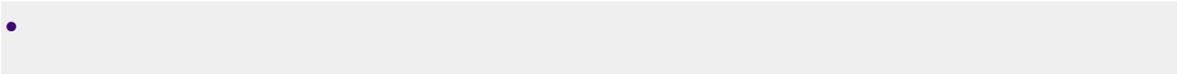
ELISA を用いて測定した crSA の相対値を陰性値として 0 とした。CrSA は 137 検体中 64 検体(46.7%)で陽性、73 検体(53.3%)で陰性(吸光度 0 以下)であった。

図 1 に年齢と交差反応性 IgA のプロットを示す。年齢は相対的 crSA と有意に負の相関を示した($r=-0.218, p=0.01$)。crSA の陽性率は、49 歳以下と比較して 50 歳以上で有意に低かった($p=0.008$)ことが表 1 に示されている。ワクチンと crSA 陽性または陰性との関連は有意ではなかった。

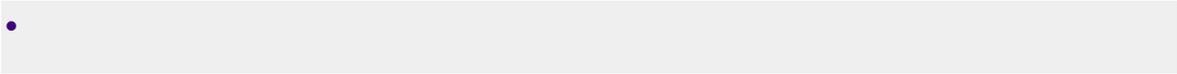
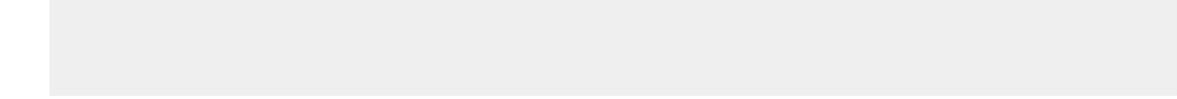


ダウンロード:

-



PNGLarger の画像



TIFForiginal の画像

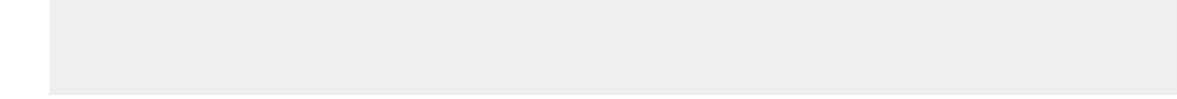


図 1.参加者の年齢と crSA の陽性率または陰性率との関連

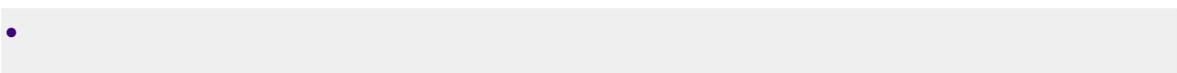
縦軸:crSA 陽性の被験者から採取した唾液検体の吸光度から求めた IgA の相対量。陰性検体は 0 とし
て示す。49 歳以下の多くの被験者では、吸収率がかなり高かった。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979.g001>

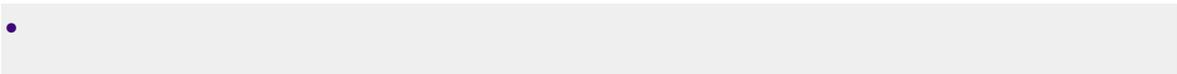
Variable		Total		IgA positive		p [*]
		n	%	n	%	
Age (year)	20–29	32	59.4	19	59.4	0.001
	30–39	34	50.0	27	50.0	
	40–49	23	47.8	11	47.8	
	50–59	20	20.0	4	20.0	
	≥60	8	37.5	3	37.5	
	20–69	109	52.3	57	52.3	
Sex	Male	301	47.3	48	47.3	0.452
	Female	36	44.4	14	44.4	
Vaccination	BCG					0.791
	Yes	192	48.0	49	48.0	
	No	8	50.0	4	50.0	
Hepatitis B	Unknown	27	40.7	11	40.7	0.992
	Yes	174	46.8	58	46.8	
	No	11	45.5	5	45.5	
Influenza	Unknown	2	50.0	1	50.0	0.459
	Yes	127	47.2	40	47.2	
Hepatitis B and Influenza	No	19	40.0	4	40.0	0.134
	Neither	1	100.0	1	100.0	
	Either	19	56.8	7	56.8	
BCG, Hepatitis B, and Influenza	Both	113	47.8	31	47.8	0.809
	One	3	33.3	1	33.3	
	Two	21	52.4	11	52.4	
	Three	44	47.6	40	47.6	

*Chi-square or Fisher exact test.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979.t001>

ダウンロード:



PPTPowerPoint スライド



PNGLarger の画像



TIFForiginal の画像

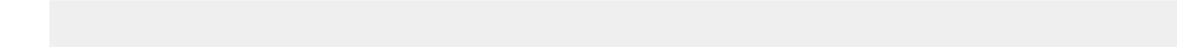
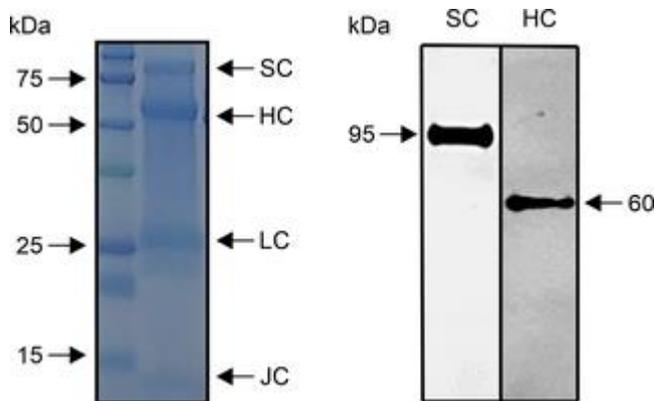


表 1.crSA 陽性と年齢、性別、およびワクチン接種状況との関連

<https://doi.org/10.1371/journal.ポーン.0249979.t001>

精製唾液の特徴づけ

SDS-PAGE により精製唾液検体から一部の IgA バンドが検出された(図 2,左図)。分泌成分(約 95 kDa)、IgA 重鎖(約 60 kDa)、IgA 軽鎖(約 26 kDa)及び J 鎖(約 13 kDa)のシグナルが同定された。ウェスタンブロット法では約 60 kDa の単一バンドが検出され、精製唾液中の IgA 重鎖の存在が確認された(図 2, 右図)。さらに、SIgA の分泌成分として約 95 kDa の単一バンドが同定された(図 2,右図)。これらの結果から、精製唾液に SIgA 成分が含まれていることが確認された。



ダウンロード:

•

PPTPowerPoint スライド

•

PNGlarger の画像

•

TIFOriginal の画像

図 2.精製唾液の性状分析

左の図は、SDS-PAGE で分離された様々な分子量のたん白質バンドを示している。これらのバンドは、分泌成分(SC)、IgA 重鎖(HC)、IgA 軽鎖及び J 鎖の分子量に一致することが確認された。右の図は、ウェスタンブロット法で測定した SC および HC の特異的シグナルを示している。

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249979.g002>

crSA 阻害試験

陽性対照では、各濃度(0-0.2 μ g/mL)のスパイク中和抗体を添加したときの吸光度の範囲は 2~155-0~493 であり、濃度に依存した減少により吸光度の値が確認された。スパイクタンパク質に対する中和抗体は、抗体濃度 0 μ g/mL で吸光度 2.155 を示した。この吸光度は ELISA により ACE-2 とスパイクタンパク質が強く結合したときの吸光度を示す。CrSA 陰性唾液検体の吸光度は 2.155 より高い 2.402 であったことから、ACE-2 とスパイクタンパク質との結合は阻害されていないことが示唆された。CrSA 陽性唾液検体の吸光度は 1.678 であり、ACE-2 とスパイクタンパク質との結合が阻害されたことが示された。BI%は CrSA 陽性唾液では 21.7%であったが、CrSA 陰性唾液では-11%であった。唾液 SIgA1 抗体 SIgA1 抗体がスパイクタンパク質を部分的に阻害することを示している。

討論

この研究では、SARS-CoV-2 に感染していない 137 人の被験者から採取した唾液検体の 46.7%に SARS-CoV-2 スパイク 1 に対する crSA が検出された。我々が検討したスパイク 1 領域には、SARS-CoV-2 受容体 ACE-2 に結合する RBD が含まれていた。この領域は感染予防に重要であるため、ワクチン開発の標的となりうる[14]。母乳中の SARS-CoV-2 crSA を検出する以前の ELISA では、総スパイクタンパク質を抗原とした場合の陽性率は 100%、RBD を抗原とした場合の陽性率は 80%であった[6]。しかし、今回の唾液サンプルの値は前回の研究で得られた両方の値よりも低かった。これは、唾液よりも母乳で多くの SIgA が産生されるためと考えられる[15]。母乳中の crSA の存在量はワクチン接種後の反応であることが証明されており[16]、このことは、母乳よりも唾液での crSA 陽性率が低い理由をさらに説明することができる。

PCR 検査および抗体検査で COVID-19 陰性と判定された被験者は、本稿の提出時点では COVID-19 を発症していなかった。したがって、SARS-CoV-2 に曝露していなかったと考えられる。そのため、SARS-CoV-2 の感染歴のない個人において、SARS-CoV-2 のスパイク 1 タンパク質に対する SIgA 抗体が明らかにされた。COVID-19 のパンデミック前に、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質と交差反応する唾液中の IgA 抗体が検出された研究は 1 件のみであった[17]。コロナウイルスのヌクレオカプシドタンパク質は高度に相同であるが、スパイクタンパク質には共通性がほとんどない[18]。HCoV-OC43 およびその他のコロナウイルスの感染歴を有する患者は、それぞれ SARS-CoV-1 に対する抗体と SARS-CoV-1 のヌクレオカプシドタンパク質に交差反応する抗体を保有している[19]。さらに、HCoV-NL63 は ACE-2 を受容体として使用しているが、スパイクタンパク質は SARS-CoV-2 とほとんど相同性がない[20]。しかしながら、NL63 の受容体結合モチーフ 3 と SARS-CoV-2 の COV2-SPIKE421-434 との交差

反応性が最近報告されている[20].過去の一般的なコロナウイルス感染症では、スパイクタンパク質やヌクレオカプシドタンパク質に対して交差反応性を示す抗体が誘導されていたことから、唾液には SARS-CoV-2 に対して交差反応性を示す SIgA などの抗体が含まれていると考えるのが妥当である。しかし、唾液中の CrSA 交差反応性の原因となるエピトープは解明されていない。

本研究では、CrSA 値は加齢とともに低下することを見出した。これは、IgA 濃度が年齢とともに低下するという事実によって説明できる[21].さらに、SARS-CoV-2 のパンデミック発生前には、1-16 歳、17-25 歳、26 歳以上の被験者の血清検体において、交差反応性 IgG 抗体がそれぞれ 62%,43.75%,5.72%で同定されていた[9].小児は一般的なコロナウイルスに感染する頻度が高いため、このことは、曝露が多いほど交差反応性抗体を有する個人が多くなることを示していると考えられる。さらに、高齢者では SARS-CoV-2 に対する交差反応性 T 細胞はまれである[22].これらの結果は、crSA が若年者に多いが高齢者ではまれである理由を説明できる。このことから、COVID-19 は小児[23]と青年[12]では重症度が低く、しばしば無症状であるという事実の根底にある機序について部分的な説明が得られる可能性がある。

唾液から精製された IgA は、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法で SIgA1 を含むことが確認されている。本研究で用いた精製キットは簡便で汎用性があるが、IgA2 活性を測定できないという限界がある。本研究では、ACE-2 とスパイクタンパク質との結合は、crSA を有さない患者では阻害されないことを明らかにした。対照的に、交差反応性 SIgA1 は ACE-2 のスパイクタンパク質への結合を阻害したことから、SIgA1 が SARS-CoV-2 に対する中和抗体として機能することが実証された。血中 IgA は中和反応を介して SARS-CoV-2 の感染を予防する可能性があるため[24].SIgA2 も同様の機能を有している可能性がある。この結果は部分的な抑制しか示さなかったが、SIgA が経口感染における SARS-CoV-2 を抑制する可能性を示した最初の報告である。さらに、SIgA1 及び SIgA2 を含む SIgA の中和活性を検討すると、阻害率が上昇する可能性がある。

唾液には SARS-CoV-2 が含まれているが、感染阻害因子も含まれている[3].唾液中のラクトフェリンは、SARS-CoV-2 に結合する感染抑制因子である[25].SIgA にはラクトフェリン、リゾチーム、ペルオキシダーゼと相乗的に働く抗原処理機能があるため、唾液中の抗細菌因子や抗ウイルス因子が crSA の作用を増強する可能性がある[26].一方で、初期の SARS-CoV-2 特異的な体液性応答は IgA 抗体が優勢であり、SARS-CoV-2 感染後の免疫において IgA 抗体が重要な役割を果たしていることが示されている[27].一方、SARS-CoV-2 に対する中和 IgA 抗体は、症状出現後 49-73 日間唾液中に残存する[27].唾液中のスパイク 1-CrSA は、COVID-19 患者の肺炎の重症度とも関連している[17].唾液は容易に非侵襲的に採取でき、SIgA は分解に抵抗性があり、輸送条件が厳密でないことから、実用的な検体である。唾液中の SIgA を簡便かつ非侵襲的に測定する方法を開発することは、将来的に SARS-CoV-2 感染の診断やリスク予測、ワクチンに対する反応などに重要となる可能性がある。

本研究の限界は被験者数が少なかったことである。ワクチンは交差反応性抗体の産生を刺激するが[7].ワクチンと交差反応性抗体との間に有意な関連は認められなかった。今後の研究では、医療に関与していない(ワクチン接種の経験がない)個人を比較すべきである。

結論

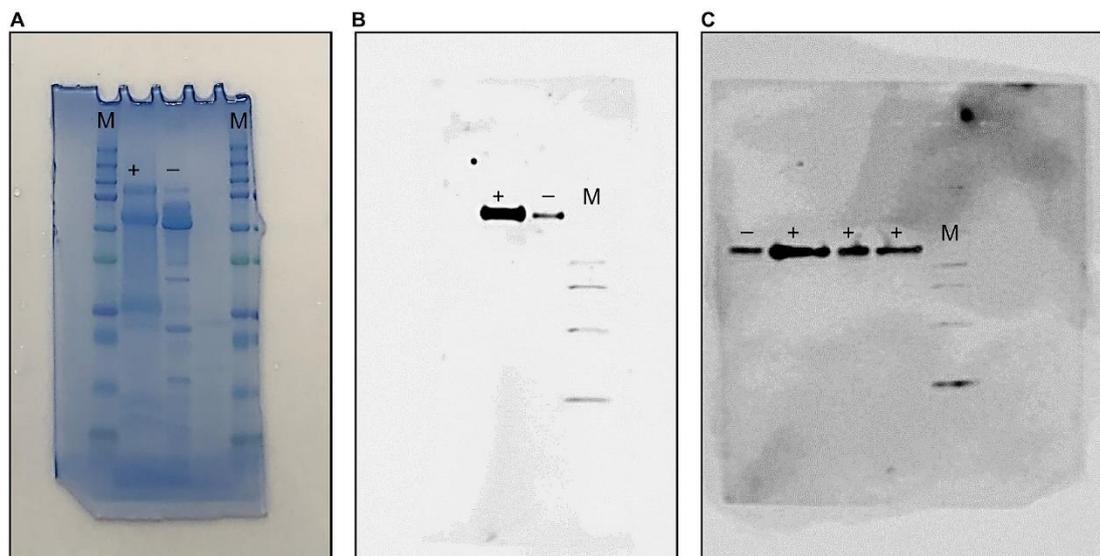
この研究では、COVID-19に感染していない個人の唾液中に SARS-CoV-2 交差反応性 IgA スパイクタンパク質を同定した。高齢被験者では、若年被験者と比べて SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質-crSA の値が低かった。唾液中の IgA は ACE-2 のスパイクタンパク質への結合を阻害する可能性がある。我々は、口腔内における SARS-CoV-2 感染の阻害因子としての IgA の重要性を明らかにした。口腔はウイルス複製部位として認識されているにもかかわらず、この区画で抗 SARS-CoV-2 抗体を検討した研究はわずかしかなことから、我々の知見は新しいものである[28].

参考情報

オリジナルゲル。

1/2:ponit.0249979.s001.tif

図共有ナビゲーションにスキップする



2分の1

ダウンロード

[イチジク](#)

[S1 図原ゲル](#)

スライドは図 2 の元のゲルの画像を示している。(A)SDS-PA GE で分離した成分、(B)分泌たんぱく質、(C)H 鎖のウェスタンブロット法において、+は jacarin で精製した唾液、+は精製していない唾液を示す。jacarin で精製された唾液のみが図 2 に示されており、これは切り取ったものである。画像処理は行われなかった。M は分子量マーカである。

<https://doi.org/10.1371/journal.ポーン。0249979.s001>

(TIF)

S2 図 Biding inhibition の百分率

CrSA 陽性の唾液は 21.72%の中和活性を示した(軸)。CrSA 陰性の唾液には明らかな中和活性は認められなかった(左のバー)。

<https://doi.org/10.1371/journal.ポーン。0249979.s002>

(TIF)

謝辞

神奈川歯科大学歯学部研究支援センターの山田真貴子氏には、貴重な技術支援をいただいたことに感謝する。

参考文献

1. 1.Yamamoto Y,To M,Hayashi T,Shimizu T,Kamata Y,猿田 J,et al.難消化性炭水化物の摂取は、ラット顎下腺における SIgA 応答および重合性 Ig 受容体発現に影響を及ぼす。英国 JNutr 社 2015;113:1859–1902.

- [記事を見る](#)
- [Google 奨学生](#)

2. 2.Shi Y,Wang G,Cai X,Deng JW,Zheng L,Zhu HH,et al.An overview of COVID-19.J Zhejiang Univ Sci B.2020;21:343–360.pmid:32425000

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

3. 3.坂口 W,久保田 N,清水 T,猿田 J,淵田 S,川田 A,et al.口腔内における

SARS-CoV-2 侵入分子の存在 Int J Mol

Sci.2020;21(17):6000.pmid:32825469

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

4. 4.Xu R,Cui B,Duan X,Zhang P,Zhou X,Yuan Q.唾液:診断的価値があり、

2019-nCoV の伝播を示す可能性がある。Int J Oral

Sci.2020;12:11.pmid:32300101

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

5. 5.Hayashi T,To M,猿田 J,Sato C,Yamamoto Y,Kondo Y,et al.唾液中のラ

クトフェリンは舌下経路を介して脳に移行する。Biosci Biotechnol

Biochem.2017;81:1300-1304.pmid:28351211

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

6. 6.Fox A,Marino J,Amanat F,Krammer F,Hahn-ホルブルック J,Zolla-

Pazner S,et al.ヒトの乳汁中に検出された SARS-CoV-2 に対する強固

で特異的な分泌型 IgA*Science*2020;23(11):101735.pmid:33134887

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

7. 7.ヴェロニック DM,Dog MD,Gabrielle BM,David AS,アンティ S,キルシ

MJ,et al.ヒト母乳中の SARS-CoV-2 S1 および S2 サブユニットならびに

ヌクレオカプシドタンパク質に反応する SIgM/IgM,IgG および SIgA/IgA

抗体濃度の差 J ペリナトール 2020;1:1-10.pmid:32873904

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

8. 8.Grifoli A,Weiskopf D,Ramirez SI,マテウス J Dan JM,Moderbacher

CR,et al.T 細胞応答の標的 COVID-19 感染者と非感染者における

SARS-CoV-2 コロナウイルス細胞:2020;181:1489-1501.pmid:32473127

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

9. 9.Ng KW,フォークナーN,コーニッシュ GH,Rosa A,Harvey R,Hussain S,etal.ヒトにおける SARS-CoV-2 に対する既存および de novo の液性免疫科学。2020;370:1339-1343.pmid:33159009

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

10.10.Zhang J,Wu Q,Liu Z,Wang Q,Wu J,Hu Y,et al.COVID-19 回復期の末梢血中のスパイク特異的濾胞ヘルパーT 細胞および交差中和抗体反応 Nat Microbiol.2021;6(1):51-58.pmid:33199863

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

11.11.Tyrpsteen W,クレオンプト JV,ファン Snippenberg W,Gerio S,Vandekheve L.ヒトの体内における SARS-CoV-2 の位置について:系統的レビュー。PLoS の病態 2020;16(10):e1009037.pmid:33125439

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

12.12.渡部 S,内藤 Y,山本 T.COVID-19 肺炎を悪化させる宿主因子 Int J Family Med Primary Care(Int J Family Med Primary Care)2020;1(3):1～4.

- [記事を見る](#)
- [Google 奨学生](#)

13.13.Wang Y,Wang L,Cao H,Liu C.SARS-CoV-2 S1 は、COVID-19 サブユニットワクチン抗原として RBD より優れている。J メッドビロール 2021;93(2):892-898.pmid:32691875

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

14.14.Ejemel M,Li Q,Hou S,Schiller ZA,Tree JA,Wallace A,et al.交差反応性ヒト IgA モノクローナル抗体は、SARS-CoV-2 スパイク-ACE 2 相互作用を遮断する。ナット・コマン 2020;11:4198.pmid:32826914

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

15.15.Brandtzaeg P.他の外分泌器官と比較した授乳中のヒト乳腺の分泌
免疫系 Ann N Y Acad Sci.1983;30(409):353-382.pmid:6408971

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

16.16.Jertborn M,Svennerholm AM,ホルムグレン J.Salva,breast milk,and
serum antibody responses as indirect measures of intestinal immune
after oral cholera vaccination of natural disease.J Clin
Microbiol.1986;24(2):203-209.pmid:3528211

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

17.17.Varadhachary A,チャタルジーD,ガルサ J,Garr RP,Foley C,Letskeman
A,et al.COVID-19 に対する粘膜免疫の利用可能なバイオマーカーとし
ての唾液中抗 SARS-CoV-2
IgAmedRxiv.2020;2020.08.07.20170258.pmid:32817976

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

18.18.Kang S,Yang M,Hong Z,Zhang L,Huang Z,Chen X,et al.SARS-CoV-2

のヌクレオカプシドタンパク質 RNA 結合ドメインの結晶構造から、ユニークな薬物標的部位の可能性が明らかになった。

bioRxiv.<https://doi.org/10.1101/2020.03.06.977876> pmid:32363136

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

19.19.Patrick D,Petric M,Skowronski DM,Guasparini R,Booth TF,Krajden

M,et al.,An outbreak of ヒトコロナウイルス OC43 infection and serologic cross-reactivity with SARS coronavirus.Can J Infection Dis Med

Microbiol.2006;17(6):330-336.pmid:18382647

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

20.20.Simula ER,マンカ MA,Jasemi S,Uzzau S,Rubino S,Manchia P,et

al.HCoV-NL63 と SARS-CoV-2 は、CoV-2 のパンデミック発生前および流行中に採取されたヒトの血清中の液性免疫反応によって認識されたエピトープを共有している。微生物 2020;8(12):1993.pmid:33327507

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

21.21.タニダ T,植田 E,飛梅 A,浜田 T,ラオ F,大崎 T.唾液中のカンジダ増殖中の接着制御剤に対する加齢の影響 J Oral Pathol Med.2001;30:328-335.pmid:11459318

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

22.22.Saletti G,ゲルラツハ T,Jansen JM,Molle A,Elbahesh H,ラドロウ M,et

al.高齢者にはヒト OC43 および NL63 に対する SARS CoV-2 交差反応性 T リンパ球が認められない。Sci Rep.2020;10:21447。 pmid:33293664

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)

- [Google 奨学生](#)

23.23.Tosif S,Neeland MR,Sutton P,Licciardi P,サルカル S,セルバ KJ,etal.Immune responses to SARS-CoV-2 in three children of parents with symptomatic COVID-19.ナット・コマン 2020;11:5703.pmid:33177504

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

24.24.Wang C,Li W,Dubravka D,Okabe NMA,van Haperen R,Osterhaus ADME,et al.A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection.ナット・コマン 2020;11:2251.pmid:32366817

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

25.25.Hu Y,Meng X,Zhang F,Xiang Y,Wang J.一般的なヒトコロナウイルスおよび SARS-CoV-2 に対するラクトフェリンの in vitro 抗ウイルス活性は、ヘパラン硫酸の補助受容体を標的とすることによって媒介される。微生物による感染 2021;10(1):317-330.pmid:33560940

- [記事を見る](#)

- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

26.26.Rudney JD,Smith QT.刺激した耳下腺唾液中のリゾチーム、ラクトフェリン、唾液ペルオキシダーゼ、分泌型免疫グロブリン A の濃度間の関係 Immun に感染させる。1985;49:469-475.pmid:4030086

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

27.27.Sterlin D,Mathian A,宮良 M,Mohr A,Anna F,Clear L,et al.IgA は、SARS-CoV-2 に対する早期中和抗体反応を支配する。中咽頭癌 2020;13(577):eabd2223 年。pmid:33288662

- [記事を見る](#)
- [PubMed/NCBI](#)
- [Google 奨学生](#)

28.28.Isao B,Abe KT,祢 M,Jamal A,Rathod B,Wang JH,et al.COVID-19 患者における SARS-CoV-2 スパイク抗原に対する血清および唾液抗体応答の持続 Sci Immunol.2020;5(52):eabe5511.pmid:33033173

- [記事を見る](#)

- PubMed/NCBI
- Google 獎学生