

ガストリンの定量はダイナボット社製キット (charcoal - dextran 法) によって行った。

成績：

Case No.	1	4	5	7	8	9	13	14	15	17	18	19	平均
gastrin 値 (pg/ml)	60	24	30	18	8	46	24	18	28	14	55	73	33.2

註：粉乳森永G-8のgastrin値は0であった。

考按：初乳中のガストリン値が約33 pg/mlであったが、成人の血清中ガストリン値が、70~80 pg/mlであるので、特に高い値でない。しかし、十分生理的な作用を示す可能性があると思われる。その意義は未だ明らかでない。

まとめ：

1) 母乳中のインタフェロンは定量されないが、その中の lymphocyte および macrophage はインタフェロンを作る可能性がある。また、母乳中にインタフェロン産生刺激となるような inducers が存在する可能性について検討したい。

2) 初乳中の免疫グロブリン Ig としては、Ig G, A, M および E があるが、特に Ig A 中の secretory Ig A が消化液に対して安定であるので感染阻止因子として期待できる。なお、Ig A は母親の血清中よりも高濃度に分泌されている点に興味がある。

Ig E もまた母乳中に母親の血清中よりも高濃度に分泌されているが、その意義については未だ明らかでない。

3) 乳児の血中の単球の T リンパ球に対する補助能は、母乳栄養児と人工栄養児との間に差異がなく、一定の結論をうるに至っていない。

4) 初乳中には母親の血中の濃度に比して低いが、生理的に意味があると思われる量のガストリンが分泌されていることが明らかとなった。しかし、その意義については今後の検討を必要とする。

母乳中の感染阻止因子および 免疫抗体などに関する研究

東邦大学医学部小児科 矢田 純一

I 各種感染因子に対する母乳中の分泌型 Ig A 抗体について

新生児・幼若乳児は免疫学的に未成熟である。ことに抗体産生系の発達は未だ完成されていない。自力での抗体産生が軌道に乗り始めるのが数カ月、ほぼ成人域に至るのは2~3歳以後と予想され

ている。

このような未熟な免疫能したがって不十分な感染防御能を補うものとして、母子受動免疫が存在すると考えられているわけであるが、その母親由来の抗体が授与される径路には経胎盤性のものと母乳由来のものがある。

有蹄類のあるものでは母乳由来の抗体が腸管より吸収されて流血中の抗体が補充されるという経路が主体で経胎盤性の抗体授与はない。このような動物では母乳中の抗体が重要な意義をもつわけである。

ヒトにおいても母乳中の抗体が腸管を經由して児の体内に吸収されうるものか否かは議論のあるところである。しかしながら、たとえ吸収が一部みられるにせよ、経胎盤性抗体の量から比較すれば極く僅かであり、生物学的な意義はあまり大きくはないと予想される。すなわち、系統的な受動免疫抗体は経胎盤性抗体によってまかなわれるものと考えられる。

感染防御の機構は大別して、局所性のものと系統的なものがある。感染因子は主として上皮とくに粘膜より体内に侵入するのであるから、第1の防波堤として粘膜上の局所免疫は重要な意味を持っている。局所感染防御因子にはリゾチームやラクトフェリンのような非特異的なものと特異因子としての抗体とがある。

一般には局所免疫は局所で産生される抗体が主役であり、血中抗体の粘膜表面への漏出はそれほど多くはないと思われる。したがって経胎盤性に与えられた抗体は系統的免疫すなわち第2次防波堤としての役割は果すものの、第1次防波堤の形成には不十分であろうと予想される。

その意味においては、母乳中の抗体が経胎盤抗体によってはおぎない切れないであろうところの局所免疫を補充するものであろうとして注目されるわけである。

母乳中の免疫グロブリンとしては他のクラスのものに比し Ig A が圧倒的に多いことは周知のところである。しかもこの Ig A は transport piece の結合した分泌型 Ig A が主である。

母乳中 Ig A 抗体は単に量が多いというだけでなく、次の点でも注目される。ふつう粘膜表面の局所免疫は分泌型 Ig A 抗体によって行われるのであり、その意味で母乳によって与えられた受動抗体も分泌型 Ig A 抗体の型であることが局所免疫として働く場合有利な条件となっていると予想される。その理由のひとつは分泌型であるため消化酵素などの作用を受け難く、安定な型で長く作用しうると考えられる点である。また transport piece と上皮細胞との親和性から分泌型 Ig A 抗体は長く粘膜上に滞り易く長時間作動しうるのでないかという可能性も考えられる。

以上のように、予想される母乳中分泌型 Ig A 抗体の重要性にかんがみ、母乳中より単離した分泌型 Ig A について、各種感染因子に対する抗体活性を測定し、抗体の存在する感染因子のスペクトルを検討した。

実験方法：

1. 母乳よりの分泌型 Ig A の単離

ブルーした母乳を遠心し、乳清部を回収したのち、硫酸半飽でグロブリンを塩析する。沈澱物を蒸留水で溶解し、再び塩析をくりかえす。えられたグロブリン分画を透析チューブにとり磷酸緩衝

食塩水に透析して硫酸をとり除く。

えられた製品を Saphadex G 200 カラム・クロマトグラフィーにかけ II S 分画を回収する。さらに DEAE セルロースのカラム・クロマトグラフィーにかけて分泌型 Ig A を精製する。

以上が分泌型 Ig A 回収の方法の原理であるが、国立がんセンター血清部・向島博士の御協力により製品をえた。

2. 分泌型 Ig A の純度の検討

二重拡散ゲル内沈降反応で製品と抗 Ig G, 抗 Ig M, 抗 Ig A, 抗 transport piece との反応性を調べた。製品は Ig G 抗体及び Ig M 抗体と沈降輪を形成しなかったが、抗 Ig A と反応して沈降輪を作り、抗 transport piece との沈降輪と癒合した。以上より製品の分泌型 Ig A としての特異性が確かめられた。

3. ポリオ・単純ヘルペスウイルスに対する中和抗体の測定

U型マイクロタイタープレートに Vero 細胞の monolayer を作り、それぞれの孔に10倍段階希釈のウイルスを接種してウイルスの感染力価を測定した。

100 TCD₅₀ のウイルス液 0.1 ml と 2 倍段階希釈の分泌型 Ig A 製品それぞれ 0.1 ml を混和、37°C 1 時間反応後、それぞれをマイクロタイタープレートの Vero 細胞に接種し観察、cytopathogenic 効果の抑制から中和抗体価の測定を行った。

4. インフルエンザ A・B, ムンプス, ワクチニアに対する赤血球凝集反応阻止抗体の測定

5% ニワトリ赤血球浮遊液 0.25 ml と 2 段階希釈ウイルス液それぞれ 0.25 ml とを混和、小試験管中に静置凝集反応を観察してウイルスの赤血球凝集価を測定した。

凝集価の 4 倍濃度のウイルス液 0.125 ml と 2 倍段階希釈の分泌型 Ig A 製品それぞれ 0.125 ml とを混合、37°C 1 時間反応後、等量のニワトリ赤血球浮遊液に加え、ウイルスによる赤血球凝集反応の阻止効果を調べ、赤血球凝集反応阻止抗体価の測定を行った。

5. 各種細菌に対する凝集抗体価の測定

各種細菌の浮遊液 1 滴と 2 倍段階希釈分泌型 Ig A 製品それぞれ 1 滴とをガラス板上にて混和、凝集を観察し、凝集価の測定を行った。

検討した菌の種類はコアグラセ陽性ブドウ球菌・大腸菌・赤痢菌・緑膿菌・サイトロバクター・エロモナス・エンテロバクター・パラチフス A・パラチフス B・クレブシエラ・変形菌・霊菌・レットゲレラ・モルガネラなどである。

実験成績：

1. 分泌型 Ig A のウイルス抗体

10 mg/dl の濃度に調整した製品を原液とするとポリオの 3 型混合ワクチン・ウイルスに対し 8 倍希釈濃度まで中和作用をみることができた。3 型それぞれに対する抗体のうち一番低いものでも 8 倍の中和抗体があることになる。

単純ヘルペスウイルス・インフルエンザ A・インフルエンザ B・ムンプス・ワクチニアウイルスに関しては中和抗体ないしは赤血球凝集反応阻止抗体の作用を証明しえなかった。

2. 分泌型 Ig A の細菌抗体

結果は表に示したが、10⁷mg/dlの濃度を原液として、サイトロバクターに対し32倍、コアグラセ陽性のブドウ球菌に対し16倍、大腸菌に対し8倍、赤痢菌 (flexneri) に対し8倍、エロモナスに対し8倍、緑膿菌に対し4倍、エンテロバクター (クロアカ) に対し4倍の凝集価が証明された。エンテロバクター

(ハフニア), サルモネラ属のパラタイフィ A, パラタイフィ B, クレブシェラ, 変形菌 (尋常性), 変形菌 (ミラピリス), 霊菌, レットゲレラ, モルガネラ, イエルシニアに対しては抗体を証明しえなかった。

考按:

今回検討した微生物のうち、母乳中分泌型 Ig A に抗体活性が証明されたものはウイルスではポリオ、細菌ではブドウ球菌・大腸菌・赤痢菌・緑膿菌などであり、いずれも腸内感染の原因として多いものである。

これらの菌ないしウイルスに対し高い抗体が存在する理由は、それらが環境に広く浸透している微生物で、母体が感作される機会が多いためと考えられる。

合目的的にみれば、比較的浸透度がつよく、したがって乳児が感染をうける機会の多いものに対して母乳中に局所免疫として効果の高いと予想される分泌型 Ig A 抗体が存在することは、乳児を感染から守る上できわめて都合のよいことである。

更に経口的に与えられた抗体がもっとも威力を発揮するであろうと考えられる微生物は腸内感染を起すようなものに対してであろうから、その意味でも特にそのような微生物に対して分泌型 Ig A 抗体が存在するという事は具合がよいわけである。

以上より、母乳中には各種微生物に対する分泌型 Ig A 抗体が存在し、乳児の主として腸内感染

表1 母乳中分泌型 Ig A の抗微生物抗体価

ウイルスの種類	抗体価	細菌の種類	抗体価
ポリオ (I, II, III)	1 : 8	サイトロバクター	1 : 32
単純ヘルペス	—	ブドウ球菌 (コアグラセ)	1 : 16
ムンプス	—	大腸菌	1 : 8
インフルエンザ A	—	赤痢菌 (flexneri)	1 : 8
インフルエンザ B	—	エロモナス	1 : 8
ワクチニア	—	緑膿菌	1 : 4
		エンテロバクター (クロアカ)	1 : 4
		エンテロバクター (ハフニア)	—
		パラタイフィ A	—
		パラタイフィ B	—
		クレブシェラ	—
		変形菌 (尋常性)	—
		変形菌 (ミラピリス)	—
		レットゲレラ	—
		霊菌	—
		モルガネラ	—
		イエルシニア	—

に対して防御的な重要な役割を果しているものと考えられる。

結語：

母体より児に受動的に与えられる抗体のうち経盤性のものは体内に感染因子が侵入してからの系統的防御機構として働き、母乳中の抗体は感染因子が体内に入る以前に防御する局所免疫として作用すると予想される。

母乳中の抗体のうち分泌型 Ig A に属するものは、その量が多いこと、安定であり局所免疫の目的にかなった分子構造をしていることから、もっとも重要と考えられる。

母乳中分泌型 Ig A に属し抗体活性を証明しえた微生物は、ポリオ・ブドウ球菌・大腸菌・緑膿菌・サイトロバクター・エロモナスなどであった。

これらの微生物は、広く淫浸しているもので乳児の感染の危険度の高いものである。また経口投与された抗体がもっとも働きやすいと考えられる腸内感染を起す種類のものである。

その意味でこれらの微生物に対する分泌型 Ig A 抗体は乳児の感染防御に重要な役割を果しているものと予想される。

II 母乳中及び乳児流血中のマクロファージ機能測定のための方法論の開発について

母乳中にはかなりの量のマクロファージが存在する。それらがはたして乳児においてなんらかの生物学的な作用をもち、感染防御において意義があるか否かは未だ明かでない。その検討の前提として母乳中のマクロファージがどの程度の機能を保持しているのかが把握されねばならないであろう。

また、乳児期の細胞性免疫のうちリンパ球系の機能はかなり発達しているが、マクロファージの機能は不十分で、そのため細胞性免疫能の機能発現が不十分とされている。母乳栄養児と人工栄養児の免疫能を比較するためにはマクロファージの機能の比較が重要であろう。

しかしながら、マクロファージの機能を測定するための方法論はいまだ十分開発されていない。独自の方法を考案し実用化しようと試みているので、その方法について述べる。

1. リンパ球混合培養反応補助能を利用したマクロファージ機能測定法

同種のリンパ球を混合して培養すると、互いに相手の同種抗原に反応してリンパ球は DNA 合成亢進を起す。この際マクロファージが存在しないとこの反応が起らない。この原理を利用して、リンパ球のみの混合培養に一定量のマクロファージ(単球)を添加し、基準とする同数のマクロファージを加えた場合の DNA 合成度と比較することにより、被検マクロファージの機能を測定しようとするものである。

- 1) 被検者と健康成人の末梢血より、Conray-Ficoll 比重遠心法でリンパ球・単球群を分離する。
- 2) 100 倍数のヒツジ赤血球と同上細胞を胎児牛血清に浮遊し、数本の試験管に分注して低速遠心後、そのまま氷水中に 1 時間静置する。
- 3) 静かに細胞を再浮遊し、Conray-Ficoll 液にのせ、再び比重遠心操作を行う。T cell

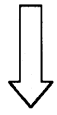
はヒツジ赤血球とロゼットを形成しているので管底に沈降し、B cell と単球は中間層に残される。

- 4) 中間層の細胞中の単球の百分率を測定する。 1×10^5 個の単球を含む細胞を培養管に入れる。
- 5) 単球と同時に培養管に移されたと同数の T リンパ球 (管底から回収されるリンパ球) を相手方の培養管に入れる。
- 6) 相方の培養管中のリンパ球がそれぞれ 5×10^5 , 合計 1×10^6 になるように T リンパ球を用いて調整, 20%胎児血清添加 medium RPMI 1640 1 ml 中に浮遊。
- 7) 6日間 37°C にて培養, 3H-thymidine $1 \mu\text{ci}$ 加え, 24時間後細胞内の放射活性を測定する。
- 8) 被検マクロファージを加えた培養の放射活性と対照マクロファージを加えたものとの比をとって, 相対的に被検マクロファージの機能を表現する。
- 9) リンパ球の DNA 合成率はマクロファージの数量依存性で 1×10^5 個以上の添加で良い成績をえた。それ以下の量では成績が不安定で誤差が多くなる。
- 10) 健康者間の変動は $\pm 20\%$ 以内であり, それ以上の変動を示す場合, 機能の亢進ないし低下と判定しうると考えられた。

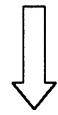
2. マクロファージ遊走能の測定法

- 1) 健康者リンパ球を medium RPMI 1640 に $5 \times 10^7/\text{ml}$ に浮遊, phytohemagglutinin を添加して24時間・ 37°C にて培養, 上清をマクロファージ走化因子として使用した。
- 2) 末梢血からマクロファージを回収する場合は, 前記比重遠心法でリンパ球・単球を分離し, ついでロゼット沈降法で T リンパ球を除き, マクロファージの比率を上昇させた。かくしてマクロファージ50~70%の細胞がえられる。
- 3) 管底に 1μ 径孔の nucleopore 膜を張った培養管にマクロファージ約 1×10^4 個を含む浮遊液を入れ, 細胞が沈下するのを待って, 管を走化因子を入れた試験管に浸す。
- 4) 37°C で100分放置後, nucleopore 膜をメタノール固定, ギョムザ染色する。
- 5) 検鏡し膜の対側にまで遊走したマクロファージの百分率を算出する。
- 6) 走化因子の力価により左右され易いので, 常に健康成人のマクロファージを対照とし相対的に評価する。

上記のごとく本年度はマクロファージ機能測定の方法の確立にとどまったが, これらの方法を応用して, 母乳中のマクロファージ, 乳児流血中のマクロファージの機能測定を行う予定である。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



I 各種感染因子に対する母乳中の分泌型 Ig A 抗体について

新生児・幼若乳児は免疫学的に未成熟である。ことに抗体産生系の発達は未だ完成されていない。自力での抗体産生が軌道に乗り始めるのが数カ月、ほぼ成人域に至るのは2~3歳以後と予想されている。

このような未熟な免疫能したがって不十分な感染防御能を補うものとして、母子受動免疫が存在すると考えられているわけであるが、その母親由来の抗体が授与される径路には経胎盤性のものと母乳由来のものがある。