

の感染像を細菌学的, 酵素組織化学的, 病理組織学的視点から検討を加えた。S. typhimurium 経口投与後において, Bifidobacterium adolescentis の小腸内定着性はかなり阻害されたが, 大腸内定着性の抑制は著明でなかった。また, S. typhimurium の小腸内増殖性および肝内増殖性は単独感染の場合に比較して軽度の増殖抑制がみられるようであった (Fig. 1, 2)。また, 肝におけるアルカリフォスファターゼおよびアシドフォスファターゼ活性の動態は, S. typhimurium 単独感染の場合におけるそれらの動きと比較し著明な差はみられないようであった。肝における granuloma の形成は S. typhimurium 単独感染の場合と比較し, ほとんど差がみとめられなかった。

Bifidobacterium adolescentis と大腸菌とを経口投与してのち, S. typhimurium を経口感染させた場合においては, S. typhimurium の小腸内, 肝内増殖性の低下が軽度のみとめられた (Fig. 3)。そして, 小腸, 肝におけるアルカリフォスファターゼ活性局在の動態をみると, Bifidobacterium adolescentis と S. typhimurium の組合せの場合に比較して, その増減の程度が弱く評価された。また, 肝におけるアシドフォスファターゼ活性においては, 肝細胞における活性の低下と, クッペル星細胞における活性の上昇が著明であり, granuloma の形成は S. typhimurium 単独感染に比較してかなりな減弱がみられた。

初乳から affinity chromatography, DEAE cellulose chromatography, Sephadex G-200 gel filtration によって抽出した分泌型 Ig A 分画について, その純度を ultracentrifuge の pattern によって解析した結果, 3つの peak がみられた。main peak の沈降係数 sedimentation coefficient は 10.35 S, fast peak は 14.8 S, slow peak は 1.4 S であった。一方, DEAE cellulose chromatography, CM-cellulose chromatography, Sephadex G-200 gel filtration, affinity chromatography を適用して抽出した Secretory piece および lactoferrin についての沈降係数はそれぞれ 2.24 S および 5.15 S であった (Fig. 4, 5)。lactoferrin の分子量測定の結果, 248,000 と評価された。現在 secretory Ig A 抽出の方法について検討を加えているが, 同時に抽出された分泌型 Ig A, lactoferrin 分画について, その抗菌作用を各種細菌を用いて検討している。

個体発生の視点からの腸内菌叢の生態学的解析, 初乳中の感染防御因子の検討を含めた免疫学的解析を基盤として, 新生児における生体防衛機構解明への足掛りを求めてゆきたい。

母乳の免疫学的アプローチに関する研究

岡山大学医学部小児科 喜多村 勇
研究協力者 国富泰二, 林 洋光, 西林洋平
尾崎 寛, 小倉英郎, 脇口 宏
二宮美知子, 永瀬 恵, 埴岡範雄

母乳中の感染阻止または免疫学的防禦作用を担当するものとしては, 液性因子及び細胞(主とし

てマクロファージ)がある。

今回は、これらを多角的に検討した。

1. 母乳細胞の非特異的 mitogen に対する反応(分娩後日数及び初産、経産の比較)

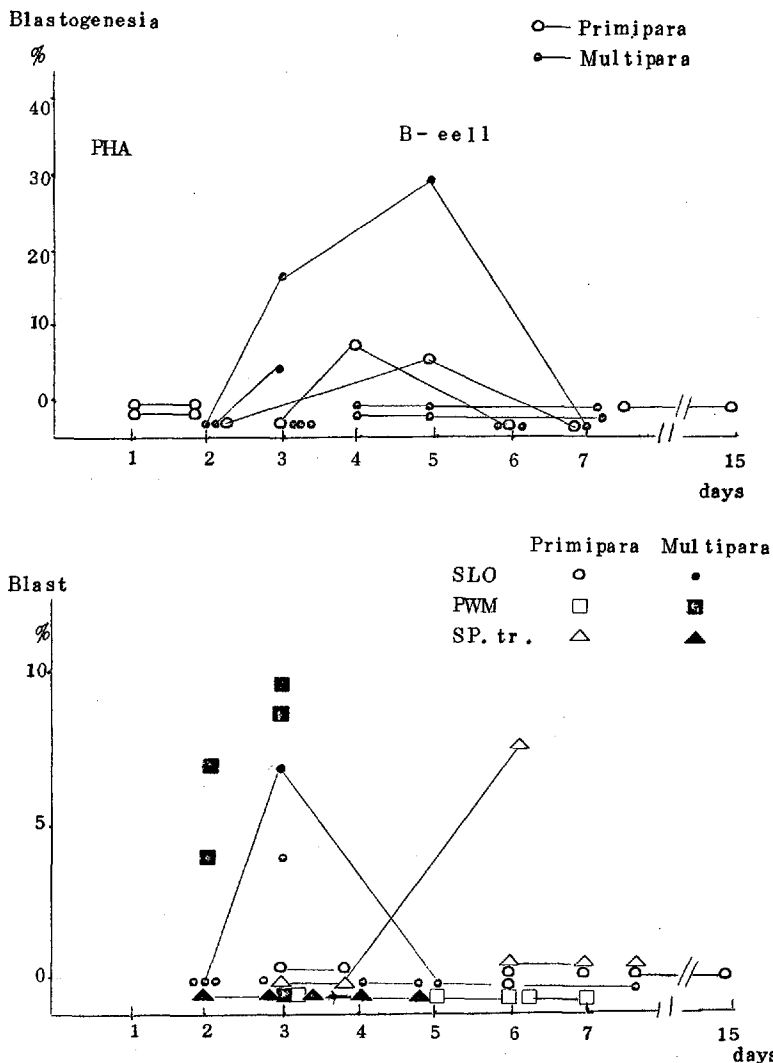
初乳(一部は成熟乳)を可及的無菌操作で採取し、1時間以内に、2,000 rpm 5分速沈し、沈渣を Hanks' BSS で1回洗浄後、細胞数を $1 \sim 5 \times 10^6/ml$ としたのち、小試験管内で培養した。培養液は TC MED 199 に10%仔牛血清を含有するものを1.0ml 使用した。PHA 1滴, PWM 1

滴, SLO 0.1ml及び無添加コントロールをつくり、培養6日後、これら細胞の染色標本をつくり、250ヶ白血球の中の blast 細胞の比率をもとめた。その結果、図1に示す如く PHA に反応する細胞は、分娩第3~5日に出現し、PWM 又は SLO に反応する細胞は、第2~3日に集中していた。此のことは、初乳の中のリンパ球の Subpopulation の、経日的変化を示唆するものと考えられた。初産、経産の比較は、例数が少ないため今回は結論を得られなかった。

2. 母乳栄養の、乳児ツベルクリン反応に及ぼす影響

Mohr らが、母乳栄養により、母のもつつ反陽性が、児に移行することを報告して、遅

図1 母乳細胞の非特異 mitogen に対する反応
分娩後日数及び初産・経産の比較(培養6日間)



延型過敏症の、母子間移行を示唆したので、より詳しく検査した。即ち表1に示す如く、初期哺乳歴の有無、生後1カ月の栄養法などをチェックし、その後1, 3, 7, 10カ月に、児のツ反を検討した。その結果、初乳及び母乳哺乳児の1例が、生後7カ月以後ツ反陽転を示した以外、ツ反の移行は認められず、母乳哺乳児によるツ反移行は、少くとも3カ月迄は否定的な結果を得た。

表1 母乳栄養の乳児ツベルクリン反応に及ぼす影響

		初乳	乳児ツ反判定月令 栄養法	1カ月	3カ月	7カ月	10カ月
				母親ツベルクリン反応	+	母乳	0/74 (3)
混合乳	0/47	0/28	0/9			0/1	
人工乳	0/2	0/1	0/1			0	
-	母乳	0/5	0/4 (1)		0/1	0	
	混合乳	0	0		0	0	
	人工乳	0/5	0/6		0/1	0/1	
-		0/72 (3)	0/57 (2)	0/15	0/1		

- 注：1) 栄養法は生後1カ月間の栄養
 2) ツベルクリンテスト 0.00005 mg PPD
 3) 反応陽性は48時間判定で5 × 5 mm以上
 4) 分母は被検者延べ人数
 分子は反応陽性者延べ人数
 ()内は家族歴にTb, (+)

3. 栄養法別、乳児末梢

血中、E. ロゼット形成細胞及びIg 値

初乳哺乳の有無、その後の栄養法による乳児末梢リンパ球の、E. ロゼット形成細胞(Tcell)の比率及び、ハイランド immunoplate 法を用いた Ig G-A-M 値を、各月令の乳児について測定した。結果は図2に示すように、栄養法別の特長は認め得なかった。然し個々の例について、E-ロゼット、Ig G-A-M 値の相関関係を、各月令の正常平均値を100とした際の比で図示すると、人工栄養児は、母乳栄養児に比して、Ig M 高値、Ig A 低値の傾向を示した(図3)。

4. 栄養法別、乳児血中、E - coli 抗体

乳幼児期における。血清大腸菌抗体価を、感作血球凝集反応により測定した。方法は図4に示す通りで、羊血球の感作には、E. coli, 014, K-12 の lipopolysaccharide を用いた。

その結果、図4に示す様に、大腸菌抗体価は、月令と共に上昇する傾向を有した。また、1カ月から5カ月迄の乳児において、母乳栄養児は、7例中全例が大腸菌抗体陰性であったが、人工栄養児では、10例中6例に抗体価の上昇を認めた。また、初乳の抗体価は320倍以上と高値を示した。

以上の事から、人工栄養児は乳児期初期より、大腸菌に感作されていると考えられた。また、母乳栄養児は大腸菌抗体陰性であったが、この点については、初乳の大腸菌抗体の関与が推測された。

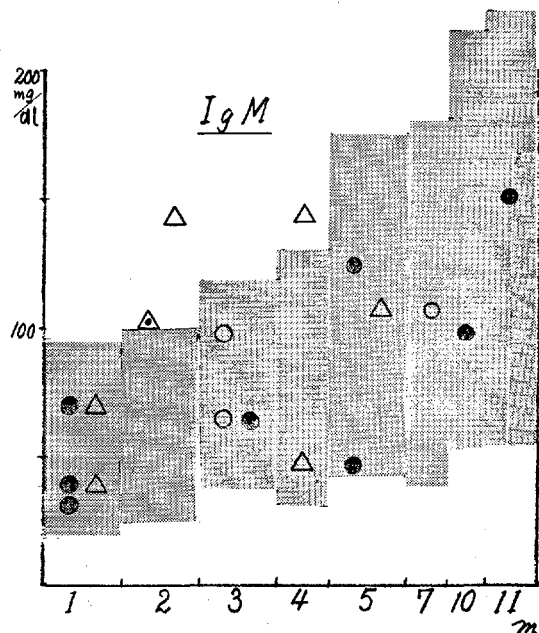
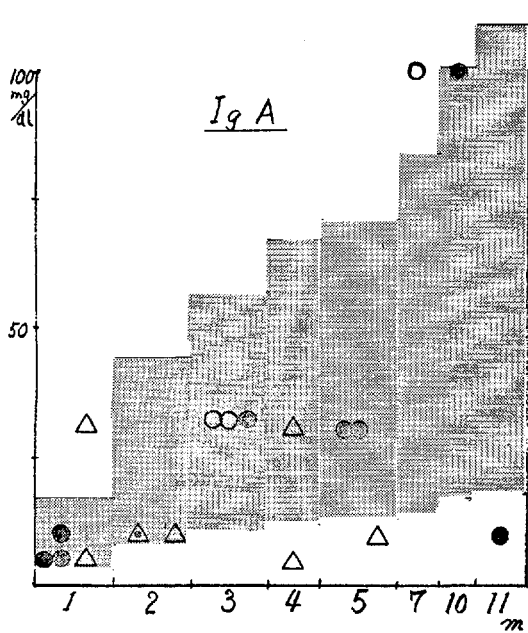
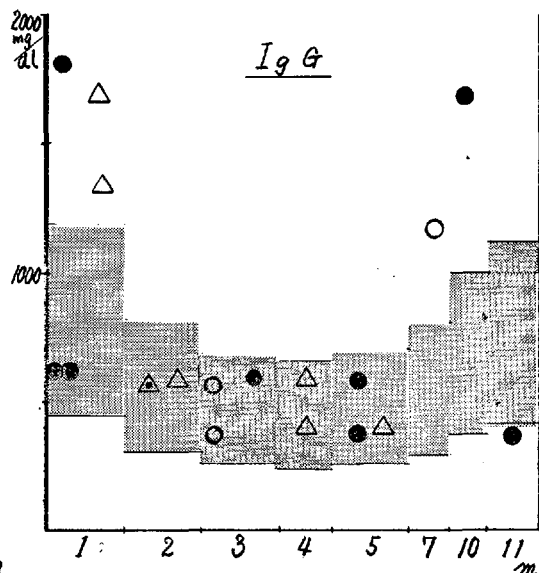
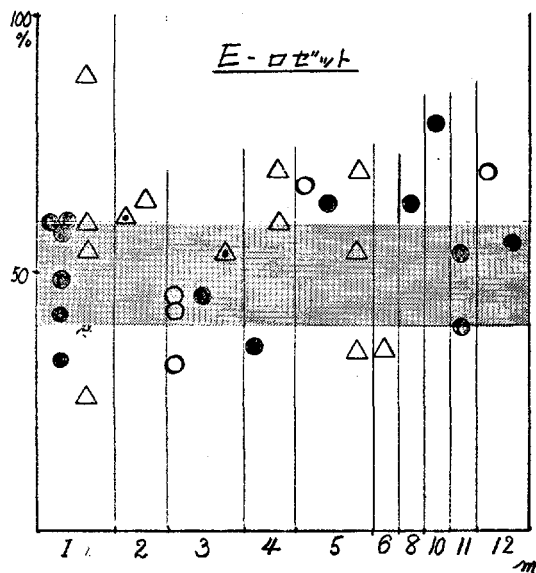
5. 初乳マイクロフェージからのインターフェロン産生

緒言：

乳汁中にインターフェロンが存在することは既に知られていることである。今回我々は初乳中のマクロフェージからIF. 産生を試みてみた。

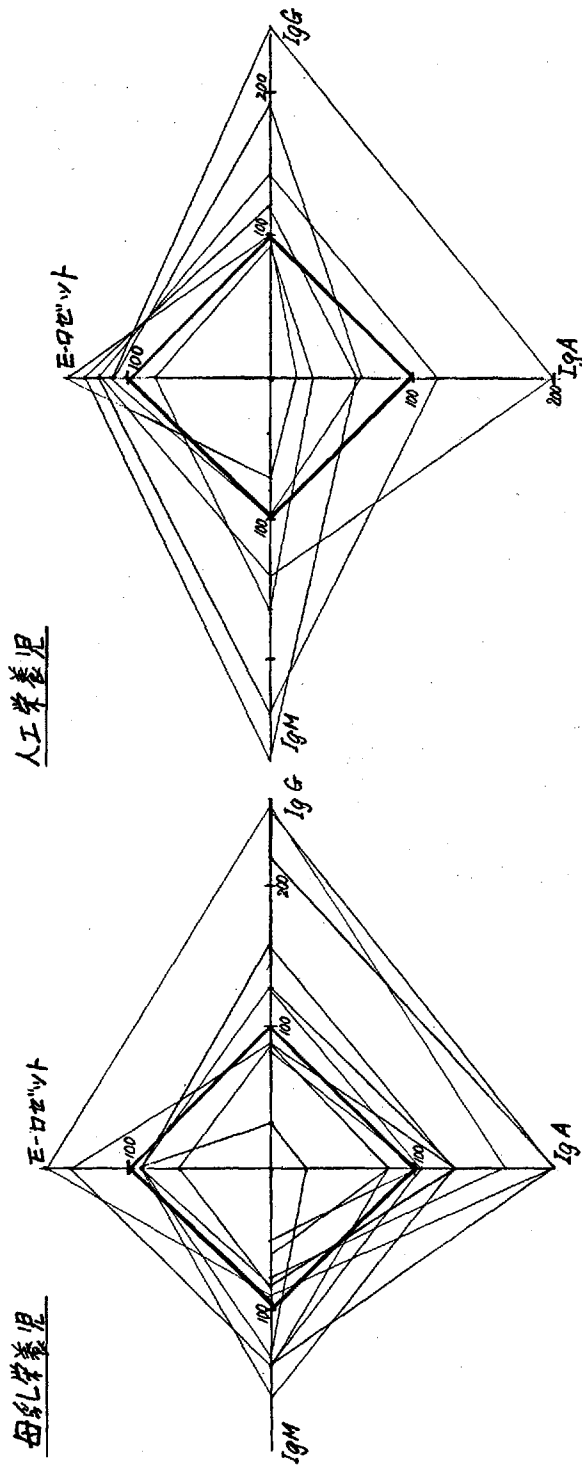
図2 乳児栄養法の免疫系に及ぼす影響

- ：初乳(+)1カ月間母乳
- ：初乳(+)6カ月間母乳
- △：初乳(+)以後人工乳
- △：人工乳のみ



注：陰影領域は各月年正常範囲

図3 乳児栄養法の免疫系に及ぼす影響
 (E-ロゼット形成細胞と免疫グロブリンとの相関について)



- 注: 1) 対象者は生後1カ月から11カ月
 2) 栄養法は生後1カ月間の栄養
 3) 数値は各年令正常値に対する%

図4 乳幼児期における血中E. coli 抗体価(年令別, 栄養別)

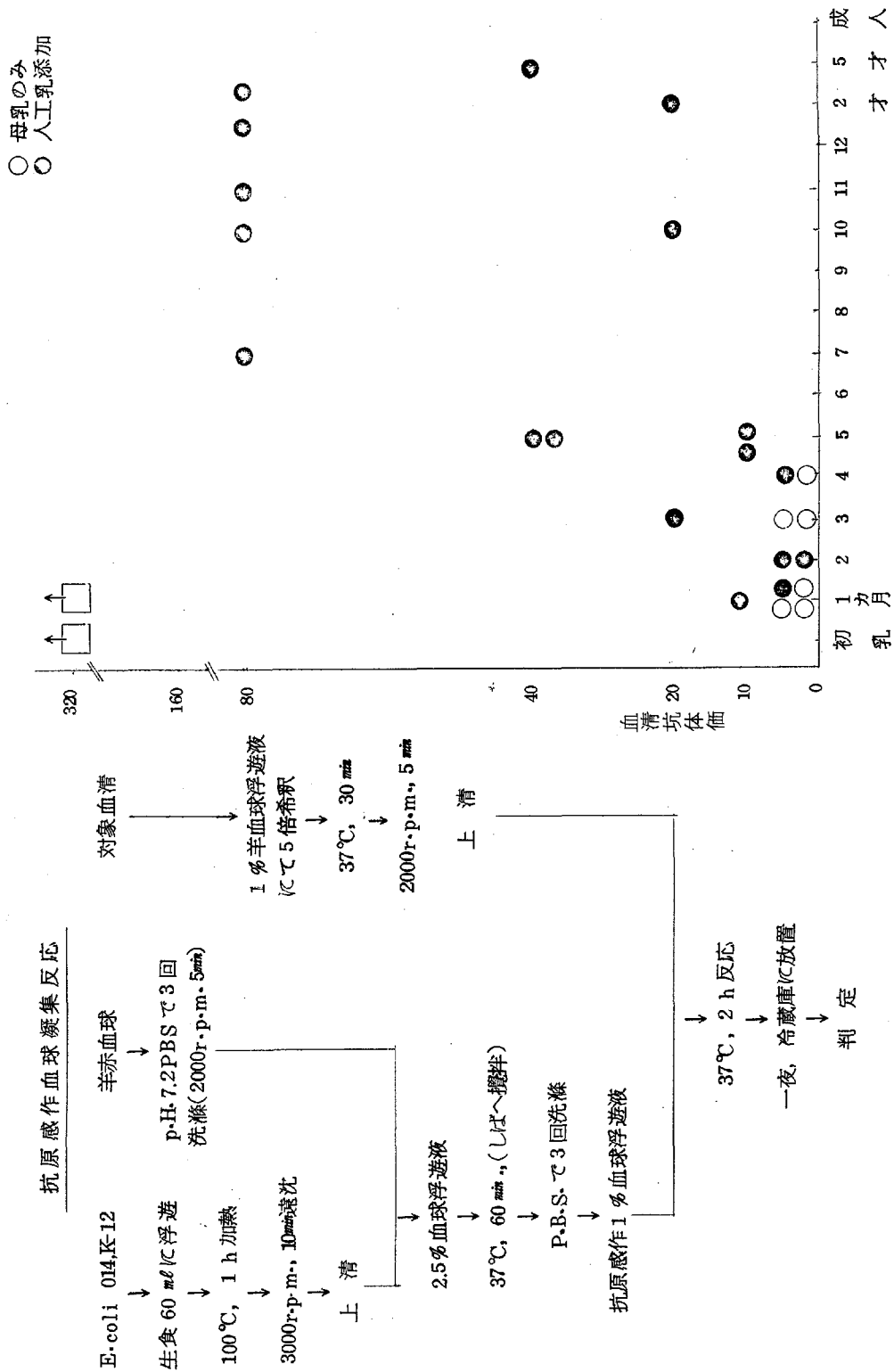


表2 * Interferon production of macrophage in the colostrum stimulated by measles virus.

colostrum
 ↓
 centrifuged at 2000 r.p.m. for 10min.
 ↓
 washed 3 times with P. B. S.
 ↓
 cell counts are adjusted to 2×10^6 per ml (T C 199 cont. 10% calf sera)
 ↓
 stimulated by 0.1ml of wild measles virus ($10^{2.7}$ TCD₅₀) for 48 hours.
 ↓
 centrifuged, stored of super at pH 2.0 overnight.
 ↓
 adjusted to pH 7.0
 ↓
 diluted 10, 1000 folds with T C Med. 199 cont. 2% calf sera.
 ↓
 JTC - 3 monolayer cell plate for 24 hours.
 ↓
 VSV incubation for 1 hour.
 ↓
 50% plaque reduction.

Result

I. F. dilution	No. of plaque / plate	average (%)
10	122	122 (21.7)
100	270	277 (49.3)
1000	418	377 (70.8)
cont	517	561 (100)

Interferon titer : 100 unit.

方法：

無菌的に初乳を採取し 2000 r.p.m. 10分間遠沈後生食にて 3 回洗浄, 10% 仔牛血清加 T C 199 液 1 ml 中に 2×10^6 になる様に調製する。この 1 ml に麻疹ウイルス (野生株 $10^{2.7}$ TCID₅₀) 0.1 ml を加え 48 時間培養後上清を pH 2.0 にて一夜おいた後 pH 7.0 に戻す。2% 仔牛血清が T C 199 液にて 10, 100, 1000 倍に希釈し 24 時間単層 JTC-3 細胞を培養した後, VSV を使用して 50% ブラーク半減法にて IF. titer を測定した。

表3 * Attempts of transfer of P.P.D.& Lc 16m 8skin reactivity with transfer factor from human colostrum to guinea pig.

Total colostrum : 62 samples
 Total cell counts : 4.33×10^8

colostrum
 ↓
 centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min.
 ↓
 cell pellet is washed 3 times with P.B.S. or Hank's B.S.S.
 ↓
 resuspended in 0.5 ml of P.B.S.
 ↓
 pooled in the frozen state at -20°C
 ↓
 thawed and resuspended in 3 ml of P.B.S
 ↓
 freezed and thawed 10 times with dryice-alcohol and 37°C water bath.
 ↓
 dialysed twice with each 500 ml of distilled water for 48 hours.
 ↓
 lyophilization
 ↓
 resolved in 3 ml of distilled water
 ↓
 passed through milipore filter
 ↓
 intraperitoneal injection

Result

Source of T.E.(D)	SK-T Antigen	Pre	Post		
			24	48	72 hr.
Colostrum (cell counts: 4.33×10^8)	P.P.D.	$\frac{0 \times 0}{2 \times 2}$	$\frac{0 \times 0}{1 \times 2}$	$\frac{0 \times 0}{2 \times 3}$	$\frac{0 \times 0}{2 \times 3}$
	Lc 16	$\frac{0 \times 0}{0 \times 0}$	$\frac{0 \times 0}{0 \times 0}$	$\frac{0 \times 0}{1 \times 1}$	$\frac{0 \times 0}{0 \times 0}$
Peripheral leucocytes (cell counts : 3×10^8) SK-T : P.P.D.(+) Lc 16 (+)	P.P.D	$\frac{0 \times 0}{3 \times 4}$	$\frac{0 \times 0}{4 \times 4}$ (5 th day)		
	Lc 16	$\frac{0 \times 0}{0 \times 0}$	$\frac{0 \times 0}{0 \times 0}$ (5 th day)		

P.P.D.: 0.05 g Lc 16 : 1.1×10^5 pfu SK-T : read at 48 hrs.

結果：

マクロファージ 2×10^6 から 100 unit の IF を得た (表 2)。

考察：

初乳中のマクロファージから IF が得られたことは興味あることであり、感染免疫学的に初乳は意義あるものと言えるかも知れない。即ち E. coli 等の感染に対して IF を産生するという可能性が考えられる。

今後我々は初乳中マクロファージを PHA, PWM, LPS, 等にて刺激し IF 産生を試みている予定である。

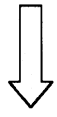
6. 初乳マクロファージからトランスファーファクター抽出の試み

初乳哺乳児の、感染抵抗獲得の理由に、トランスファーファクター (T.F.) が関与している可能性が考慮されるので、初乳中の細胞成分から T.F. の抽出を試みた。また、Zauelli 等が T.F. (D) でヒトからモルモットへ PPD に対する細胞性免疫を移入していることから、此の実験系を、初乳細胞からの T.F. (D) でも確立出来るかどうかを検討した。

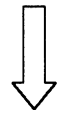
PPD, 不消化 LC-16M8 をマーカーとしてのモルモットへの移入結果は、表 3 に示す如く、投与前後の Skintest は何れも陰性であった。

そこで PPD, LC-16M8 での Skin test 陽性成人の血液から抽出した TF (D) を用いて全様の実験を行ったが、Zantlli 等の成績と異り、transfer は出来なかった。

従って初乳 T.F. のモルモット移入が不能とは断定出来ず、T.F. (D) 抽出のための細胞数、モルモットへのルートなど、検討する必要があると考えられた。



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



母乳中の感染阻止または免疫学的防禦作用を担当するものとしては、液性因子及び細胞(主としてマクロファージ)がある。