The Japanese Society of Allergology

4. アレルゲン・エキス製造方法に関する素朴な疑問
── 牛乳アレルゲン・エキスを例として ──

千葉大学医学部小児科教室
久保政次　吉田亮
本宮建　船橋茂

最初に牛乳蛋白の分劃について申し上げたい．イオン交換セルローズ（DEAE）を使用して牛乳蛋白のColumn chromatography を行いました．使用 Buffer は 0.02 M Phosphate Buffer (pH 7) に NaCl を段階的に添加しました13種のものであります（表1）．13種の Buffer に相当する部分に夫々ピークがみられます（表2）．乳清を同様の操作により Column chromatography を行いますと，Buffer 1～6の部分に流出し，これ以後には流出しません（表3）．Casein は6～13即ち後半部に流出します（表4）．6の部分にやゝ重なりが見られますが，ほゞ明確に乳清と Casein が分れます．これらのピークの同定をする意味で，比較的純粋に精製した牛乳蛋白各 Fraction につき夫々の同様の実験を行いました．

表1　緩衝液濃度

Buffer No.	Phosphate (M)	NaCl (M)
1	0.02	0
2	0.02	0.050
3	0.02	0.075
4	0.02	0.100
5	0.02	0.125
6	0.02	0.150
7	0.02	0.175
8	0.02	0.200
9	0.02	0.250
10	0.02	0.300
11	0.02	0.350
12	0.02	0.500
13	0.02	1.000

表2　生牛乳3ml　DEAE 2.5g

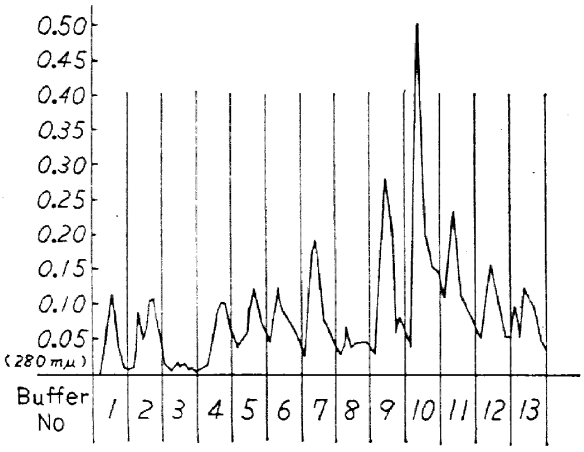


表3　乳清10ml DEAE 2.5g，0.02M Phosphate Buffer (pH 7.0)

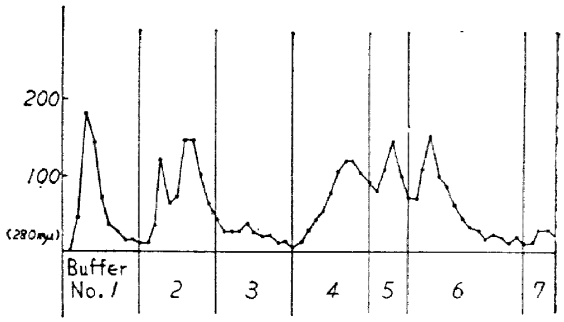
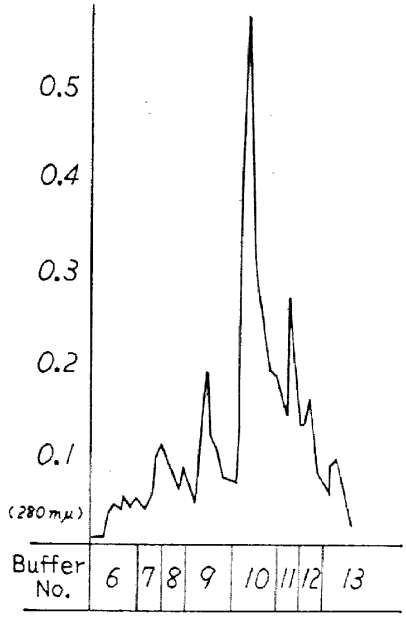


表4　生 Casein



NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Allergology

表5　α-Lactalbumin 50mg DEAE 1 g

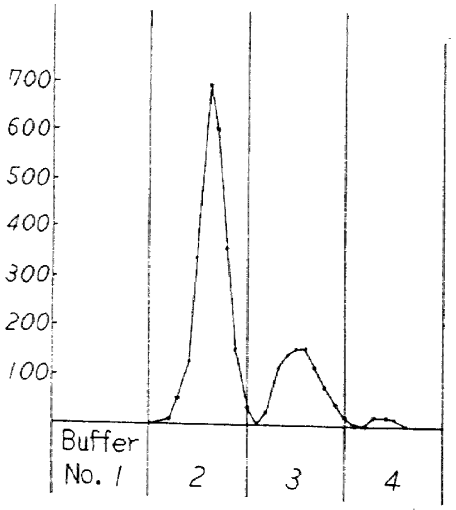


表6　β-Lactoglobulin 50mg DEAE 1 g

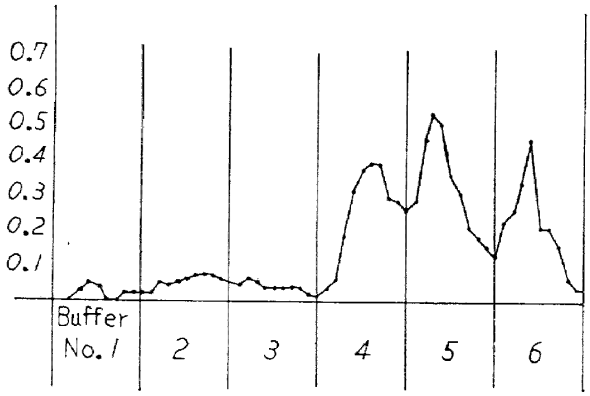


表7　その他の Globulin 50mg DEAE 1 g

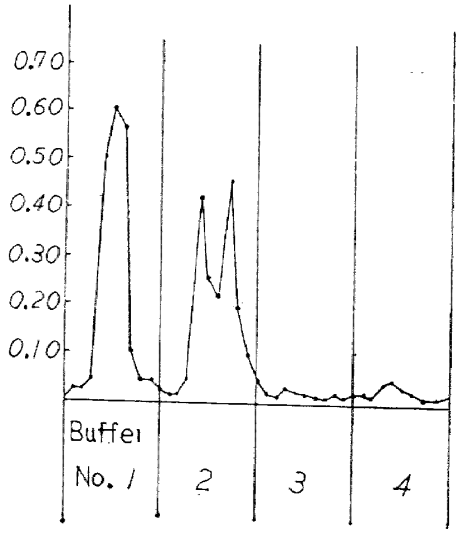


表8　α-Casein

α-Casein 100mg DEAE 2.5 g 0.02M Phosphate Buffer (pH 7.0)

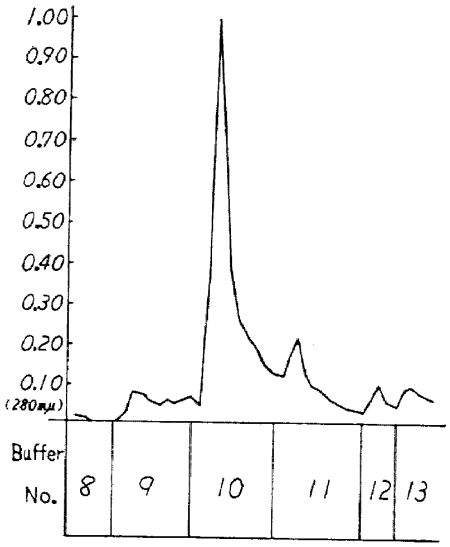
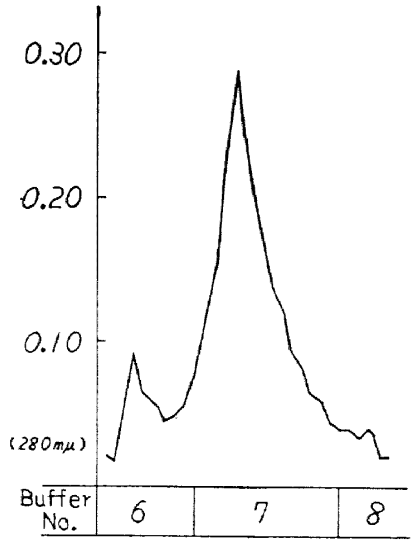


表9　β-Casein

β-Casein 150mg DEAE 2.5 g 0.02M Phosphate Buffer (pH 7.0)



α-lactalbumin は2及び3（表5），β-lactoglobulinは4・5・6（表6），その他の globulin (Euglobulin と Pseudoglobulin ですが）は1及び2（表7），α-casein は9以後（表8），β-casein は主として（表9）に夫々流出する事が分りました．之を一表にまとめますと表10の様になり，各 Fraction が比較的純粋に分離出来ました．以上，牛乳蛋白が複雑な蛋白分劃よりなつている事を示しました．

次に之等各牛乳蛋白分劃につきまして，免疫電気泳動

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Allergology

表10　生牛乳3ml　DEAE 2.5g

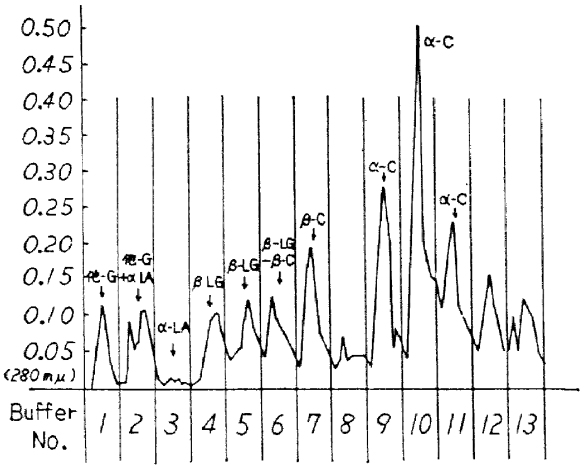


表　11

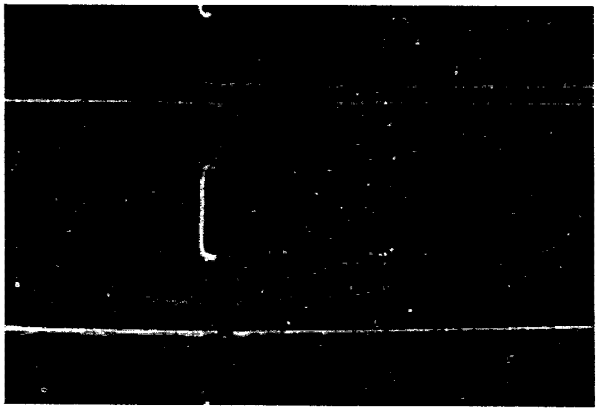
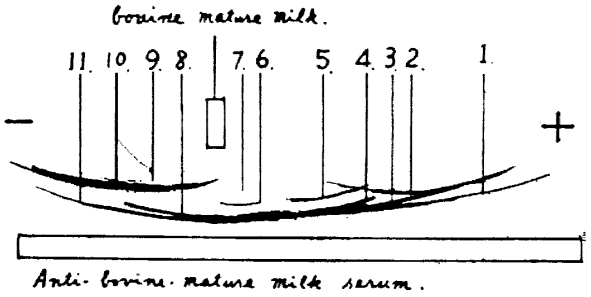


表12　Diagrammatic Representation of Immune Electrophoretic Analysis of Bovine Mature Milk by Means of Anti-Bovine-Mature-Milk Serum



α-Casein　1.　3
β-Casein　4.　6.　8.　11
α-Lactalbumin　2
β-Lactoglobulin　5.　9
Euglobulin and pseudoglobulin　10

表13　検査方法

a. 抗原吸着Latexの作製

Polystyrene Latex (0.81M) 1cc　＋　抗原

↓

混合

室温にて時々振盪 30分放置
Glycine-Saline Buffer (pH 8.2) にて2倍稀釈

b. Latex凝集反応

被検血清をGlycine-Saline Bufferで稀釈

＋

抗原吸着Latex1滴々下

37°C×24時間

判定

表14　母乳栄養児（1才以下）

症例 No.	月令	病名	成績 n= 0 1 2 3 4	判定
1	2	嘔吐	− − − − −	−
2	2	健康	− − − − −	−
3	6	健康	− − − − −	−
4	7	健康	− − − − −	−
5	17	健康	− − − − −	−
6	2	感冒	− − − − −	−
7	20B	黄疸	− − − − −	−
8	11	乳脳症	− − − − −	−
9	7	肺炎	− − − − −	−
10	5	健康	− − − − −	−

法を行い，その抗原性を検討しました．免疫電気泳動法は Scheidegger の micromethod の変法である Wadsworth and Hanson の方法に準じました．用いた buffer は $^1/_{10}$ N-veronal 一塩酸 buffer pH8.2，イオン強度 0.05泳動条件は 9.5V/cm，3時間30分でありました．生牛乳では11本の沈降線を認めました（表11）．この沈降線を同定する意味で，先に使用しました各牛乳蛋白分劃につき同様の実験を行いましたが，その詳細は時間の都合上省略し，結果だけ申し上げます．即ち表12に示しました様に，各沈降線をほゞ同定する事が出来ました．以上から牛乳蛋白は複雑な抗原複合体であるといえます．

次に Latex 凝集反応により乳幼児血清中の牛乳抗体の検索を行いました．詳細は明日のアレルギー学会総会に於て発表致します．検査方法は表13の通りで，Latex と抗原を混和し，Glycine buffer で段階稀釈した血清に滴下します．母乳栄養児10例では何れも陰性でした

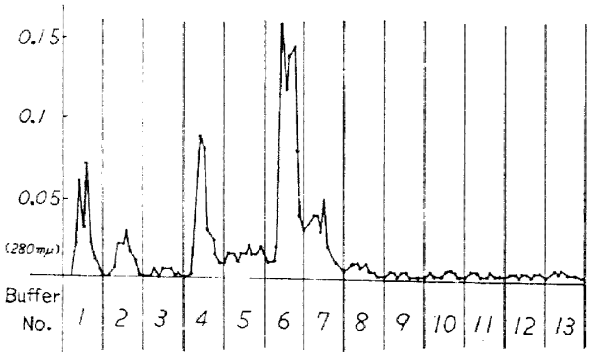
NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Allergology

表15　牛乳分劃抗原吸着 Latex 粒子による検査

No.	抗　原	N＝1	2	3	4	5	6	No.	抗　原	N＝1	2	3	4	5	6
11	α－LA	−	−	−	−	−	−	23	α－LA	−	−	−	−	−	−
	β－LG	−	−	−	−	−	−		β－LG	−	−	−	−	−	−
	他のG	＋	−	−	−	−	−		他のG	−	−	−	−	−	−
	α－C	＋	＋	＋	−	−	−		α－C	＋	＋	＋	−	−	−
	β－C	＋	＋	−	−	−	−		β－C	＋	＋	−	−	−	−
13	α－LA	−	−	−	−	−	−	34	α－LA	−	−	−	−	−	−
	β－LG	−	−	−	−	−	−		β－LG	−	−	−	−	−	−
	他のG	＋	−	−	−	−	−		他のG	−	−	−	−	−	−
	α－C	＋	＋	＋	−	−	−		α－C	＋	＋	−	−	−	−
	β－C	＋	＋	＋	−	−	−		β－C	−	−	−	−	−	−
14	α－LA	−	−	−	−	−	−	35	α－LA	−	−	−	−	−	−
	β－LG	−	−	−	−	−	−		β－LG	−	−	−	−	−	−
	他のG	−	−	−	−	−	−		他のG	−	−	−	−	−	−
	α－C	±	−	−	−	−	−		α－C	＋	−	−	−	−	−
	β－C	±	−	−	−	−	−		β－C	−	−	−	−	−	−
15	α－LA	＋	＋	＋	＋	＋	−	36	α－LA	−	−	−	−	−	−
	β－LG	＋	＋	＋	＋	＋	−		β－LG	−	−	−	−	−	−
	他のG	＋	＋	＋	＋	−	−		他のG	−	−	−	−	−	−
	α－C	＋	＋	＋	−	−	−		α－C	＋	＋	＋	−	−	−
	β－C	＋	＋	＋	＋	＋	−		β－C	＋	＋	−	−	−	−
16	α－LA	−	−	−	−	−	−	37	α－LA	−	−	−	−	−	−
	β－LG	−	−	−	−	−	−		β－LG	−	−	−	−	−	−
	他のG	＋	−	−	−	−	−		他のG	−	−	−	−	−	−
	α－C	＋	＋	−	−	−	−		α－C	＋	−	−	−	−	−
	β－C	＋	＋	＋	−	−	−		β－C	−	−	−	−	−	−
18	α－LA	＋	−	−	−	−	−	20	α－LA	＋	＋	＋	＋	＋	−
	β－LG	＋	−	−	−	−	−		β－LG	＋	＋	＋	＋	＋	−
	他のG	−	−	−	−	−	−		他のG	＋	＋	＋	＋	−	−
	α－C	＋	＋	＋	＋	−	−		α－C	＋	＋	＋	＋	＋	−
	β－C	＋	＋	＋	＋	−	−		β－C	＋	＋	＋	＋	＋	−
19	α－LA	＋	＋	−	−	−	−	50	α－LA	＋	＋	＋	−	−	−
	β－LG	＋	−	−	−	−	−		β－LG	＋	＋	＋	＋	−	−
	他のG	＋	−	−	−	−	−		他のG	＋	＋	＋	−	−	−
	α－C	＋	＋	＋	−	−	−		α－C	＋	＋	＋	＋	−	−
	β－C	＋	＋	＋	−	−	−		β－C	＋	＋	＋	＋	−	−

表16　Rennin 処理市販牛乳 6ml　DEAE 1 g



(表14). 人工乃至混合栄養児に陽性例がみられますが，その抗体がどの牛乳蛋白分劃に対応するかをみました．表15の通り，各分劃に対応するものがありますが，特にCasein に相応するものが多い様でした．

以上の諸実験に基いて，市販牛乳アレルゲンエキスを検討してみました．市販牛乳アレルゲンエキスは①市販の牛乳を12.000 r.p.m 10分間遠沈し脱脂します．次に②800 ml の脱脂乳に1％レンニン溶液 2.5 ml を加え，37 ℃ 1時間半incubate遠心して，③上清を水道水に対してセロファン透析し，④ Protein N値を1 μg PN/ml に Saline で稀釈，⑤ 細菌濾過（シヤンベラン）無菌充鎮したものです．同様の操作により我々が製造したものをDEAEによる Column chromatogrophy にかけてみました．表16の通り，夫々のピークは低いのですが，1・4・6及び7に主として流出しました．即ち我々の実験成績よりみますと，β-lactoglobulin が主で，之にその他の globulin が少々入つて居るものでありまして，製造方法よりして当然予期されました如く，Casein はほとんど含まれて居りませんでした．

アレルゲンエキスとして，出来れば抗原を完全に，その多様性をふくめて保持して居る事が望ましい事は申す迄もありません．この意味で，市販アレルゲンエキスの臨床的価値には自ら限度があると思われます．今日は牛乳アレルゲンエキスを例としたものでありますが，この様な問題が他のアレルゲンエキスにもないとは言えません．この点での検討が更に必要と思う次第であります．

NII-Electronic Library Service