

アレルギー素因の母子間移行に関する臨床疫学的研究

—第2編—

母乳中卵白抗原の定量

東京慈恵会医科大学小児科

秋 本 憲 一

国立小児医療研究センター免疫アレルギー研究部

飯 倉 洋 治

Key words: 母乳中抗原, 蛍光酵素抗体法, アレルギー性疾患の発症機序

要 旨

母乳中の卵白抗原を検出するために蛍光酵素抗体法による測定系を検討し, 母乳中オバルブミンが0.1ng/mlまで測定可能であった。この測定系を用いて単回搾乳と鶏卵負荷による経時的搾乳による母乳中オバルブミンの定量を行った。卵制限をしている母親の母乳からは1例を除き, オバルブミンが検出されなかった。鶏卵2個を負荷して経時的搾乳を行った結果では, 20名中14名の母乳中にオバルブミンが最高170ng/ml検出された。検出された例での負荷時のピークは30分から8時間で(平均±標準誤差: 156.6±36.3分), 24時間後には完全に消失した。

鶏卵負荷による卵白抗原母乳中最高濃度およびその出現時間と, 患児の血清IgE, 特異IgE, 特異IgGおよびIgAとは関連が認められなかった。

はじめに

気管支喘息, アトピー性皮膚炎を主とするアレルギー疾患は母親の妊娠中, 乳幼児早期からの発症予防が重要であると考えられている。妊娠中に摂取した食物が胎児の抗体産生に影響を与え, アレルギー体質の強い母子ではその傾向が特に強いことを筆者らは報告してきた^{1,2)}。離乳食開始前の乳児の血清からしばしば胎盤非通過性の食物特異IgE抗体が検出されることがあり, これは母親の妊娠中の摂取による経胎盤感作, および経母乳感作が考えられる。今回我々は, 卵白の主要抗原であるオバルブミン(OVA)の母乳による感作を確認するために, 蛍光酵素抗体法による母乳中OVAの測定系を確立し, 鶏卵負荷による経時的な母乳中OVAの測定等を行ったので報告する。

対象および方法

1) 母乳中OVA測定系の検討

放射性物質を使用しない方法で, ラジオイムノアッ

セイ法に匹敵する感度で測定できるような測定系の確立を計った。すなわち, 井上らの方法³⁾に改変を加えた蛍光酵素抗体法で, 96穴ポリスチレンプレート(Nunc)にアフィニティー精製抗OVA抗体を固着させ, 10% FCSでブロックした後, 脱脂した母乳およびコントロール系列を反応させ, ビオチン化アフィニティー精製抗OVA抗体, ストレプトアビジン β ガラクトシド(Zymed), 0.1Mの4-Mu- β -Gal(Sigma)を順次反応させ, 0.1Mグリシン緩衝液(pH10.5)で反応を停止し, フルオロスキャン(大日本製薬ラボラトリプロダクツ)で蛍光強度を測定した。

測定系の確立のために, 以下に示す操作, 検討を行った。

① 市販抗体の精製

検出感度を上げるために, 市販のヒツジ抗OVA血清IgG分画(Cappel)に対してアフィニティークロマトグラフィー精製を行った。以下に今回行った精製方法を示す。

リガンドとして精製OVA(Grade VII, Sigma)を用い, セファロース4B(Pharmacia)とカップリング

Abbreviations: FCS Fetal Calf Serum, 4-Mu- β -Gal 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactoside, OVA Ovalbumin, PBS Phosphate Buffer Saline

させた。カラムに充填した OVA 結合セファロース 4 B にヒツジ抗 OVA 血清 IgG 分画を流して抗原抗体結合をさせた後、pH 勾配でアフィニティー精製抗オバルブミン抗体の解離を行った⁴⁾。アフィニティー精製抗 OVA 抗体は、解離後速やかに中性化を行い、その後 PBS 中で 3 日間透析を行った。得られた精製抗体の半量は固相抗体とするために -40℃ で凍結保存し、残りの半量は直ちにビオチンとの結合を行わせた。固相抗体は測定時炭酸緩衝液に溶解し、96 穴マイクロタイタープレートに分注した。

② 精製抗体のビオチン化

測定感度をさらに良くするために、測定系にアビジン・ビオチン系を取り入れた。

得られた精製抗体を炭酸緩衝液で再透析し、N-N-Dimethylformide (Sigma) に溶解した N-Hydroxysuccinimidobiotin (Pierce Chemical) を用いてビオチン化した。得られたビオチン化抗 OVA 精製抗体は再度 PBS で 3 日間の透析を行い、測定まで 4℃ で保存した。

③ 検体の処理

検体である母乳は 15,000G, 30 分遠心分離し脱脂を行った後、測定まで -40℃ で凍結保存した。

④ 母乳中抗原の定量

測定はデュプリケートで行い、検量線は各測定毎に引いた。固相に非精製抗体を用いたり、検体として脱脂の十分でない母乳を用いると検出感度が落ちることも同時に確かめた。

マイクロプレートの洗浄には Tween20 加 PBS を用い、インキュベーションはシェイカーインキュベーター (Dynatech) を用いた。

また、マイクロタイタプレート独特のエッジ効果を防ぐために中央の 60 穴のみを使用した。

2) 測定対象

① 単回搾乳による母乳中 OVA の測定

国立小児病院アレルギー科、都立荒川産院で得られた母乳 48 検体を用いた。このうち 40 名の母親が卵の摂取制限をしていた。

② 鶏卵負荷による経時的な搾乳

同上の施設で、断乳直前の母親に 24 時間以上製品を含めた卵の摂取を一切中止してもらい、検査当日の朝鶏卵を 2 個摂取し、前、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間と経時的に搾乳して検体を得た。得られた 20 名の母乳について測定を行った。

搾乳時の乳児の月齢は 5 ~ 15 月、平均 10.2 ± 1.0 ヶ月であった。搾乳の時点で同時に採血のなされた乳児は

表 1. 採血のなされた乳児の検査所見、臨床所見と母乳中オバルブミン最高濃度、出現時間

No.	月齢	IgE (U/ml)	卵白 RAST ¹⁾	卵白 IgG ²⁾	IgA ³⁾	母乳 OVA 最高濃度 ⁴⁾	最高濃度出現時間 ⁵⁾	乳児 AD 重症度 ⁶⁾
1	12	200	3	6.9	24.4	0	0	2
2	9	270	4	0.6	129.3	2.5	120	2
3	10	160	3	2.8	70.6	4.8	60	1
4	10	110	0	3.5	12.4	7.0	360	2
5	12	26	3	5.6	26.1	0	0	3
6	8	59	0	0.1	39.9	7.5	60	1
7	10	120	3	1.0	40.1	100.0	180	2
8	15	19	0	6.4	47.5	0	0	2
9	7	14	2	1.5	39.6	0	0	2
10	11	130	3	2.0	89.6	0	0	2
11	5	13	0	0.3	41.0	1.8	30	2

¹⁾ラストスコア ²⁾U/ml ³⁾mg/dl ⁴⁾ng/ml ⁵⁾分 ⁶⁾1=軽症 2=中等症 3=重症

11 例で、全員アトピー性皮膚炎を持っており、血液学的検査所見は表 1 に示す通りである。

結 果

1) 測定系ならびに測定感度

各反応ステップの抗体ならびに試薬の適正濃度を検討した結果、経済性も考慮し、固相の精製抗 OVA 抗体は 10 µg/ml、ビオチン化精製抗 OVA 抗体は 1 : 10,000、ストレプトアビジン β ガラクシドは 1 : 4,000 の希釈とした。反応時間はそれぞれ、固相抗体は 4℃・オーバーナイト、10% FCS によるブロッキングは 37℃・2 時間、コントロールならびに検体は 4℃・オーバーナイト、ビオチン化精製 OVA 抗体は 37℃・3 時間、ス

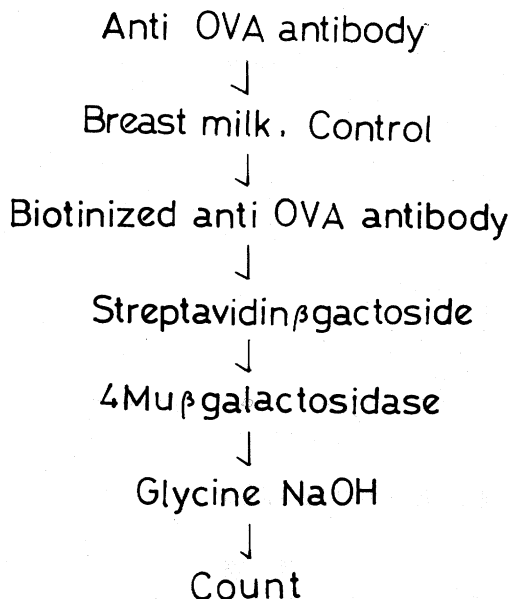


図 1. 母乳中オバルブミン測定系

トレプトアビジン β ガラクシドは37℃・1時間, 4-Mu- β -Gal は37℃・2時間, グリシン緩衝液による反応停止まで3時間とした。

測定系の大略を図1に示す。また、本測定法では最小2乗法による検討で0.1ng/ml まで標準直線の直線性が証明できたので、この濃度を検出限界感度とした。

2) 検体の測定

① 単回搾乳による結果

卵を特に制限していない母乳8検体中4検体から最高4.1ng/ml のOVA が検出された。卵を制限している母親の母乳40検体中1例にのみ1.0ng/ml のOVA が検出された。

② 鶏卵負荷

鶏卵2個を負荷して経時的に追跡したところ、20名中14名の母乳中にOVA が最高170ng/ml 検出された。検出された例での負荷時のピークは30分から8時間で(平均±標準誤差: 156.6±36.3分), 検出幅は0.4ng/ml から170.0ng/ml (35.9±15.1), 24時間後には完全に消失した(図2)。

表2に鶏卵負荷を行ったケースの母乳中OVA 最高値とその出現時間ならびに患児の月齢を示す。また、表1に示した乳児の検査所見と表2を対比検討したところ、鶏卵負荷における母乳中OVA 最高値および出現時間と患児臨床症状、月齢、血清トータルIgE、卵白IgE RAST、卵白特異IgG抗体、血清IgA といずれも相関に乏しかった。

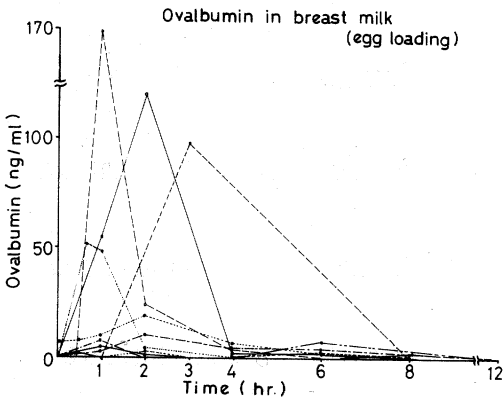


図2. 鶏卵負荷による母乳中オвалブミンの推移

考 察

母乳はアレルギー素因のある子どものアレルギー症状を抑えるのによいといわれている⁵⁻⁸⁾が、実際の統計

表2. 鶏卵負荷を行った全症例の母乳中オвалブミン最高濃度と出現時間

No.	月 齢	母乳 OVA 最高濃度 ¹⁾	最高濃度 出現時間 ²⁾
1	12	0	0
2	9	2.5	120
3	10	4.6	60
4	10	7.0	360
5	12	0	0
6	8	7.5	60
7	10	100.0	180
8	15	0	0
9	7	0	0
10	11	0	0
11	5	1.8	30
12	8	120.0	120
13	13	18.5	120
14	12	170.0	60
15	14	0.4	180
16	10	10.2	120
17	7	0	0
18	14	3.8	360
19	9	52.0	30
20	10	3.5	420

¹⁾ ng/ml ²⁾ 分

調査では逆に母乳栄養児の方がアレルギー発症率が高い結果に出ることさえある^{9,10)}。これは、母親が子どもの食物アレルギーに気を配ることなく抗原となる食物を大量に摂取し、経母乳的に感作された結果と考えられる。こうした事実をみると、アレルギー疾患予防のためにアレルギー素因のある人は乳幼児期から原因となる抗原の制限を行うことが必要であり、経母乳的なアレルゲンの移行は大きな問題と言える。

母乳中抗原の検出は免疫拡散法による定性法^{11,12)}を始まりとして、ラジオイムノアッセイ法による定量法で¹³⁻¹⁸⁾ng/ml から μ g/ml の単位で母親の摂取した食物抗原が母乳から検出されることが明らかになっている。しかしながら、検出された抗原の濃度や出現する時間が臨床的にどのような意義を持つかについては、重要な問題でありながらほとんど検討されていない。これは、放射性物質を使用する方法だと母乳中抗原を測定できる施設が限られてしまう、従来の報告にある方法

だと一度に処理できる検体数が少なく臨床施設とのタイアップがうまくいかない,などの理由が考えられる。そこで,放射性物質を使用しない酵素抗体法での測定が検討された¹⁹⁾が,検出感度の点でラジオイムノアッセイ法に劣り,母乳中の微量な抗原を測定する新たな方法の検討が必要とされてきた。

通常の酵素抗体法ではラジオイムノアッセイに匹敵するような検出感度が得られないことから,今回我々は β ガラクトシドに4メチルウンベリフェラル β ガラクトシダーゼを作用させ酵素作用により生ずる発蛍光性のウンベリフェロンDを測定する蛍光酵素抗体法²⁰⁾を用いた。この系にアフィニティークロマトグラフィー精製抗体と現在では日常的に使用されるアビジン・ビオチン系を組み合わせるさらに測定感度の上昇を計った。これらの系を96穴マイクロプレート上で行うことにより,一度に大量の検体を処理できるようになった。実際にこの方法だと,最終反応停止時間を数時間から十数時間の長期に取ってもバックグラウンドの上昇が非常に軽微であった。

実際の測定結果をみると,単回搾乳による検討では従来の報告と同じようにng/ml単位のおバルブミンが母乳中に検出された。また,卵の制限食を行った場合にはほとんどOVAが検出されないことが明らかとなった。

食物抗原の経口負荷を行った従来の報告ではピークが母乳中で4~8時間後¹⁴⁻¹⁸⁾,血中で2~3時間後²¹⁾という報告が大勢であったが,今回の我々の検討では,平均は約2時間で母乳中OVAのピークが得られた。Paganelliらが β ラクトグロブリンの血液中の消退時間を検討した報告では15~45分と早期にピークが検出されており²²⁾,今回の我々の結果もそれを支持するものであった。

また,Kilshawら¹⁴⁾は4例の母親に生の鶏卵1個を負荷し,血中濃度と母乳中濃度を検討し,血液中に卵抗原が出現してから60~120分で母乳への移行が見られたと報告しているが,今回我々の検討で得られた60分以内にピークが出現する例ではこれに合致しなかった。さらに従来のピークが4~8時間とする報告では摂取後50分以内に搾乳を行った例がなく,我々の結果を否定するものでないと考えられた。

早期に母乳中に出現する食物抗原はピノサイトーシスの機序で母親の血液中,母乳中,そして乳児の体内に至ると考えられるが,どのような時間経過で移行するかはほとんど未解決である。さらに,患児の月齢,

母親の授乳態度,母親自身の消化管における種々の感染の有無など多くの因子が影響を与えることが考えられる。しかしながら,実際の臨床の場でアレルゲンとして強い作用のある卵を敢えて授乳中の母親に負荷することは倫理面から多くの困難があり,今回の我々の検討では断乳が間近なボランティアにのみ鶏卵負荷試験を行った。

今後放射性物質を使用しない方法でより多くの測定が行われることにより,母乳中抗原の臨床アレルギー的意義が一層明らかになると考えられる。

結 語

今回我々の検討した測定法により,今後母乳中への抗原移行に影響を与える諸因子についてさらなる研究が進んで行くものと考えられる。

稿を終えるにあたり,御助言をいただいた東京慈恵会医科大学小児科前川喜平教授に深謝いたします。また,母乳の採取に協力をいただいた都立荒川産院天野和彦院長,吉野伸医長(現・昭島保健相談所長)ならびに国立小児病院アレルギー科の諸兄に深謝いたします。

本稿の要旨は第25回日本小児アレルギー学会ならびに第92回日本小児科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 秋本憲一, 赤沢 晃, 飯倉洋治: アレルギー素因の母子間移行に関する臨床疫学的研究—第1編— IgE・特異的 IgE 及び特異的 IgG・IgG4の母子間移行に関する検討。日本小児アレルギー学会誌, 1, 40-46, 1987
- 2) Iikura, Y., Akimoto, K., Odajima, Y., Akazawa, A. and Nagakura, T.: How to prevent allergic disease. 1, Study of specific IgE, IgG, and IgG4 antibodies in serum of pregnant mothers, cord blood, and infants. Int. Arch. Allergy Appl. Immunology. 88, 250-252, 1989
- 3) 井上 栄: 卵白アルブミンの高感度測定法の開発。環境庁委託小児気管支喘息の臨床疫学的研究報告書。18-19, 1985
- 4) 山崎 誠, 石井信一, 岩井浩一: アフィニティークロマトグラフィー。講談社サイエンティフィック pp64-75, 1975
- 5) Saarinen, U. M., Kajosaari, M., Backman, A. and Siimes, M. A.: Prolonged breast-feeding as prophylaxis for atopic disease. Lancet, 28, 163-166, 1979

- 6) Atherton, D. J. : Breast feeding and atopic eczema. *Br. Med. J.* 287, 775-776, 1983
- 7) Soothill, J. F. : Prevention of food allergic disease. *Ann. Allergy.* 53, 689-691, 1984
- 8) Slade, H. B. and Schwartz, S. A. : Mucosal immunity. The immunology of breast milk. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 348-359, 1987
- 9) Savilahti, E., Tainio, V.-M., Salmenpera, L., Siimes, M. A. and Perheentupa J. : Prolonged exclusive breast feeding and heredity as determinants in infantile atopy. *Arch. Dis. Child.* 62, 269-273, 1987
- 10) 田嶋克政, 水野勝子, 松本一郎, 小田島安平, 飯倉洋治. : 東京都内4ヶ月児検診における湿疹(アトピー性皮膚炎を含む)の調査. *小児保健研究*, 48, 252, 1989
- 11) Jakobsson, I. and Lindberg, T. : Cow's milk as a cause of infantile colic in breast-fed infants. *Lancet.* 26, 437-439, 1978
- 12) Brignon, G., Chtourou, A. and Ribadeau-Dumas, B. : Does β -lactoglobulin occur in human milk? *Journal of dairy research*, 52, 249-254, 1985
- 13) Jakobsson, I., Lindberg, T., Benediktsson, B. and Hanson, B.-G. : Dietary bovine β -lactoglobulin is transferred to human milk. *Acta Paediatr. Scand.* 74, 342-345, 1985
- 14) Kilshaw, P. J. and Cant, A. J. : The passage of maternal dietary proteins into human breast milk. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 75, 8-15, 1984
- 15) Axelsson, I., Jakobsson, I., Lindberg, T. and Benediktsson, B. : Bovine β -lactoglobulin in the human milk. *Acta Paediatr. Scand.* 75, 702-707, 1986
- 16) Cant, A., Marsden, R. A. and Kilshaw, P. J. : Egg and cow's milk hyper-sensitivity in exclusively breast fed infant with eczema, and detection of egg protein in breast milk. *Br. Med. J.* 291, 932-935, 1985
- 17) Cavagni, G., Paganelli, R., Caffarelli, C., D'Offizi, G. P., Bertolini, P., Aiuti, F. and Giovannelli, G. : Passage of food antigens into circulation of breast-fed infants with atopic dermatitis. *Ann. Allergy.* 61, 361-365, 1988
- 18) 山田 享, 安枝 浩, 柳原行義, 影山さち子, 三島 健. : 食物アレルギーの発症および outgrow の機序における検討. *小児科臨床*, 38, 2480-2489, 1985
- 19) Stuart, C. A., Twiselton, R., Nicholas, M. K. and Hide, D. W. : Passage of cow's milk protein in breast milk. *Clin. Allergy* 14, 533-535, 1984
- 20) 宮本 潔, 辻 章夫, 渡辺富久子 : フルオロイムノアッセイ. *講談社サイエンティフィク* pp17-22, 1985
- 21) Husby, S., Jensenius, J. C. and Svehaug, S. E. : Passage of undegraded dietary antigen into healthy adults. *Scand. J. Immunol.* 22, 83-92, 1985
- 22) Paganelli, R. and Levinsky, R. J. : Solid phase radioimmunoassay for detection of circulating food protein in human serum. *J. Immunol. Meth.* 37, 333-341, 1980

THE DETECTION OF OVALBUMIN IN MOTHER'S MILK USING FLUOROENZYME IMMUNOASSAY.

Ken-ichi Akimoto

Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine.

Yoji Iikura

Department of Allergy and Immunology, National Children's Medical Research Center.

We measured ovalbumin in mother's milk using new method of fluoroenzyme immunoassay. Using this system, we can detect ovalbumin in mother's milk.

In the milk samples of 40 mother's who had not eaten any egg, no ovalbumin could be detected except in one sample. In the milk samples of 20 mother's who had eaten two eggs, ovalbumin was detected in 14 samples and the maximum concentration of ovalbumin was 1.8-170.0ng/ml. The concentration reached its maximum between 30-480minutes after the mother had eaten the 2 eggs. There was no correlation between either the

maximum concentraion or the period taken for the maximum ovalbumin concentration to be reached and infant's antibodies in the serum which include total IgE, specific IgE, specific IgG and IgA.

(Accepted : July 19, 1990)