

母乳中の抗オボアルブミン特異 IgA, IgM 抗体 について

(1989年6月28日受付)

(1989年11月27日受理)

群馬大学小児科

森 川 昭 廣 前 田 昇 三 田 島 公 夫
富 沢 滋 黒 梅 恭 芳

佐久総合病院小児科

堀 俊 彦

済生会前橋病院

田 沢 昌 道

Key words : 母乳, IgA 抗体, IgM 抗体, オボアルブミン

要 旨

出産後2日から7日および1ヶ月の母親より得た母乳中の総 IgA, IgM, オボアルブミン特異 IgA, IgM を検索した。方法としては、免疫比濁法, ELISA (Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay) を用いた。その結果、いずれの値も出産2日目にもっとも高値を示し、その後漸減した。出産後30日では総 IgA, IgM は共に測定感度 (7 mg/ml) 以下であった。また、オボアルブミン特異 IgA, IgM 抗体は出産後2日目の10分の1から100分の1に減少していた。

さらに、鶏卵摂取前後の母乳中のオボアルブミン特異 IgA, を経時的に測定すると摂取後減少し、その後増加するパターンを示した。

はじめに

母乳中には種々の生理活性物質が含まれており、これらの物質が新生児、乳児を消化器感染症、呼吸器感染症から防御しているとの報告がなされている。その作用機序は一方ではオリゴサッカライドやカゼイン分画中の糖蛋白質が細菌の上皮付着を阻止する作用によるものであり、もう一方は IgA による上皮よりの細菌やウイルスの侵入阻止に依るものとされている。(1, 2) 特に母乳中の分泌型 IgA は各種腸内侵襲因子に対する抗体活性を有し、ある種の免疫不全の状態にある新生児、乳児を感染から保護している。(3, 4) また、母乳中の IgA には各種食物に対する抗体も含まれており、アレルギー性疾患の発症に予防的に働くと言う報告が

見られる(5)。今回は予報として日本人の母乳中の総 IgA, IgM, さらに代表的な食物抗原である鶏卵中のオボアルブミン (OA) に対する抗 IgA, IgM 抗体と出産後の日数の関係について検討を加えたので報告する。

材料の方法

1. 母乳。母乳は群馬大学付属病院、佐久総合病院および済生会前橋病院産婦人科に入院中ないし外来通院中の出産後2日から7日までの母親、及び1ヶ月検診に来院した母親 (48名) より、用手法にて採取 (延べ88検体) し、遠心後 (7000r. p. m. 30分)、細胞および脂肪を除いた透明な部分を得、測定まで -20℃ に保存した。

2. 総 IgA, IgM の測定

総 IgA, IgM の測定には Hoechst 社製の免疫比濁法による測定キットを用いた。

3. ELISA による抗 OA IgA, IgM 抗体の測定

Abbreviations : IgA ; Immunoglobulin A, OA ; Ovalbumin, IgM ; Immunoglobulin M., ELISA ; enzyme linked immunosorbent assay,

基本的には Engvall and Pearlman の方法(6)に従ったが、阿南らの報告(7)を参考に一部改変した(8)。実験は全て duplicate で行った。

1) マイクロプレートの調整

OA (Sigma 社製) を 0.05M carbonate buffer, pH9.5 に $10\mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解し、その $100\mu\text{l}$ を 96 穴のプラスチック製マイクロプレート (Immulon II MICROELISA plate, Dynatech Lab. Inc.) の各ウェルに注入し、一晚 4°C にて incubation を行った。washing buffer (0.05% Tween 20 加 phosphate buffer saline (PBS-T) pH7.2) にて各ウェルを三回洗浄した。

2) 被検母乳および標準母乳

被検母乳は予備実験で至適と思われた 20 倍に希釈して用いた。また、抗 OA 特異 IgA および IgM 抗体価の高いプールした母乳(標準母乳)を 20 倍から 2560 倍まで希釈を行い標準曲線用試料とした。希釈液は 2% BSA, 0.02% Na_2N_3 を含む、0.05M PBS, pH7.2 を用いた。 $100\mu\text{l}$ の標準母乳および母乳サンプルをウェルに注入後 37°C 、3 時間の incubation を行った。

3) washing buffer で 3 回洗浄後 1500 倍に希釈した peroxidase 標識抗ヒト IgA, IgM (Cappel 社製) $100\mu\text{l}$ を各ウェルに注入後、 37°C 、2 時間 incubation をおこなった。

4) 3) と同様の洗浄後 substrate (0.1M citrate phosphate bufer, pH 5.0 100ml, orthophenylendiamine (O-PDA) 40mg, 31% H_2O_2 $40\mu\text{l}$) を $100\mu\text{l}$ 加え、15-30 分室温に放置した。

5) 更に、2.5M H_2SO_4 $150\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させた後、Micro ELISA Autoreader MR580 (Dynatech) にて 490nm における吸光度を測定した。

6) 母乳中の抗 OA IgA, IgM 抗体価の表示は標準母乳を 20 倍から 2560 倍まで倍々希釈し、それより得られた標準曲線から検体中の抗体価を算出し arbitrary unit (U/ml) で表わした。なお、back ground としては希釈液を用いた。

3. 鶏卵摂取後の母乳中特異 IgA 抗体の経時的変動

3 名 (分娩後 5 日, 2 ヶ月日, 5 ヶ月後) の母親の母乳について鶏卵摂取後の母乳中卵白特異 IgA 抗体を検索した。即ち、前日より鶏卵の摂取を中止し、当日朝食前に母乳を採取後、鶏卵 1 ヶを摂取し、その後は経時的に母乳を採取して試料とした。

4. 統計

統計処理には Mann-Whitney U test を用いた。

結 果

1. 総 IgA, IgM と出産後の日数の関係

母乳中の総 IgA, IgM の量は出産後日を経るに従って減少するが、IgM の場合には出産後 2 日目でも

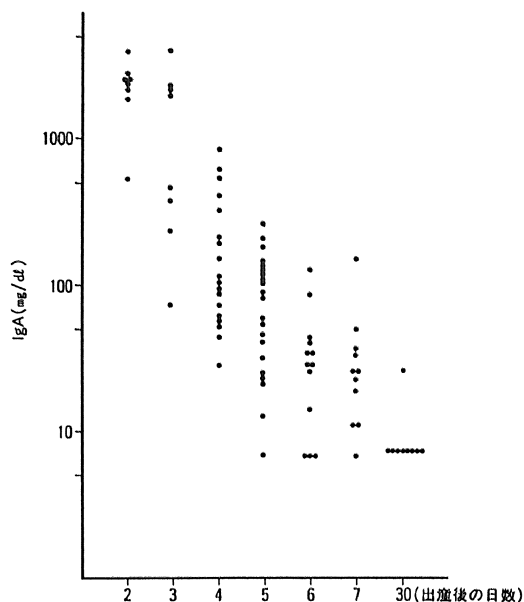


図 1. 出産後の日数と母乳中の総 IgA の関係
出産後の 2 日目の総 IgA は 4 日目以降の総 IgA よりも有意に高値を示した。

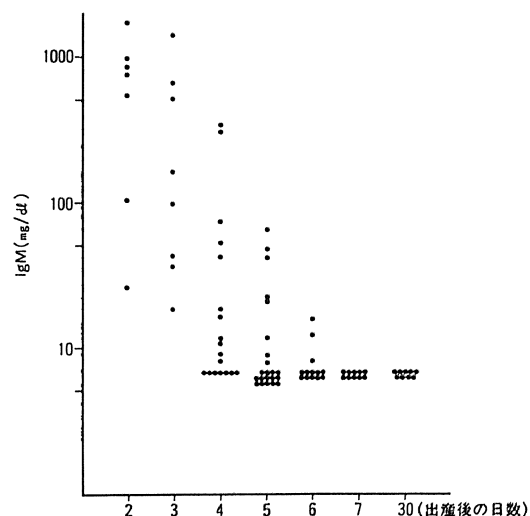


図 2. 出産後の日数と母乳中の総 IgM の関係
出産後の 2 日目の総 IgM は 4 日目以降の総 IgM よりも有意に高値を示した。

低値をとるものが見られた。なお、出産後2日目の母乳中の総IgA, IgMは4日目以降のそれよりも有意に高かった。(p<0.01)。(図1, 2)

2. 抗 OA 特異 IgA, IgM 抗体測定のための標準曲線の作成。

予備実験で集め得た抗 OA 特異 IgA, IgM 抗体価の高い母乳をプールし、原液から倍々希釈してこれらの抗体量の希釈曲線を求めたところ、吸光度は20倍で最も高く、それ以降では希釈と共に次第に減少した。そこで、20倍液を100U/ml, 40倍液を50U/ml, 80倍液を25U/mlとして、以下160倍液を12.5U/ml, 320倍液を6.25U/ml, 640倍液を3.125U/ml, 1280倍液を1.5625U/mlとした。図3はその1例である。

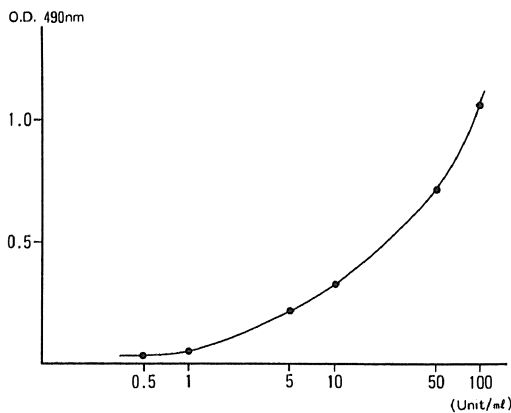


図3. OA 特異 IgA 抗体測定のための標準曲線の1例。

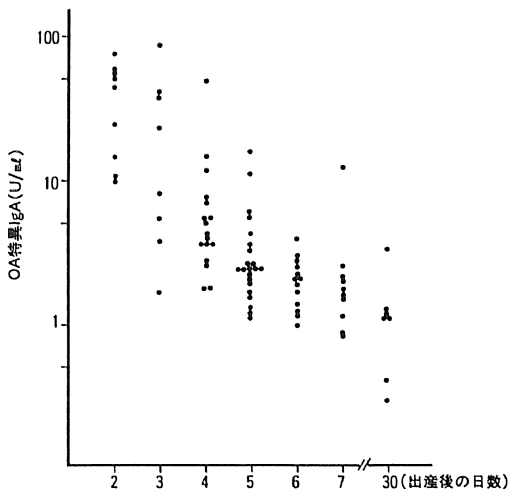


図4. 出産後の日数と母乳中の OA 特異 IgA 抗体の関係。出産後の2日目の総 OA 特異 IgA 抗体は4日目以降の OA 特異 IgA 抗体よりも有意に高値を示した。

3. 抗 OA 特異 IgA, IgM 抗体と出産後の日数の関係

母乳中の OA 特異 IgA, IgM 抗体は出産後日を経るに従って低下し、出産後7日では出産後1ヶ月時の値とほぼ同じであった。なお、出産後2日目の OA 特異 IgA, IgM 抗体は4日目以降のそれよりも有意に高かった (P<0.01) (図4, 5)。

4. 分娩後5日目及び5ヶ月目の母親の母乳では、鶏卵摂取後抗 OA 特異 IgA 抗体は次第に減少し、前者は1-2時間で後者は3-4時間で最も低値を示し、その後次第に増加し始めた。また、分娩後5ヶ月の母親では5時間頃から増加した (図6)。

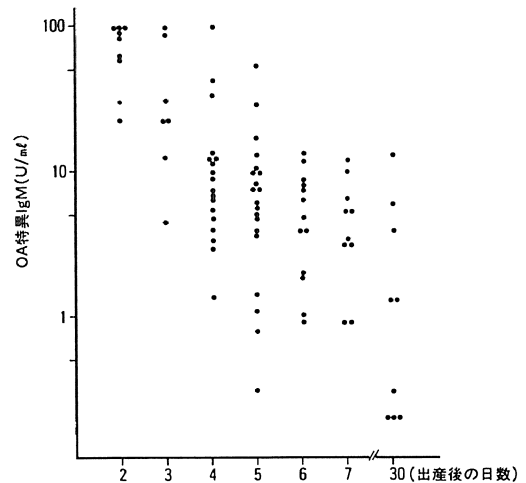


図5. 出産後の日数と母乳中の OA 特異 IgM 抗体の関係。出産後の2日目の OA 特異 IgM 抗体は4日目以降の OA 特異 IgM 抗体よりも有意に高値を示した。

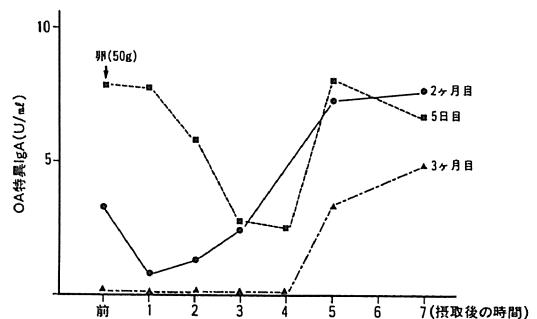


図6. 鶏卵摂取後の母乳中の特異 IgA 抗体の経時的変動。

考 察

母乳中には、ラクトフェリン、リゾチーム、免疫グロブリンなど、さらには食物などの巨大分子の血中への吸収を阻止する作用 (gut closure) を有する因子などを含有している。中でも免疫グロブリンAは生理的に局所免疫の不十分な新生児を各種の細菌感染症やウイルス感染症から防御している。一方、IgAには、経口摂取された食物抗原に対しても抗体活性を有している。この抗体は細菌感染での検討から補体の活性化(9)やオプソニン活性がないこと(10)、腸管粘膜に特異的に付着すること(10)を考え合わせると食物の巨大分子の腸管粘膜表面から侵入を阻止すると考えられる。それゆえ以前から母乳はアトピー性疾患を予防すると言われてきた(5)。しかし、現在までに集めえた文献では母乳のアトピー性疾患の予防効果に就いての意見は相半ばしている。これらの原因は授与した母乳の性状を考慮に入れず検討した為と思われる。Machtingerらは(12) β -ラクトグロリンに対する特異IgA抗体が高い母乳により保育された児ではアレルギー症状のスコアが低いことを報告した。そこで、我々は日本人の児について食物アレルギーとして最も頻度の高い卵白抗原について母乳中のIgA、IgM抗体及び総IgA、IgMについて検討した。その結果、総IgA、IgM、卵白特異IgA、IgMはいずれも出産直後に最も高値を示し、その後次第に減少した。Hansonら(13)は母乳中に牛乳蛋白に対する特異IgA抗体が存在し、授乳期間が長いほど児の牛乳蛋白に対するIgG抗体が低く、母乳中の特異IgA抗体が腸管における感作に抑制的に働いていると報告した。これらの結果は腸管のIgAが殆ど無く、しかも透過性が成人に比して亢進している新生児では母乳栄養が高分子の食物抗原の吸収阻止に役割を果たしており、出産後1週間は母乳中の抗体濃度が高く特に重要であることを示唆していると思われる。今回は分泌量を測定していないが、一般には分娩後まもなくでは分泌量は少ないが蛋白濃度は高く、その後では蛋白濃度は低いが分泌量は多くなる。それゆえ児に与えられるIgA抗体の量は出産直後もその後も変わらないかもしれない。一方、母乳中のIgM抗体ははまだその役割については不明な部分が多い。IgA欠損症ではIgAの代りにIgMが分泌液中に増加する。更に、IgMが補体結合反応、凝集反応、オプソナイゼーションに関与しており、これらの作用の無いIgA抗体の補助的役割を果たしていると考えられている(14)。今後、母乳中のIgM抗体の役割についても検討を加える予定である。

最後に鶏卵摂取後の母乳中の抗OA IgA抗体の変動について考案する。今回は3例の検討であるが、共通することは摂取直後低値をとり、その後増加することである。これらの現象に対しては免疫複合体の形成の可能性が考えられる。ここには成績には示さないが、我々の検討では鶏卵摂取後1時間で母乳中のOA量は最高になり、その後急速に減少することからも免疫複合体形成の可能性は高いと考えられる(15)。今後抗原特異的免疫複合体の検索を行って見たい。

本研究の一部は第1回日本アレルギー学会春季臨床集会シンポジウム、第21回日本小児アレルギー学会で発表した。

文 献

- 1) Jason, J.M., Nieburg, P., Marks, J.S.: Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries. *Pediatrics* 74 (suppl): 702-727, 1984.
- 2) Aniansson, G., Andersson, B., Alm, B., Larsson, P., Nylen, O., Pettersson, H., Rigner, P., Svanborg, E.C.: Protection of breast feeding against bacterial colonization of the nasopharynx; a pilot study. *Proceeding of the 4th international workshop on human lactation. Breastfeeding, nutrition, infection and infant growth in developed and emerging countries. November 16-19, 1988, San Jose, Coast Rica (in press).*
- 3) Ogra, S. S., Ogra, P. L.: Immunologic aspects of human colostrum and milk. Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after the onset of lactation. *J. Ped.* 92: 546-549, 1978.
- 4) McClelland, D. B. L., McGrath, J., Samson, R. R.: Antimicrobial factors in human milk. Studies of concentration and transfer to the infant during the early stages of lactation. *Acta Paediatr. Scand.* 67 (suppl): 1-20, 1978.
- 5) Chandra, R. K.: Prevention of atopic disease: Environmental engineering utilizing antenatal antigen avoidance and breast feeding. In 'Human Lactation 3-The effects of human milk on the recipient infant.' et. by Goldman, A. S., Atkinson, S. A., and Hanson L. A., Plenum Press, New York pp269-274, 1987.

- 6) Engvall, E. and Pearlman, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Suantitation of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109 : 129-135, 1972.
- 7) 阿南貞雄, 赤星吉徳, 吉村正子, 牛島信雄, 吉田彦太郎 : アトピー性皮膚炎における Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いた抗ダニ抗体について. アレルギー-31 : 244-251, 1982.
- 8) 田沢昌道, 森川昭広 : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による喘息児および健康児の血清中抗ダニ (Dermatophagoidesfarinae) 特異 IgG 抗体について. アレルギー-34 : 379-386, 1985.
- 9) Colten. H. R., Bienenstock, J. : Lack of C3 activation through classical or alternate pathways by human secretory IgA anti-blood group A antibody. Adv. Exp. Med. Biol. 45 : 305-313, 1974.
- 10) Zipursky, A., Brown, E. J. and Bienenstock, J. : Lack of opsonization potential of 11S human secretory IgA. Proc Soc Exp Biol Med 142 : 181-184, 1973.
- 11) Nagura, H., Nakane, P. K. and Brown, W. R. : Breast milk IgA bind to jejunal epithelium in suckling rats. J. Immunol. 120 : 1333-1339, 1978.
- 12) Machtinger, S. and Moss, R. : Cow's milk allergy in breast-fed infants : The role of allergen and maternal secretory IgA antibody. J. Allergy Clin Immunol 77 : 341-347, 1986.
- 13) Hanson, L. A., Ahlsted, S., Carlsson, B. : Secretory IgA antibodies against cow's milk proteins in human milk and their possible effect in mived feeding. Int Arc Allergy Appl Immunol 55 : 457-462, 1977.
- 14) Hanson, L. A. and Brandtzveg, P. : The mucosal defense system. In "Immunologic Disorders in infants and children." et. ay Steinhm and Fulginita W. B. Saunders Philadelphia 1980 p137-164.
- 15) 森川昭広 : 食物アレルギーの発症機序. アレルギーの臨床. 7 : 682-685, 1987.

OVALBUMIN SPECIFIC IGA AND IGM ANTIBODIES IN BREAST MILK

Akihiro Morikawa

Department of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

We measured total IgA, IgM and ovalbumin (OA) specific IgA, IgM antibodies inbreast milk for 88 samples from 48 mothers. Total IgA and IgM levels were the highest on the second day after deliverly and these levels decreased rapidly with time. The levels of OA-specific IgA and IgM antibodies also revealed same tendency as those of total IgA and IgM.

Furthermore, OA-specific IgA antibody decreased first and then increased gradually after the peroral challenge with an egg.