

# 母乳中のポリオウィルス中和物質の性状並びに 乳児におけるその経腸管性移行について

昭和40年7月14日 受付

信州大学医学部小児科学教室

(主任: 吉田 久教授)

松 浦 敏 雄

## On the Nature of Antipoliomyelitic Substance in Breast Milk and its Uptake by the Intestine of the Infant

Toshio Matsuura M. D.

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,

Shinshu University

(Director: Prof. H. Yoshida)

### I 緒 言

母乳に抗ポリオウィルス作用のあることを、最も早く指摘したのは北岡<sup>①</sup>の発表と思われる(1949)。北岡は当時マウスを使用して *in vivo* の中和実験(neutralizing test)を行い、母乳中に、Lansing株に対する中和物質の存在する場合のあることを指摘した。ついで Sabin<sup>②</sup>もマウスの脳内接種法を用いて同様の事実を述べた。この方面の研究は、その後しばらくの間はとだえていたように思えるが、実験手技の進歩、特に組織培養法の導入や生ポリオウィルスワクチンの人体への応用が可能となると共に、近来再び関心をひき内外で研究が行われるようになった。即ち上述した Sabin<sup>④</sup>が再びこれをとりあげたのを始め、海外では Athreya<sup>⑤</sup>, Hodes<sup>⑥</sup>, Warren<sup>⑦</sup>らが、又本邦では田橋<sup>⑧</sup>, 山崎<sup>⑨</sup>らが種々の検討を相次いで行っている。これらの最近の報告を通覧すると、このポリオウィルス中和物質(以下ポリオ中和物質と呼ぶ)は型特異性を持つというが、その性状の細部に就いてみると、おそらく  $\gamma$ -globulin であろう(Sabin, Warren)という報告や、濾紙泳動上血清抗体とは異なるという報告(Hodes)を見るに止り、血清中和抗体との異同を含めて未だ解明されたとは云えないように思はれる。さらにこの様なポリオ中和物質をもつ母乳で乳児を哺育する場合、本物質が果して乳児に移行するか否かは臨床にも重要な課題と思はれるが、この点を人体に就て検討した成績は手許の文献には見出し得なかつた。

以上述べた母乳中のポリオ中和物質に関する従来の成績に基き、今回著者は、その一部の追試を含む二・三

の予備的検討を行った後 column chromatography と免疫電気泳動法を応用して母乳における本物質の性状につき可及的詳細に検討した。又この中和物質を含む乳汁を生後数日以内の新生児あるいは未熟児に実際に投与して、その血中への移行の如何などを検討した。以下に成績を述べる。

### II 研究対象と研究方法

#### 1) 研究対象

(1) 母乳と母親血清: 信州大学医学部産婦人科学教室及び松本市内の一産院の産婦より採取した。検体数は母乳64検体、血清64検体である。この両者は同一婦人から常にペアで採取した。母乳は分娩後第1日から第4日までのものを初乳、第5日より第14日までのものを移行乳、15日以後のものを成熟乳とし、採取後可及的速かに下記の方法により乳清に分離した。これらの乳清並びに血清は直ちに  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存し3ヶ月以内に実験に供した。

(2) 乳児: 乳汁あるいはポリオ免疫血清を投与した新生児、未熟児は当科に入院した健康新生児又は特に異常のない未熟児15名である。その日令は生後2日乃至5日である。生下時体重は1600~3140gである。これらの乳児には、あらかじめ濃度の明らかなポリオ中和物質を含んだ母乳又は免疫血清を含む乳汁(粉乳)を投与した。投与前の栄養法は粉乳栄養で何れも極めて少量を投与されていた。なほ対照とした非投与の新生児あるいは未熟児も、すべて粉乳栄養のものである。栄養法別に血清中和抗体価を比較した乳児は、当科外来を昭和37年7月より昭和39年4月までに健康診断の目的で訪れた健康な乳児78名(母乳栄養児41名、

人工栄養児37名)である。その月令は1ヶ月~6ヶ月で、月令別には1ヶ月(生後15日~35日以下同様):12名, 2ヶ月:15名, 3ヶ月:13名, 4ヶ月:12名, 5ヶ月:14名, 6ヶ月:12名である。ポリオワクチンは全例未接種である。栄養法はすべて直接問診して確かめた。母乳栄養児中には1日量として粉乳を約150ml程度投与されていたものも含まれる。

## 2) 研究方法

(1) 乳清分離方法: rennet 法又はエーテル法によつた。rennet 法の場合は乳汁20mlに特級クロロホルム10mlと0.5% rennet 0.4mlを加えPC 1万単位SM 500 $\gamma$ を加え37°C 1時間温浴したのち3000r.p.m. 30分間遠沈し、この上清を乳清とした<sup>10)</sup>。エーテル法の場合は、乳汁20mlに特級エーテル10mlを加え直ちに3000r.p.m. 1時間遠沈し、下方に沈んだ部分を乳清とした。なお予備実験として行つた casein 中のポリオ中和物質の存在の検討の場合以外は、すべて rennet 法を用いた。

(2) DEAE Cellulose column chromatography: (a) DEAE-cellulose column: イオン交換 cellulose としては Serva 社の diethylaminoethyl cellulose を用いた。約20gの DEAE cellulose を1 $\ell$ の0.6M食塩溶液で5回よく攪拌しながら洗い、更に1 $\ell$ の0.0375M食塩溶液で3回洗滌した後500mlの0.0375M食塩溶液に浮遊しPHを7.4に調整した。この cellulose を直ちに直径2.5cmのcolumnに約14cmの高さだけ重力に従つて滴下してつめた。

(b) Chromatography: fraction collector は東洋濾紙科学会社の TO-1型を用いた。gradient elution としては重力落下により混合槽1ヶ及び貯蔵槽1ヶの形とした。混合槽には0.0375Mの食塩溶液1.1 $\ell$ を入れ、貯蔵槽には0.6Mの食塩溶液600ml約120ml/時間の割合で落させ column にちみびいた。各乳清検体は column にかける前48時間3 $\ell$ の0.0375Mの食塩溶液中にて透析しあとは特別の処理をすることなく、その20mlを column に入れた。その直後約50mlの0.0375Mの食塩溶液を加え、分画No. 1から6迄流し、その直後に gradient elution を開始し、展開液 (effluent solution) を、column の上端に導いた。column からの溶出液は各分画当り10mlであつた。各分画の食塩濃度は Cl<sup>-</sup> の量より推定した。Cl<sup>-</sup> の決定は Mohr<sup>11)</sup>の方法によつた。即ち試料に0.05mlの10% potassium chromate を加え純水にて約1mlに稀釈する。これを0.1N AgNO<sub>3</sub>にて赤褐色になる迄滴定した。各分画の蛋白濃度は日立の

Beckmann 型分光光度計にて、280m $\mu$ の optical density にて測定した。

(3) 免疫電気泳動法: cellulose acetate 膜による免疫電気泳動: cellulose acetate 膜は Oxo 社のものを使用し、緩衝液は veronal-veronal Na 緩衝液 (PH 8.6  $\mu$ =0.06) を使用した。実施にあつては、cellulose acetate 膜を5cm $\times$ 10cmに切り veronal-veronal Na 緩衝液をしみこませて余分の水分を除き、この後毛细管にて検体を所定の位置に塗布した。泳動は定電流にて0.4~0.5mA/cmとし泳動時間は30~40分であつた。次いで抗血清を塗布し流動パラフィン中にて1~2晝夜反応させた。反応終了後は良く水洗し Ponceau 3 R 染色液にて染色した。乳清等の試料はいずれも測定前に veronal-veronal Na 緩衝液にて透析して使用した。

なお一部については Ouchterlony 法による検討も行つた。即ち、上記緩衝液1.5%に寒天を溶解し縦横夫々10cm $\times$ 7cmの薄拭したガラス板上に厚さ2mm位になる様に流し固まらせた後、直径2mmの穴をあけ、この穴に抗血清及び検体を滴下し、室温にて蒸発を防ぎながら48時間以上保存し観察した。

これらの実験に使用した抗ヒト全血清ウマ血清、抗 $\gamma$ G-globulin 血清、抗 $\gamma$ A-globulin 血清、抗 $\gamma$ M-globulin 血清はすべて東京大学血清学教室松橋助教授の御好意により得た。これらのうち $\gamma$ A-globulin 血清には $\gamma$ A-Myeloma protein によつて作つた $\gamma$ A-globulin ( $\gamma$ A-paraglobulin と記載)と、母乳で免疫して作つた $\gamma$ A-globulin ( $\gamma$ A-globulin と記載)と2種類ある。なほ各 globulin の名称は、WHO のヒト免疫 globulin 名称委員会の勧告<sup>12)</sup>によつた。

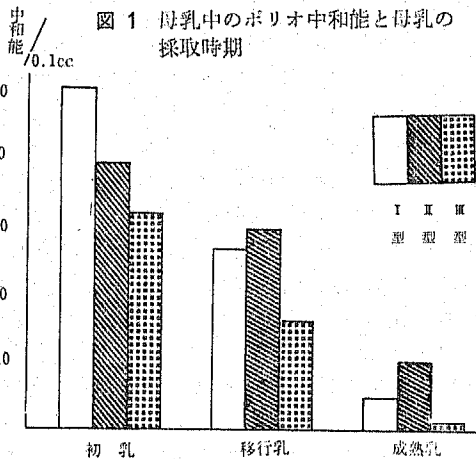
(4) 母乳中のポリオ中和能の測定: 組織培養法にて測定した。使用細胞は HeLa S<sub>3</sub> 株である。中和に用いたウイルス株は I 型 Mahony-HeLa 継代株、II 型 MEFI-HeLa 継代株、III 型 Sankette-HeLa 継代株である。これらはいずれも東北大学細菌学教室より分与されたものを、当教室に於て継代したものである。使用せる培養液は Sabin の用いた LE Medium (SLE) である。その調製方法は当教室神谷の記載によつた<sup>10)</sup>。これに20%の仔牛血清を加えたものを細胞増殖用を使用した。血清はポリオウイルス増殖阻止性のないことを確かめた仔牛血清を使用した。乳清稀釈は SLE 液を用いた。あらかじめ非動化を行つた乳清は4倍から始まる4の倍数稀釈を行つた。稀釈乳清0.3mlと100 TCD 50/0.1mlのウイルス液0.3mlを混じたものを37°C 3時間放置し更に1夜氷室に保存せ

るものを、培養液を捨て SLE 液にて洗滌し維持用培養液 (5% 牛血清加 SLE 液) を 0.8ml 加えた培養試験管に 0.2ml づつ接種を行った。判定は接種 3 日以後に於てウイルス感染価が 100 TCD 50 に達した時に行った。結果の判定には 50% 感染価を採用し、以下血清中和抗体と同様の基準により抗ポリオ物質の中和能とした。陽性陰性にて論ずる時は 4 倍未満を陰性とした。乳清は使用するに先だち LE Medium の十分量に 48 時間以上の透析を行った。

(5) 血清中和抗体の測定方法：当教室神谷の記載した方法<sup>⑩</sup>と全く同様で、使用細胞は HeLa Sa 株であり、培養液は LE Medium である。中和に用いたウイルス、手技は乳清に使用したのと同じである。ただしこの場合には LE Medium での透析は行はなかつた。

III 予備実験

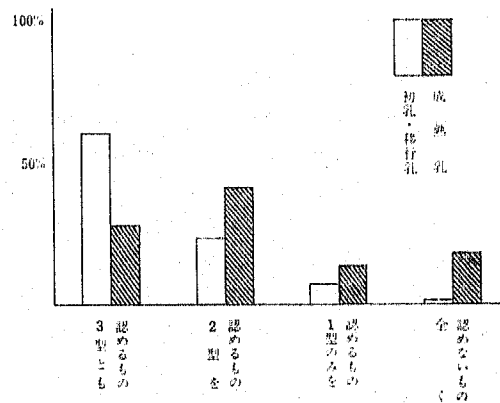
(1) 母乳中のポリオ中和能と母乳の採取時期：両者の関係を初乳 16 例、移行乳 19 例、成熟乳 16 例を対象として検討した。ポリオウイルスとしては I, II, III 型を用いた。その結果先人の報告 (Sabin<sup>④</sup>, 田橋<sup>⑤</sup>, 山崎<sup>⑩</sup>) と同一の傾向をえた。即ち初乳、移行乳、成熟乳の別にそれぞれ幾何学的平均値を求めると図 1 の如くなつた。図中縦軸はポリオ中和能/0.1ml の平均値であるが、初乳：I 型 50 倍、II 型 39 倍、III 型 32 倍。移行乳：I 型 27 倍、II 型 29 倍、III 型 16 倍。成熟乳：I 型 4 倍、II 型 10 倍、III 型 1 倍となつた。即ち各型とも初乳は高い値を示した。移行乳はこれにすぎ、成熟乳は最も低い値を示した。



(2) 母乳中のポリオ中和能の型特异性：上記(1)

に述べた検体のうち I, II, III 型のポリオ中和能を検査しえた 64 例につき三つの型の何れに対しても中和能を認められたもの、二つの型のみに対して認められたもの、一つの型のみに対して認められたもの、何れに対しても認めなかつたものに分けて型特异性を検討した。この結果は図 2 の如くで、この場合も先人の成績と軌を一にした。即ち初乳移行乳では三つの型の何れも認められたのが 42 例中 27 例 (60%) と最も多かつた。次いで二つの型に対してのみ認められたもの 10 例 (23%)、一つの型に対してのみ認められたもの 3 例 (7%)、何れの型に対しても認めなかつたものが 1 例 (1.5%) であつた。成熟乳では同様にそれぞれ 22 例中 6 例 (27.5%)、9 例 (40.9%)、3 例 (13.6%)、4 例 (18%) となつた。以上の成績は母乳中のポリオ中和物質が型特异性を有することを示唆すると思はれた。

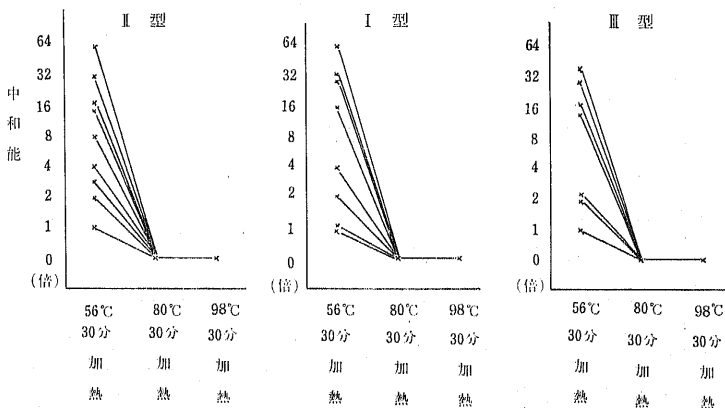
図 2 母乳中のポリオ中和能の型特异性



(3) 母乳中のポリオ中和能の熱処理による影響：初乳 8~9 検体を選びそれぞれ 3 分し、これらを同時に 56°C 30 分、80°C 30 分、98°C 30 分加温した。これらの 3 群につき各型のポリオ中和能を比較した。結果は図 3 の如くなつた。即ち 56°C 30 分加温の検体は夫々ある程度の中和能を示していたが、80°C 30 分、98°C 30 分加温後の検体では何れも全く中和能を示さなかつた。以上より母乳中のポリオ中和物質は加熱に対して血清中和抗体と相似の態度を示すと思はれた。

(4) 母乳中のポリオ中和能の保存による影響：母乳中のポリオ中和能の保存による影響を検討した。まず検体を 2 分し一方は直ちにポリオ中和能を測定した。他方は -20°C の氷室に保存し、3 ヶ月経過後全く同様にポリオ中和能を測定した。この結果は表 1 の如くなつた。即ち中和能が 1~4 倍のものを (+),

図3 母乳中のポリオ中和能の熱処理による影響



8~32倍までのものを(Ⅱ), 64~128倍のものを(Ⅲ)とすれば, 3ヶ月の上記条件下の保存では著しい影響は認められなかつた。以上より母乳中のポリオ中和物質の保存による影響と血清中和抗体のそれとの間には大差がないように考えられた。

能はほぼ一致し, この結果から母乳中のポリオ中和物質は casein 中にはほとんど含まれていないと思われた。

IV 研究成績

1) 母乳中のポリオ中和物質の性状

(1) column chromatography による検査: 初乳を材料として column chromatography を行い, 分画に分離しポリオ中和物質の存在につき検査し, 得られた結果を血清の場合と比較した。初乳は4~5人の母親から採乳したものをブールし乳清として用いた。全展開時間は約8時間で, 分画数は60本, この際の各分画の蛋白濃度は表2の如くであつた。結果は図5の如く2つの大きなPeak I及びIIが得られた。異つた時期に3回行つた異つたブール初乳の, column chromatography の結果は何れもほぼ同じであつた。次に上述した乳清と全く同様に処理して得られた正常人血清の結果は表3, 図6の如く, Peak I及びIIをえた。次に上記成績を参照して母乳並びに血清における中和能が如何なる分画に存在するかを検討した。即ち表2中の分画5と6(以下分画Aと呼ぶ), 分画19, 20(以下同じく分画Bと呼ぶ), 分画29と30(以下同じく分画Cと呼ぶ), 分画36, 37(以下同じく分画Dと呼ぶ), 分画47, 48(以下同じく分画Eと呼ぶ), 又表3中の分画4と5(以下分画A'と呼ぶ), 分画19, 20(同じく分画B'と呼ぶ), 分画24, 25(同じく分画C'と呼ぶ), 分画39, 40(同じく分画D'と呼ぶ), 分画49, 50(同じく分画E'と呼ぶ)の各分画に就き

表1 母乳中のポリオ中和能の保存による影響

検体	ウイルスの型	第1回測定	3ヶ月後測定
1	I	卅	卅
	II	卅	卅
	III	+	+
2	I	+	+
	II	卅	卅
	III	+	+
3	I	卅	卅
	II	卅	卅
	III	卅	卅

(注) 中和能/0.1cc 1倍~4倍 (+)  
8倍~32倍 (卅)  
64倍~128倍 (卅)

(5) 母乳中のポリオ中和能と乳汁 casein との関係: 測定方法の項で述べた両処理法即ちエーテル法と rennet 法を同一検体につき同時に行つて乳清を分離し, casein を含む乳清と含まぬ乳清を得た。この兩種の乳清各8検体につき同時にポリオ中和能を比較した結果は図4の如くなつた。即ち両処理法でえた中和

図4 母乳中のポリオ中和能と casein との関係

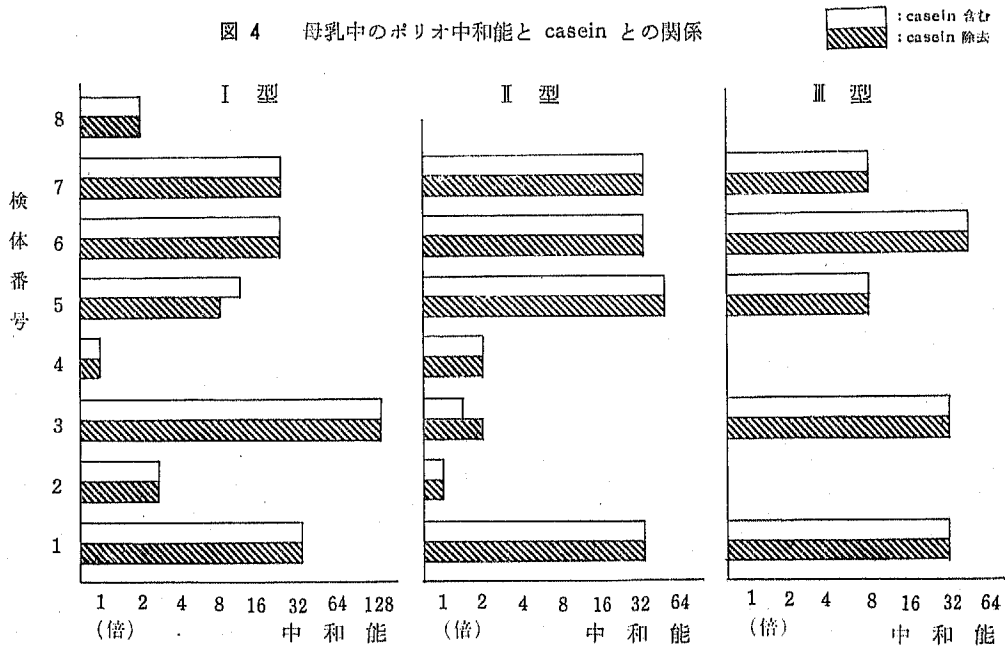
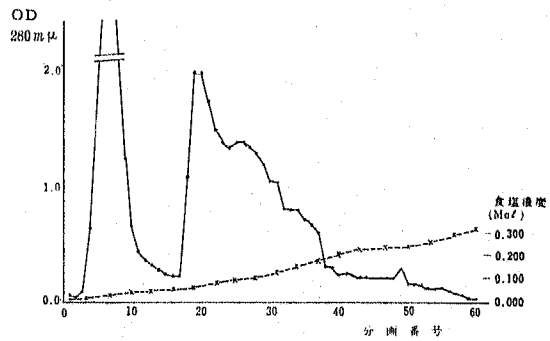


表2 初乳の DEAE Cellulose column chromatography による各分画の蛋白濃度

分画番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )	分画番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )	分画番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )
1	0.065	21	1.750	41	0.275
2	0.055	22	1.500	42	0.265
3	0.080	23	1.400	43	0.235
4	0.650	24	1.350	44	0.240
5	$\infty$	25	1.400	45	0.226
6	$\infty$	26	1.400	46	0.230
7	$\infty$	27	1.350	47	0.226
8	$\infty$	28	1.300	48	0.225
9	1.250	29	1.200	49	0.310
10	0.680	30	1.050	50	0.170
11	0.450	31	1.050	51	0.185
12	0.380	32	0.810	52	0.175
13	0.330	33	0.810	53	0.165
14	0.295	34	0.810	54	0.135
15	0.250	35	0.730	55	0.145
16	0.225	36	0.680	56	0.105
17	0.225	37	0.610	57	0.090
18	1.100	38	0.310	58	0.085
19	2.000	39	0.310	59	0.055
20	2.000	40	0.265	60	0.050

図5 初乳の DEAE Cellulose column chromatography による分画

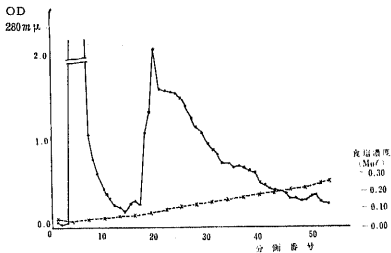


予めこれらの分画を $\frac{1}{2}$ 飽和の硫酸にて蛋白質を塩析し、これを3000 r. p. m. 30分遠沈して得られた沈渣を1mlの滅菌蒸留水に溶解し、まづ滅菌蒸留水、ついでLE Mediumにて1昼夜透析した後組織培養法による中和試験を行つた。その結果は表4、表5に示した如くなつた。即ち母乳に於ける中和能は分画A及びBの両者に認められた。之に反し血清に於ては当初母乳より強い活性度を示したにもかかわらず、分画A'のみに認めB'その他には認めなかつた。なほ他の分画には何れの場合も中和能を認めなかつた。以上のcolumn chromatographyによる検索の結果より、母乳と血清における中和能を呈する物質の性状は必しも同一ではないと考えられた。

表3 血清の DEAE Cellulose column chromatography による各分画の蛋白濃度

分画 番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )	分画 番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )	分画 番号	蛋白濃度 (280m $\mu$ )
1	0.082	21	1.590	41	0.496
2	0.042	22	1.588	42	0.445
3	0.045	23	1.570	43	0.411
4	$\infty$	24	1.550	44	0.420
5	$\infty$	25	1.500	45	0.409
6	$\infty$	26	1.390	46	0.323
7	1.089	27	1.240	47	0.310
8	0.780	28	1.150	48	0.310
9	0.601	29	1.100	49	0.352
10	0.439	30	0.970	50	0.378
11	0.328	31	1.900	51	0.281
12	0.251	32	0.841	52	0.271
13	0.222	33	0.722	53	0.251
14	0.183	34	0.749	54	0.222
15	0.290	35	0.690	55	0.183
16	0.309	36	0.708	56	0.155
17	0.274	37	0.700	57	0.100
18	1.100	38	0.649	58	0.055
19	1.330	39	0.619	59	0.045
20	2.100	40	0.509	60	0.045

図6 血清の DEAE Cellulose column chromatography による分画



(2) 免疫電気泳動法による検索：初乳の column chromatography に於ては上述のように2つの峰が得られ、この両者よりえた分画A, Bの何れもがポリオ中和能を示したので、この両分画並びにその原乳清を材料として本法による検索を行った。まづ抗人全血清ウマ血清に対する反応を見た結果は初乳では albumin 領域から globulin 領域にかけて少くとも7本の沈降線が見られた。又分画Aでは globulin 領域に

表4 初乳の各分画におけるポリオ中和能

	分画番号	ポリオウイルス中和能*	
		I 型	II 型
A	5	8 倍	32 倍
	6		
B	19	4 倍	32 倍
	20		
C	29	0	0
	30		
D	36	0	0
	37		
E	47	0	0
	48		
原 母 乳		8 倍	128 倍

(\* 0.1cc宛)

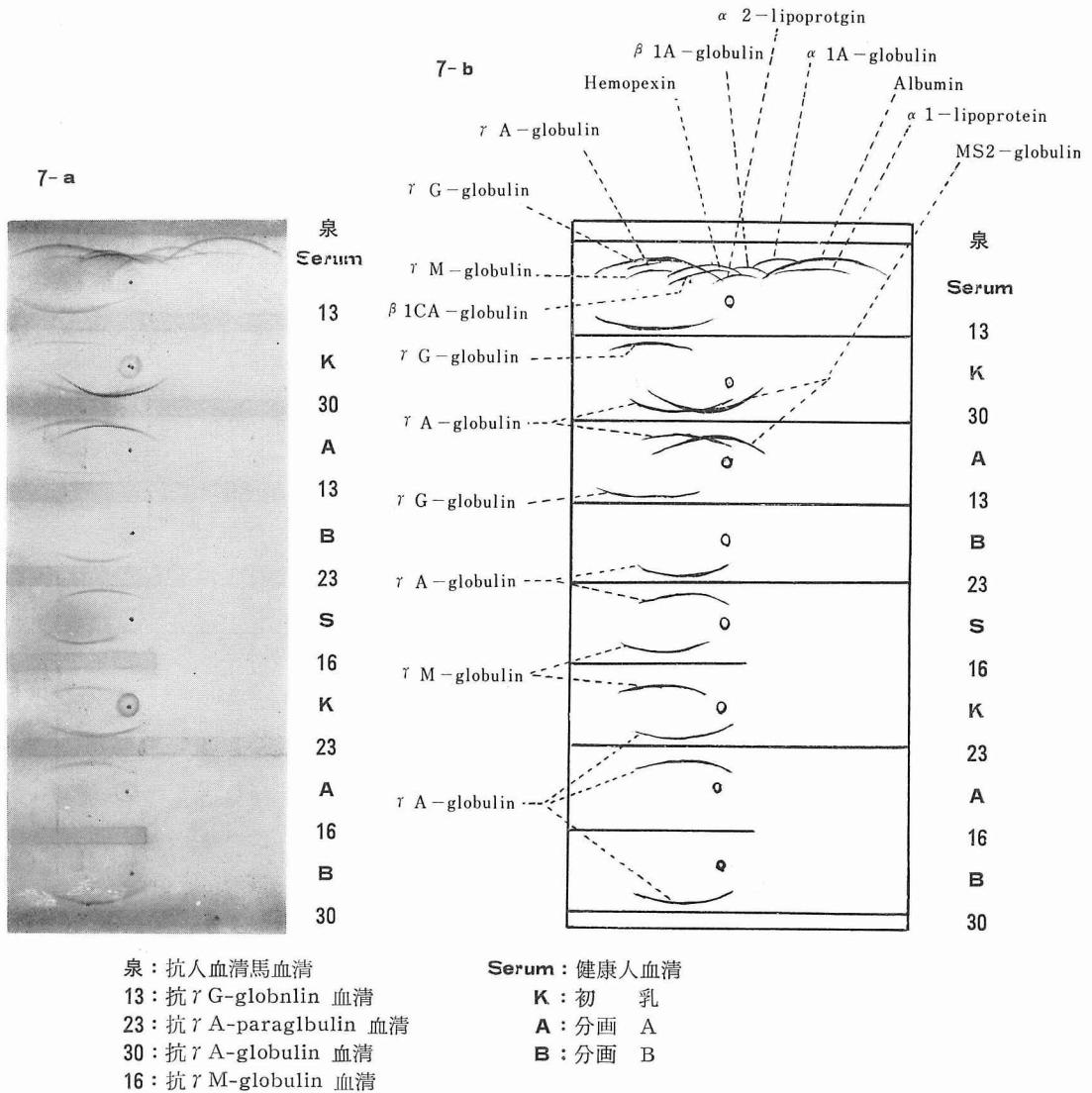
表5 血清の各分画におけるポリオ中和抗体

	分画番号	ポリオウイルス中和抗体価*	
		I 型	II 型
A'	4	128 倍	256 倍
	5		
B'	19	0	0
	20		
C'	24	0	0
	25		
D'	39	0	0
	40		
E'	49	0	0
	50		
原 血 清		256 倍	256 倍

(\* 0.1cc宛)

2本の沈降線が見られ、分画Bでは globulin 領域に1本の沈降線が見られた。そこでさらに各種の抗 globulin 血清を用いて詳細に検討した。その結果は図7の如くで、初乳は抗  $\gamma$  G-globulin ( $\gamma_2$ -gl.) 血清、抗  $\gamma$  A-globulin ( $\gamma_1$  A-gl.) 血清、抗  $\gamma$  A-paraglobulin 血清、抗  $\gamma$  A-globulin ( $\gamma_1$  M-gl.) 血清と沈降線を作った。分画Aは抗  $\gamma$  G-globulin 血清、抗  $\gamma$  A-paraglobulin 血清と沈降線を作った。分画Bは抗  $\gamma$  A-globulin 血清と抗  $\gamma$  A-paraglobulin 血

図 7 初乳・分画A及びBの各種抗 globulin 血清に対する免疫電気泳動



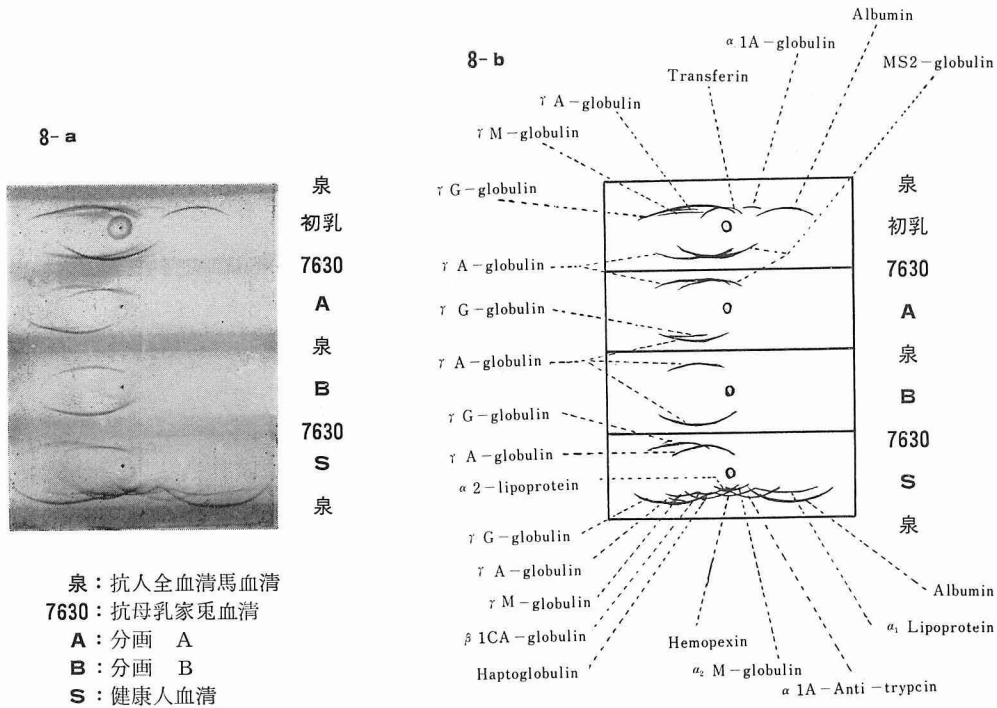
清と夫々1本の沈降線を作った。ただ初乳及び分画Aは抗γA-globulinとは2本の沈降線を作った。次に抗母乳家兔血清と初乳、分画A及び分画Bとの反応を見た。対照として抗人全馬血清も同時に見たが、この結果は図8の如くで、初乳及び分画Aは抗母乳家兔血清との間に抗人全馬血清との間には見られない沈降線が見られ、初乳及び分画Aには、母乳に特有な抗原性物質 (MS<sub>2</sub>-globulin と思はれる) が含まれていることが判った。一方分画Bでは1本の沈降線のみがみられ、この母乳に特有と思はれる物質は存在せず、先の成績を参照すると、γA-globulinのみが含まれていることがわかった。一方γM-globulinは、分画

A, B, には含まれていなかった。なおOuchterlony法により上述の一部につき検討を加えた。即ち抗血清としては前述した抗ヒト全血清, 抗γG-globulin血清, 抗γM-globulin血清, 抗γA-globulin血清, 抗γA-paraglobulin血清を用意し、図9の下図の様な組合せでこれらの抗血清と初乳、分画A及びBとの反応をみた。この結果は図9の如く成績は全く一致した。

2) 未熟児, 新生児に対する経口的投与成績並びに栄養別別にみた乳児の血清ポリオ中和抗体

(1) 同種免疫血清を投与した際の成績: 6人の健

図 8 初乳・分画A及びBの抗母乳家兔血清に対する免疫電気泳動



康成人に  $10^6/ml$  のポリオ生ワクチン  $1ml$  を投与し投与後1ヶ月目に採血し夫々ポリオ中和抗体を測定し、このうち抗体価の高い血清 (I型516倍, III型4096倍)  $6 \sim 20ml$  を、生後2日~5日の新生児及び未熟児3例に経口投与し、免疫血清投与前、投与後12時間、同24時間、同36時間に於ける乳児の血清中和抗体の推移をみた。結果は表6と図10中に示す如くなつた。即ちいずれの場合も対照とせる非投与新生児の場合と等しく、これら乳児の中和抗体価は投与前後において変動を認めなかつた。

(2) 異種免疫血清を投与した際の成績：生後2日~5日の新生児未熟児にポリオウイルスの猿免疫血清 (抗体価I型, III型とも55000倍) の  $3ml$  を経口投与し、上述と全く同様の検討を行つた。結果は表6と図10中に示す如くなつた。即ちいずれの場合も投与前後において変動を認めなかつた。

(3) 初乳を投与した際の成績：生後2日~4日の新生児及び未熟児5例にブールした初乳を経口的に投与した。総投与量は  $110 \sim 280ml$  で、10時間から12時間の間に鼻腔ゾンデにより分割投与した。これらのブール初乳のポリオ中和能は32倍から128倍であつた。これらの初乳投与新生児未熟児並びに対照とした同日令の2例合計7例における成績は表7, 図11に示した如

く投与前後において著明な変動は認めなかつた。

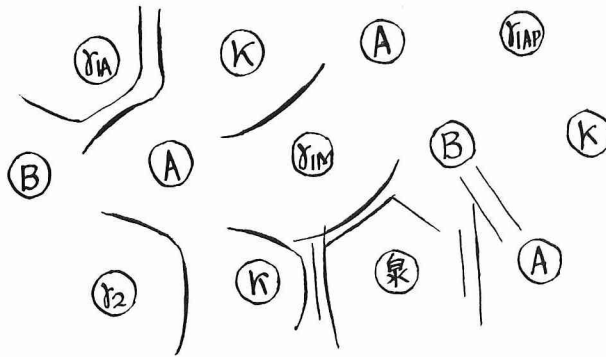
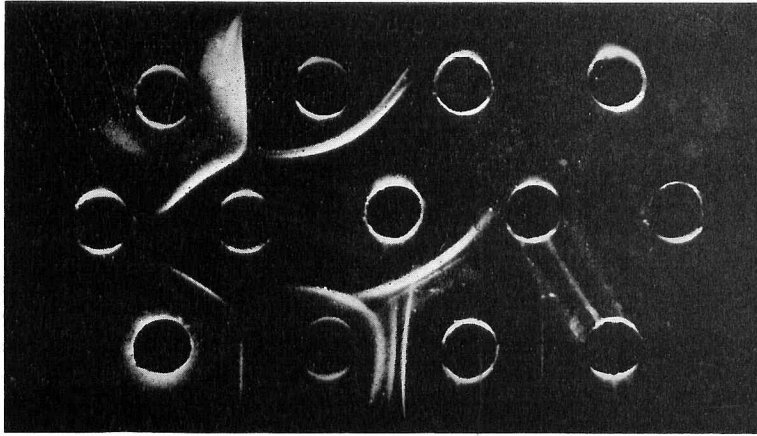
(4) 栄養法別にみた乳児の血清ポリオ中和抗体保有率：生後1~6月の乳児合計78名につき栄養法による血清中和抗体の保有率を月令別に検討した。血清中和抗体価4倍以上を陽性とすれば、その成績は図12, 13, 14に示す如くなつた。即ちI型：母乳栄養児では1ヶ月100%, 2ヶ月67%, 3ヶ月57%, 4ヶ月33%, 5ヶ月14%, 6ヶ月0%。人工栄養児では1ヶ月100%, 2ヶ月50%, 3ヶ月67%, 4ヶ月33%, 5ヶ月0%, 6ヶ月0%。同様にしてII型：母乳栄養児では1ヶ月83%, 以下67%, 43%, 50%, 43%, 33%。人工栄養児では1ヶ月83%以下67%, 50%, 50%, 43%, 33%。III型：母乳栄養児では1ヶ月83%, 以下44%, 14%, 33%, 14%, 17%。人工栄養児では1ヶ月50%, 以下50%, 17%, 50%, 14%, 0%となつた。即ち生後1ヶ月のIII型に対する保有率において母乳栄養児群はやゝ高率を示したが、他の月令に於てはすべてで両群に著明な差を認めなかつた。

### V 考按並びに総括

母乳におけるポリオ中和物質の性状と、その乳児への移行に関して、著者は緒言に述べた如き理由を以て、二三の検討を加えた。まず著者が予備実験に於て



図 9 初乳・分画A及びBと各種抗血清との寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法)



K : 母 乳                      泉 : 抗人血清馬血清  
 A : 分画 A                    r<sub>2</sub> : 抗  $\gamma$  G-globulin 血清  
 B : 分画 B                    r<sub>1</sub> A : 抗  $\gamma$  A-globulin 血清  
                                      r<sub>1</sub> AP : 抗  $\gamma$  A-paraglobulin 血清  
                                      r<sub>1</sub> M : 抗  $\gamma$  M-globulin 血清

表 6 新生児・未熟児における同種及び異種免疫血清投与前後の血清ポリオ中和抗体の推移

検 体 名	投与免疫血清量	投 与 免 疫血清の抗体価	新生児・未熟児の抗体価			
			投 与 前	投 与 後 12時間	投 与 後 24時間	投 与 後 36時間
一〇かつ〇*	20ml	I 型 516倍	8 倍	8 倍	8 倍	8 倍
三〇伸〇*	6 ml	III 型 4096倍	4 倍	4 倍	4 倍	4 倍
吉〇ます〇*	15ml	I 型 516倍	128倍	128倍	—	128倍
駿〇久〇**	3 ml	I 型 55000倍	128倍	—	128倍	128倍
山〇照〇**	3 ml	III 型 55000倍	16倍	—	32倍	32倍
中〇秀〇**	3 ml	III 型 55000倍	1024倍	1024倍	1024倍	1024倍
対 照 1	—	—	128倍	—	128倍	128倍
対 照 2	—	—	128倍	128倍	—	128倍

\* 同種免疫血清投与, \*\* 異種免疫血清投与

表 7 新生児・未熟児における初乳投与前後の血清ポリオ中和抗体の推移

検体名	投与前 初乳量	投与前抗体価	新生児・未熟児の抗体価			
			投与前	投与後 12時間	投与後 24時間	投与後 36時間
清○崇○	110ml	Ⅲ型 128倍	256倍	64倍	128倍	
村○京○	220ml	Ⅱ型 64倍	256倍	1024倍	256倍	
小○康○	160ml	Ⅰ型 32倍	512倍	256倍	512倍	
平○康○	280ml	Ⅱ型 128倍	32倍	32倍	64倍	
小○富久○	280ml	Ⅱ型 64倍	8倍	16倍	32倍	
対 照 1			512倍	512倍	512倍	
対 照 2			32倍	32倍	8倍	

図10 新生児・未熟児における同種及び異種免疫血清投与前後の血清ポリオ中和抗体の推移

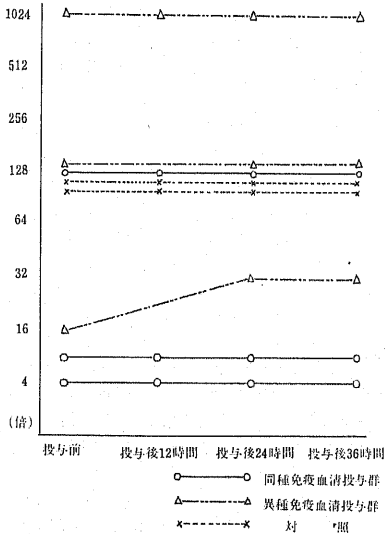
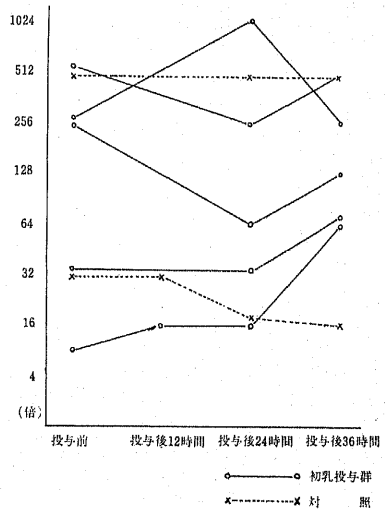


図11 新生児・未熟児における初乳投与前後の血清ポリオ中和抗体の推移



得た成績を先人の同様の実験成績と対比する。ついで著者のえた成績に就き考察を加える。

前述の如く母乳中にポリオ中和物質が存在することを述べた先人の報告としては、北岡<sup>①②</sup>、Sabin<sup>④</sup>、田橋<sup>⑤</sup>、山崎<sup>⑩</sup>、等のものをあげうるが、これらにつき母乳におけるポリオ中和物質の保有率（陽性率）をみると、Sabin<sup>④</sup>はⅡ型のみにつき検討し、初乳84%、35日～90日53%、91日～180日61%、181日～356日73%とした。田橋<sup>⑤</sup>が各型についてみた結果では初乳はⅠ型90.2%、Ⅱ型91.4%、Ⅲ型82.3%、成熟乳はⅠ型

62.1%、Ⅱ型65.5%、Ⅲ型42.4%とされ、山崎<sup>⑩</sup>の報告もほぼ同じ傾向を示し何れも成熟乳に比べ初乳に頻度の高い点で一致している。又これらの報告につき中和能の強さをみるとSabin<sup>④</sup>は、初乳（平均26倍）は、成熟乳（平均5倍）よりかなり高値を示したとなし、田橋<sup>⑤</sup>が分娩後日数と乳汁抗体価の減弱とを22例につき追跡した結果、並びに山崎の成績も同様であり、例えば山崎の成績のうちⅠ型に就てみると分娩後第1日では平均320倍、2日目224倍で高値であったが、3日目頃から急速に減弱し3日目、4日目では19.8倍、11.1倍、7日目には1.3倍と低下し、Ⅱ型

図12 栄養法別にみた乳児の血清ポリオ中和抗体保有率

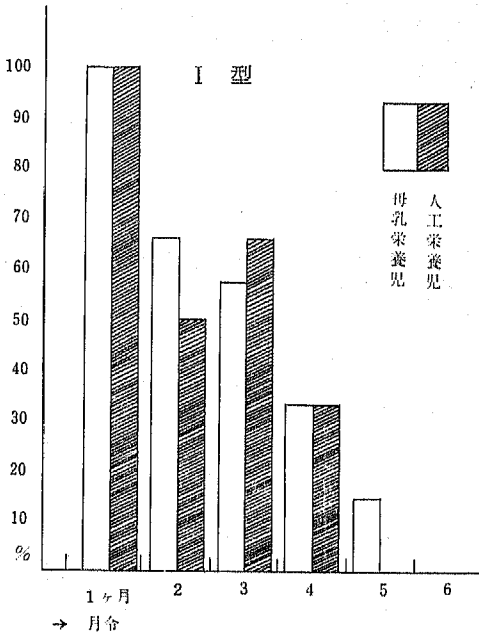


図14 栄養法別にみた乳児の血清ポリオ中和抗体保有率

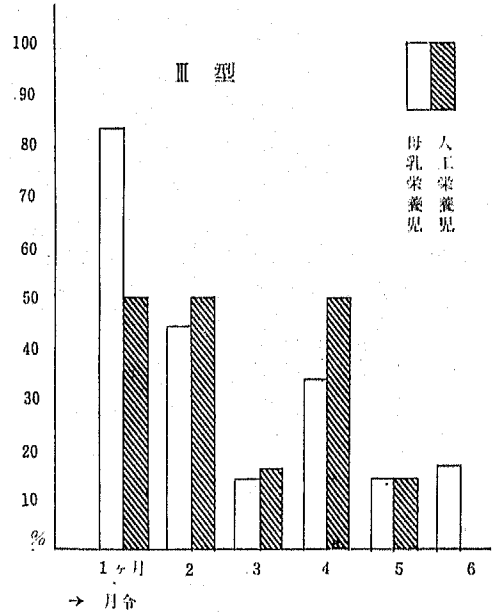
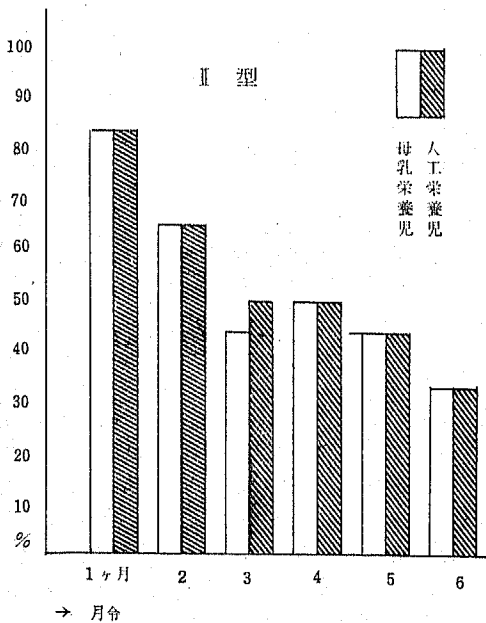


図13 栄養法別にみた乳児の血清ポリオ中和抗体保有率



III型も同様の傾向を示したという。著者が母乳を初乳(1~4日), 移行乳(5~14日), 成熟乳(15日以後), と区分して, その夫々の平均中和物質濃度を見た成績

によつても各型とも初乳の持つ中和能は移行乳, 成熟乳に比べて明らかに強く, 母乳中のポリオ中和物質の性状の検索には, 初乳が最も好都合と思われた。従つて本研究に於ても, 性状の検討の材料などには主に初乳を用いることとした。

次に本物質の特異性に就て行つた先人の成績をみると, Sabin<sup>④</sup>はポリオ中和能の検出された乳汁検体に就き, Herpes simplex, Japanese B encephalitis, St. Louis encephalitis, Western equine encephalitis 等のウイルスに対する中和能を同時に検索し, 乳汁中には少くとも5つの異なつた抗ウイルス活性物質の存在することを述べるとともに, ポリオ中和能の強かつた検体も他のウイルスには, 活性を示さなかつたとしてポリオ中和能は特異的なものだろうと考えた。又田橋<sup>⑤</sup>は3型のうちいずれかの型の血清抗体を欠如した母親の母乳では, 血清に欠如した型と同じ型の中和物質を認めなかつたとして上述の Sabin の意見に賛成した。著者が各検体別にその保有する中和能の状態をみた結果は, 上述の如く検体の一部は3型の各型に対して中和能を示したが, 然らざるもの即ち二つの型又は一つの型に対してのみ中和能を示すものも相当数認められた。即ち著者の成績からも母乳中の中和物質は型特異性を持つ可能性が示唆された。

次に加熱並びに保存と中和能との関係を見るに, 前者に就ては Sabin<sup>④</sup>, Warren<sup>⑦</sup>の結果と同様に 56°

C 30分では不要であつたが、80°C, 98°C 30分の加温では不活化され、母乳中の中和物質と血清中の抗体とは加熱に対し同様の態度を示すように思はれた。保存による影響に就てみた成績としては牛乳につけ調べた北岡<sup>②</sup>の成績をみるに止つた。北岡によれば牛乳中のポリオ中和物質には不安定因子と安定因子とがあり、不安定因子は1ヶ月間の氷室保存によつて消失したとしている。著者が-20°Cに3ヶ月保存後測定した成績では、母乳のポリオ中和能は一部に於て軽度の低下を認めたと、著明な変化とは認め難く当教室に於ける血清中和抗体の同様の経験に比べ大差を認めなかつた。なお Sabin<sup>④</sup>は乳汁にアルコール及び確安処理を加える等の検討を行い、中和物質の存在部位は脂肪や casein 中ではないとしている。著者の実験に於ても、乳汁から casein を除いた時のポリオ中和能と除かない時のポリオ中和能との間には大差がなく、その存在部位は casein 以外であると思われた。

以上、著者が予備実験でえた成績は先人の成績と多くの点で一致した。即ち乳汁中ポリオ中和物質は、1) 初乳中に多量に含まれ、2) 56°C 30分の加温に耐えるが、80°C 30分、98°C 30分では破壊され、3) -20°C 3ヶ月の保存によつて、その中和能に著しい低下は認められない、4) 型特異的の可能性が考えられ、5) casein 以外に存在する等である。

以上の予備実験に基づき著者は初乳につき column chromatography と免疫電気泳動を行い、その成績を血清の場合と可及的に比較しつつ母乳中のポリオ中和物質の性状の検討を企てた。

column chromatography による蛋白の分析は Sober<sup>⑧⑨</sup>等の功績に負う所が多いが、人の初乳を Diethylaminoethyl-cellulose を用いて分析した成績としては、Hansen<sup>⑩</sup>らや吉松<sup>⑪</sup>のものなどがある。Hansen<sup>⑩</sup>らは tris (hydroxymethyl) aminomethane-hydrochloric acid を buffer とし食塩濃度を連続的に増加しながら展開を行った。その結果は少くとも七つの蛋白分画に分けられたという。著者は buffer はとくに使用しなかつたが、分けられた60本のうち任意に5本を選び PH を測定した所、いずれも PH 7.0 ± 1.0 の範囲にあり、又食塩濃度は各分画につき実測したが、その値はほぼ連続的に増量していた。かくして著者の方法によつて初乳を展開した結果は食塩濃度 0.0375M から 0.3M までの間に大きな2つの peak が得られた。なお同時に全く同様な方法で血清についても検討を行ったが、初乳と血清との成績は殆んど同様で血清に於ても2つの peak を得た。なお試みに血清で得られた分画 A' を濾紙電気泳動で検

討した所  $\gamma$ -globulin と考えられた。

乳汁中におけるウイルス中和物質の性状を、この様にして得られた各蛋白分画別に検討した成績は、著者の知る範囲では内外の何れに於ても見あたらなかつたが、著者の検討結果によれば、血清と乳汁では異り、血清では A' 分画のみに証明され、他の分画には証明されず、之に反し初乳では A 分画のみならず、B 分画にもほぼ同程度に証明された。なお Hansen<sup>⑩</sup>は上述した方法によつて得られた各蛋白分画につき同種凝集素と溶連菌抗体の存在を検査しているが、溶連菌抗体は初乳の場合には I, II, III の各分画に証明されたとしている。

著者は次にこの様に column chromatography によつて溶出され、かつポリオ中和能を示した初乳の蛋白分画につき、さらに免疫電気泳動法によつて検討を行った。人乳の免疫電気泳動による検討としては、Karte<sup>⑫</sup>, Gugler<sup>⑬⑭</sup>, Hansen<sup>⑮⑯</sup>等のものがあげられる。又乳汁中のポリオ中和物質につき血清免疫学的検討を行った成績としては Athreya<sup>⑰</sup>ら, Warren<sup>⑱</sup>らのものがある。Athreya<sup>⑰</sup>らは Immunodiffusion technique にて精製したポリオウイルス抗原と乳汁とを反応させ血清を対照として比較した結果、母乳中の中和物質は血清のそれと同一のものと考えられるとした。Warren<sup>⑱</sup>らは濾紙電気泳動法と沈降反応を応用して検索した結果、母乳中の中和物質はおそらく特異抗体であるが、その性状は不明とした。

著者の成績によれば初乳中においてポリオ中和能を示した A, B 両分画のうち A 分画中には乳汁  $\gamma$ -globulin と、 $\gamma$ A-globulin との両方を含み、さらにおそらく MS<sub>2</sub>-globulin と思われる<sup>⑩⑮</sup>母乳に特有な抗原性を有する globulin 領域に証明した。之に反して B 分画中には乳汁  $\gamma$ A-globulin のみを含むと考えられた。而して  $\gamma$ M globulin は何れの場合も含まれなかつた。なほこの点に関しては、Hansen<sup>⑩</sup>もやはり溶連菌抗体は第1蛋白分画と第3蛋白分画の両方に存在し、第1蛋白分画は乳汁  $\gamma$ G-globulin, 乳汁  $\gamma$ A-globulin 等が混在し、第3蛋白分画は乳汁  $\gamma$ A-globulin であつたとしている。

さて母親の抗体や抗毒素などが新生児に移行する経路としては一般に二つ考えられる。即ちその1は胚胎盤によるものであり、その2は経乳汁によるものである。而してこのうちどちらが主であるかは、胎盤の構造も密接に関係し動物の種類によつて異なる。同時に移行する物質の性状によつても異るとされる。例えば Vahlquist<sup>⑲</sup>は容易に胎盤を通過するものとしてジフテリアや破傷風などの抗毒素、連鎖球菌などに対する

溶血素, ポリオ, 麻疹などの抗ウイルス抗体などを, 又胎盤を通過しないものとして腸チフス菌H, 大腸菌H或はO抗体などの抗細菌性抗体や皮膚感作性アレルギーなどをあげている。しかし一面これらの抗体や抗毒素などが経腸管性に移行したとの報告も古くから見られている (Vahlquist<sup>24</sup>, 吉田<sup>25</sup>, Tovey<sup>27</sup>, Leisseries<sup>28</sup>, Von Goer<sup>29</sup>)。又, ポリオ中和抗体に就ても Tompson<sup>30</sup>はマウスを用い, Lansing 株の抗体の血中への移行を証明している。従つて今回取りあげた人に於けるポリオ中和抗体がたとえ経胎盤性に移行することが確実であるにせよ, 母乳中に初乳中の存在が明らかな以上その腸管からの吸収の有無を最近の新しい検査法に基いて調べることは検討に値する課題と思う。著者がこれを人に就て検討した結果は上述の如く中和抗体を含む同種又は異種の免疫血清を粉乳に混じて与えた場合並びに, 中和物質を含む初乳を与えた場合の何れに於ても抗体が乳児の腸管から明らかに移行するという結果は得られなかつた。即ち細菌について調べた Nordbring<sup>31</sup>や Schneeweiss<sup>32</sup>の成績と相似となつた。著者の実験のうち免疫血清の一部の抗体価は著しく高いものであつた。ただし初乳に於ては中和能が比較的低く, 又対象が新生児又は未熟児のため経胎盤性抗体を多少とも証明し, かつ大量の投与は不可能であつた。そこで著者はさらに母乳栄養と人工栄養の2群の乳児を対象として, 血清ポリオ中和抗体の検討を行つた。即ち乳児78名につき中和抗体保有率から比較した。その成績は上述のようにⅢ型で1ヶ月の母乳栄養児がやゝ高かつたのを除けば, 各型とも栄養法によつて殆んど差を認めず, 富永<sup>33</sup>の最近の成績とは異り吉岡<sup>34</sup>らの述べた所と一致した。即ち母乳中のポリオ中和物質は既に Warren<sup>7</sup>, 田橋<sup>8</sup>, Lepow<sup>9</sup>, Gonzaga<sup>35</sup>らの述べた如く乳児の消化管内に於てポリオウイルスに対して影響を与え, その増殖を抑制することがあつても, 乳児の血清中和抗体に及ぼす影響は一般には少いだろうと考えられた。

## VI 結 語

母乳におけるポリオウイルス中和物質の性状と, その乳児への経腸管性移行につき検討を加えた。前者はDEAE (Diethylaminoethyl) cellulose column chromatography, 免疫電気泳動法により検討した。後者は乳児に対するポリオ免疫血清及び初乳の経口的投与と栄養法別にみた乳児のポリオ血清中和抗体保有状況により検討した。

1) 予め検討した予備実験により, i) 本物質は初乳中に多く含まれ, ii) 型特異性の可能性が大きく,

iii) 加熱 (80°C, 30分) によつて破壊されるが保存 (-20°C, 3ヶ月間) によつては著しい影響を受けず, iv) casein 中には含有されないことが明らかとされた。

2) 初乳を column chromatography によつて検索した結果二つの Peak (I, II) がえられ, ポリオ中和能はその何れにも認められた。

3) 上述の Peak I の一部につき免疫電気泳動法によつて検索した結果この部分よりは  $\gamma$ G-globulin,  $\gamma$ A-globulin と母乳特有の globulin とが同定された。同様にして Peak II の一部よりは  $\gamma$ A-globulin が同定された。 $\gamma$ M-globulin は何れにも検出されなかつた。

4) 新生児未熟児15名に同種及び異種のポリオ免疫血清又はポリオ中和物質を含む初乳を投与した場合, 血清中和抗体は投与前後に於いてほぼ不変であり, 乳児78名に就き検索した血清中和抗体の保有率は栄養法によつて著しい差を認めなかつた。即ち多量の本物質が経腸管性に移行するという積極的な証明はえられなかつた。

終りに臨み御指導を賜つた吉田久教授, 御助言と御助力をいたゞいた信大生化学教室藤村紫郎教授, 福島政夫講師, 須沢春雄助手, 東大血清学教室松橋直助教授, 日井美津子先生, 予研多ヶ谷勇部長ならびに当教室神谷健博士, 林喜代彦学士, 上条肇学士に衷心より謝意を表します。なお母乳及び血清の採取にあたり御協力いたゞいた信大産婦人科学教室及び松本市第一助産院に対し深く感謝致します。

本文の要旨は昭和38年日本伝染病学会第37回総会, 昭和39年日本小児科学会第67回総会及び昭和40年日本伝染病学会第39回総会において発表した

## 文 献

- ① Kitaoka, M. & Miura, T.: The neutralization test of normal and convalescent human sera in Tokyo, against the mouse adapted poliomyelitis virus Lansing Strain. Jap. Med. J., 2: 285, 1949
- ② Kitaoka, J. & Miura, T.: Neutralization test of animal sera collected in Japan against poliomyelitis virus Lansing Strain. Jap. Med. J., 4: 297, 1951
- ③ Sabin, A. B.: Antipoliomyelitic substance in milk of human beings and certain cows. Am. J. Dis. Child., 80: 896, 1950
- ④ Sabin, A. B. & Fieldsteel, A. H.: Antipoliomyelitic activity of human and bovine colostrum and milk. Pediatrics, 29: 105, 1962
- ⑤ Athreya, B. H., Coriell, B. S. L. & Charney, J.: Poliomyelitic antibodies in human colostrum and milk. J. Pediatr.

- trics, 64 : 1, 1964 ⑥Hodes, H. L., Berger, R. & Hevzy M.: Demonstration of antipoliiovirus factors in human milk. Different from neutralizing or retarding antibody. Am. J. Dis. Child., 104 : 457, 1962 ⑦Warren, R., Lepow, M. L., Bartsch, G. E. & Robbins, F. C.: The relationship of maternal antibody, breast feeding, and age to the susceptibility of newborn infants to infection with attenuated poliiovirus. Pediatrics, 1 : 4, 1946, 1964 ⑧田橋賢士: 母乳に含まれるポリオウイルス中和抗体について。第1報 母乳中のポリオ中和抗体測定成績。日本小児科学会誌, 67 : 620, 昭38 ⑨田橋賢士: 母乳に含まれるポリオウイルス中和抗体について。第2報 母乳中のポリオ中和抗体のポリオウイルス感染に及ぼす抑制的効果に関する実験的研究。大阪医科大学雑誌, 22 : 168, 昭39 ⑩山崎美喜子: 母乳に含まれる腸管系ウイルス中和抗体について。臨床小児医学, 12 : 207, 昭39 ⑪Stocker, M. G. P. & Marmion, B. P.: Detection of Q fever antibodies in whey by the antiglobulin sensitization test and other techniques. J. Hyg., 50 : 1, 1952 ⑫藤井暢三: 生化学実験法。定量篇, 96頁, 南山堂, 昭和33年 ⑬神谷 健: 小児の弱毒生ポリオウイルス接種に関する研究。第1編 乳児院に収容せる乳幼児の糞便中投与ウイルス分離成績。日本小児科学会誌, 67 : 702, 昭38 ⑭Sober, E. A., Gutter, F. J. Wyckoff, M. M. & Peterson, E. A.: Chromatography of protein, fraction of serum protein on anion-exchange cellulose. J. Am. Chem. Society, 78 : 756, 1956 ⑮Sober, H. A. & Peterson, E. A.: Protein chromatography on ion exchange cellulose. Federation proceeding, 17 : 1116, 1958 ⑯Hansen, L. A.: Immunological characterization of chromatographically separated protein fractions from human colostrum. Int. Arch. Allergy, 20 : 65, 1962 ⑰吉松 彰: イオン交換セルロースによる乳汁蛋白質の研究。日本小児科学会雑誌, 67 : 424, 1963 ⑱Karte, H.: Immunoelktrophoretische Befunde bei Neugeborenen und Frühgeborenen. Monatschrift für Kinderheilkunde, 107 : 108, 1959 ⑲Gugler, E. & Bokelmann, G.: Über Immunoelktrophoretische Untersuchungen on Frauenmilchproteinen. I Mitteilung. Schweiz. Med. Ws., 88 : 1264, 1958 ⑳Gugler, E. & Bokelmann, G.: Über Immunoelktrophoretische Untersuchungen on Frauenmilchproteinen. II Mitteilung. Schweiz. Med. Ws., 89 : 925, 1959 ㉑Hansen, L. A.: The serological relationship between human milk and blood plasma. Int. Arch. Allergy, 17 : 45, 1960 ㉒Hasen, L. A.: Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum. Int. Arch. Allergy, 18 : 1, 1961 ㉓Vahlquist, B.: The transfer of antibodies from mother to offspring. Advanse in pediatrics, 10 : 305, 1958 ㉔Vahlquist B.: Minute absorption of diphtheric antibodies from the gastrointestinal tract in infants. Pediatrics, 4 : 401, 1949 ㉕吉田忠人: 授乳による抗体の移行に就て。第2篇 抗毒素の移行に就て。日本小児科学会雑誌, 59 : 456, 昭30 ㉖吉田忠人: 授乳による抗体の移行に就て。第3篇 沈降素の移行に就て。日本小児科学会雑誌, 59 : 561, 昭30 ㉗Abbas, T. M. & Tovey, J. E.: Proteins of the liquor amni. Brit. Med. J., 2 : 476, 1960 ㉘Leisinger S. C.: Uptake of antibodies by the intestine of the newborn infant. Am. J. Dis. Child., 103 : 160, 1962 ㉙Groer, F. V. and Kassowitz, K.: Die normale Diphtherie Immunität in Kindesalter. Ztschrift. Immunitätsforsch. und Exper. Therapy, 28 : 327, 1919 ㉚Tompson, R. and Meyers, F. P.: Passive transfer of immunity to Lansing poliomyelitis virus from actively immunized mothers to young mice. Am. J. Hyp., 52 : 213, 1950 ㉛Nordbring, F.: The failure of newborn premature infants to absorb antibodies from heterologous colostrum. Acta Paediatrica, 46 : 569, 1957 ㉜Schneeweiss, B. and Schicke, R.: Experimentelle Studies zur Frage der enteralen Resorption von Antitoxin in Neugeborenenalter. Monatschrift für Kinderheilkunde, 112 : 380, 1964 ㉝吉岡 一: 乳幼児期における抗体の消長とくに栄養法との関係についての研究。小児科臨床, 16 : 691, 昭38 ㉞Lepow, M. L., Warren, R. T., Ingran, V. G., Dangherty, S. C. and Robbins, F. C.: Sabin type I (LSc 2ad) oral poliomyelitis vaccine. Am. J. Dis. Child., 104 : 67, 1962 ㉟Gonzaga, A., Warren, R. J. and Robbins, F. C.: Attenuated poliiovirus infected in infants fed colostrum from poliomyelitis immune cows. Pediatrics, 32 : 1039, 1963 ㊱松橋 直・白井美津子: Cellulose acetate 膜, millipore 膜, cellogel を用いる免疫電気泳動法。日本臨床, 22 : 2624, 1964 ㊲富永秀雄: 健康小児におけるポリオウイルスに対する血清中和抗体に関する研究。第1編 ポリオの先天免疫について。日本小児科学会雑誌, 69 : 550, 昭40 ㊳松橋 直:  $\gamma$ -Globulin of Heterogeneity. 臨床科学, 1 : 628, 1965 より引用