

ヒト初乳中のC.difficile toxinに対する中和活性-2-初乳細胞培養上清中の中和 抗体

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8936

ヒト初乳中の *C. difficile* toxin に対する中和活性

(II) 初乳細胞培養上清中の中和抗体

金沢大学小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

和田 直 樹

(昭和56年 8月22日 受付)

Key words *C. difficile* toxin, Secretory IgA, Colostral cells.

初乳細胞の培養上清は、IgA を主体とする免疫グロブリンを含んでいる。乳腺上皮下のプラズマ細胞でつくられた IgA が J-chain で dimer となり、分泌された時点で secretory component と結合して分泌型 IgA (以下 S-IgA と略す) となるが、この物質を初乳中の macrophage が、その表面中あるいは細胞内にとりこみ、輸送や貯蔵の媒介をなしていると言われるようになった¹⁾。壊死性腸炎 necrotizing enterocolitis (以下 NEC と略す) は、低出生体重児に多く見られるが、母乳哺育児には相対的に少ないと言われている。Barlow ら^{2,3)} は、新生児ラットの NEC を作り出し、そのラットに凍結母乳を与えたが NEC を防ぐことができなかった。しかし無処置の母乳や、ラットの母乳細胞を加えた人工乳を与えると効果的に防禦することができたと報告している。そこで彼等は、初乳細胞が、ラット上部消化管にて一週間以上も生存し続け、NEC に対して防禦作用を続けるのであろうと推量した。このことより、本研究では、ヒト初乳において主要な位置を占める macrophage の免疫学的防禦について検討を試みた。つまり macrophage を含む初乳細胞を 7 日間培養し、その上清中に *Clostridium difficile* toxin に対する中和抗体が存在するかを調べ、さらに各々の免疫グロブリンの定量及び、中和抗体活性への関与について検索した。

対象および方法

1. 母乳細胞の分離

前報⁴⁾で報告した初乳を無作為に 60 検体抽出して使用した。検体は燐酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2, 0.15

Mol, 以下 PBS と略す) にて 2 倍希釈し、室温にて 500 x g, 10 分間遠心し脱脂した。沈殿細胞は PBS で 2 度洗浄後、不活化子牛血清 (GIBCO) を 20% 含んだ RPMI 1640 培養液 (GIBCO) にて懸濁した。この細胞懸濁液は、Ficoll-Isopaque (Lymphoprep, Nyegaard, Co., Oslo, Norway) に静かに重層し、室温にて 400 x g, 20 分間遠心した。中間層に得られた細胞を PBS で 3 回洗浄し、RPMI 1640 培養液に 2.0×10^6 cells/ml の濃度で再浮遊した。得られた細胞は、トリパンブルー色素排泄試験で判定したところ、90% 以上生存細胞であり、イーストの食作用⁵⁾やエステラーゼ染色⁶⁾にて 33~78% の macrophage、染色形態にてリンパ球 10~28%、好中球 4~30% と区別できた。この研究では、これらの細胞をまとめて初乳細胞として使用した。

2. 初乳細胞培養

細胞は、L-glutamine (0.3 mg/ml), penicillin (200 U/ml), amphotericin B (5 μ g/ml), gentamicin (10 μ g/ml), 不活化子牛血清 (GIBCO) を 20% 含んだ RPMI 1640 培養液で 2.0×10^6 cells/ml の濃度で培養した。培養は、プラスチック培養チューブ (No. 2027, Falcon Plastics, Oxnard, Calif.) にて 1.0~3.0 ml の培養液になるよう調節した。この培養チューブは、7 日間、37°C 下、5% 炭酸ガス培養恒温器内にて培養した。7 日間培養後、400 x g, 15 分間室温で遠心することにより細胞成分を分離し、その上清を検体として、-20°C にて凍結保存した。

3. 免疫グロブリンの定量

母乳細胞培養上清中の immunoglobulin A (IgA),

Neutralizing Activity against *Clostridium Difficile* Toxin in Human Colostrum. (II) Neutralizing Antibody in Culture Supernatant of Colostral Cells. Naoki Wada, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

IgM, IgG量は、沢井ら⁷⁾によって、ラテックス凝集反応を精密化したラテックス近赤外比濁装置で測定した(Mitubishi Chemical Industries, Ltd, Tokyo). 均一な直径0.2 μ mのラテックス粒子に、抗ヒトIgA, IgM, IgGを感作しておき、希釈した初乳細胞培養上清(0.6 ml)に加えて抗原抗体反応を起こさせ、ラテックスが凝集する際に近赤外部(0.9 μ m)の光の透過度が低下することを利用して定量した。

4. 母乳細胞培養上清中の中和活性

母乳細胞を7日間培養した上清中のC. difficile toxinへの中和活性試験は、Y1-adrenal cellを使用して行った。各々の上清50 μ lとTCID₅₀12 μ lのC. difficile toxinとで、37°C, 60分間preincubation後、前報⁴⁾で述べた方法でassayし、再現性のあるもののみを陽性とした。さらに免疫沈降法にて、この中和活性に拘わる免疫グロブリンを検索した。免疫沈降法はGeorgeら⁸⁾の行った方法を一部修正して行った。つまり母乳細胞培養上清に、carrierとしてのヒト血清を加えて、各々の抗ヒトIgA, IgM, IgG家兎血清(Behringwerke, A. G., Marburg, West Germany)と抗原抗体反応を引き起こす沈降反応を利用した。ヒト血清は、一人の健康人から得られ、あらかじめtoxinを中和できないことを確かめた。沈降反応は37°C, 60分間preincubation後、4°Cに一昼夜静止した。翌朝15分間10,000 x gで遠心し、その上清を中和活性を調べるassayへの検体とした。

成 績

1. 母乳細胞培養上清中の免疫グロブリン量

7日間培養の初乳細胞培養上清(2 \times 10⁶cells/ml)においてIgAとIgMの平均値は各々3.828 ng/ml(318~15,010 ng/ml)と1,063 ng/ml(405~2,604 ng/ml)であった。IgGの濃度は、IgA, IgMに比し低かった。(平均154 ng/ml, 範囲51~815 ng/ml). (Fig 1).

2. 母乳細胞培養上清中のC. difficile toxinへの中和活性

中和活性の検出には、前報⁴⁾と同様にY1-adrenal cellを使用した。培養上清は1x TCID₅₀のC. difficile toxinとpreincubation後、Y1-adrenal cellに接触させた。そして10%以下の細胞変化まで押さえることができる検体を、中和活性陽性検体とした。この判定条件に合致するものは、60検体中5例(8.6%)であった。この上清での反応は、初乳分画のそれに比し非常に弱いので、希釈して中和活性の強弱を検索することは困難であった。又、中和活性陰性検体を希釈し検索しても、同様に中和活性を示さなかった。陽性検体5例は、前報⁴⁾で検索した初乳分画でも中和活性を示した。

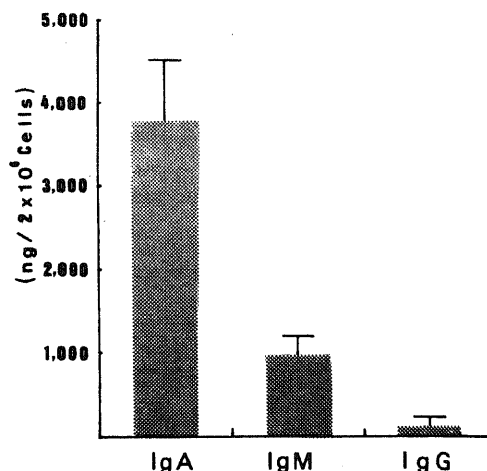


Fig. 1. Immunoglobulins in culture supernatants of colostrals cells. Colostrals cells were cultured in a density of 2.0 \times 10⁶ cells per ml for 7 days. Vertical bars represent standard errors of the means of results from 60 specimens.

3. 中和活性陽性検体の免疫グロブリン量

Table 1で示したように、母乳細胞培養上清の完全な中和活性は、陽性5検体中4例で、ウサギ抗ヒトIgA抗体を使用した免疫沈降法で完全に消去した。1例(D)だけが抗IgA抗体における中和活性の完全な消失は見られなかった。この検体に、抗IgA血清の量を多くしても著名な変化はみられなかった。陽性5検体と残りの陰性55検体中のIgA濃度は、Fig 2に示したように、それぞれ2,928 \pm 1,111 ng/ml (standard error)と4,040 \pm 857 ng/mlであった。

考 察

古くから経験的あるいは統計的な事実として、人乳は新生児期の免疫機構が発達するまで、諸種の細菌による胃腸系疾患に対し防禦的に働くと言われていた⁹⁻¹¹⁾。ヒト初乳中の主なる免疫グロブリンは、腸管の粘膜表面にとどまって、抗体産生に関与するS-IgAである。S-IgAの由来については、Homing現象¹²⁻¹⁴⁾で説明されている。つまり母親の腸管パイエル板が、腸内細菌の抗原刺激を受けると、その当該Bリンパ球の一部は記憶細胞となり、リンパ道及び血行を経て乳腺に到達してIgA抗体産生細胞に分化し、血清型IgAを産生するというものである。これがsecretory componentと結合し乳腺腔に分泌されるので、母乳には腸内細菌に対する抗体が数多く含まれている。これをふまえて、Holmgrenら¹⁵⁾は、毒素産生大腸菌やVibrio

Table 1. Identification of immunoglobulin class of toxin neutralizing antibodies in culture supernatants of colostrual cells^a

Colostrual cell samples (50 μ l)	Rounding response			
	Rabbit serum ^b (10 μ l)	Anti-IgA (10 μ l)	Anti-IgM (5 μ l)	Anti-IgG (8 μ l)
Medium ^c	+	+	+	+
A	-	+	-	-
B	-	+	-	-
C	-	+	-	-
D	-	±	-	-
E	-	+	-	-

^aThe culture supernatants of colostrual cells were incubated with 1 μ l of human serum as carrier and the appropriate volume of rabbit anti-human IgA, IgM, or IgG antibodies at antigen-antibody equivalence for precipitation. After separation from immune precipitates by centrifugation, the supernatants were preincubated with 12 μ l of *C. difficile* toxin (1 TCID₅₀) for 60 min at 37°C. Then, the mixture of culture supernatants and the toxin was added to Y1-adrenal cells in microplate. Rounding response of Y1-adrenal cells was determined 18 to 24 h after incubation: += >50%; ± = 10 to 50%; - = <10% rounded cells.

^bNonimmune rabbit serum.

^cRPMI 1640 with 20% fetal bovine serum.

cholerae の toxin に対し、S-IgA 抗体がパキスタン産婦には存在し、スウェーデン産婦にはほとんど存在しなかったと報告し、これら細菌の罹患率に、2つのグループで差があることを見出した。S-IgA などを含む液性免疫物質に加えて、ヒト初乳中には macrophage (79~80%)、lymphocyte (10%)、多核球等いろいろと免疫学的に能動的に働く細胞が含まれている。これら母乳細胞の新生児感染防禦機構への役割は、ほとんど知られてはいないが、母乳哺育児が NEC に罹患しにくいということから、何等かの関係があると思える。Crago ら¹⁰⁾は、初乳の macrophage が IgA や IgM のような免疫グロブリン、ラクトアルブミン、secretory component 等を含んでいることを、蛍光抗体法にて明らかにした。lymphocyte ではなく macrophage だけにこれらの蛋白が一致して見られるということは、初乳 macrophage が、環境からの摂取によって、これらの蛋白を獲得したということを物語っている。Pittard ら¹¹⁾は、初乳細胞をマイトージェン刺激なしで培養すると、その培養上清中には IgA を主体とする免疫グロブリンを放出したと述べている。以上の実験成績にて、彼等は初乳 macrophage は免疫グロブリンを運んだり貯蔵したりする乗物であろうと強調している。この研究では、7日間培養した母乳細胞上清中には、IgA を平均 3,826 ng/2 \times 10⁶cells 含んでおり、IgM は平均 1,603 ng/2 \times 10⁶cells であり、IgA は IgM の約3倍多く含んでいた。又、IgG は平均 154 ng/2 \times 10⁶cells で、ほとんど無視できる量であった。この結果は、IgM が高いことを除いて

Pittard ら¹¹⁾の言っている量とほとんど同じである。さらに、この初乳細胞培養上清を、Y1-adrenal cell assay の利用にて、*C. difficile* toxin に対する中和活性を検索してみると、60検体中5検体(8.6%)が中和抗体を保持していることがわかった。これらは、前報⁹⁾で検索した初乳分画でも陽性であった。又、免疫沈降法の結果より、母乳細胞培養上清中 *C. difficile* toxin に対する中和抗体の主体は IgA と思われた。しかし、細胞培養上清中の IgA 濃度は、中和活性が陽性、陰性に拘わらず、統計学的に有意差はなかった。検体(D)に関しては、中和活性の一部は IgA であるが、他に何等かの要素が働いていることも推定できる。*C. difficile* toxin に対し IgA 抗体を放出する初乳細胞(主として macrophage) を含んでいた初乳細胞培養上清検体が、toxin に中和抗体を示した初乳分画検体の約1/3しかなかった理由や、このような初乳 macrophage の生物学的な重要性に関しては、今後解明していかなければならない問題と思われる。しかし、初乳 macrophage が各種の抗原に対して、抗体を持つ免疫グロブリンをゆっくり放出することが可能で、貧食作用を現わし、pH 変化や酵素の存在下にも耐容性を示すことができるなら、これらの初乳細胞が新生児の胃腸系に占める防禦過程に十分貢献し、ある種の NEC から新生児を防禦するのに一役かっていると推定できる。

結 論

初乳 60 検体から、それぞれ初乳細胞を分離し、マイ

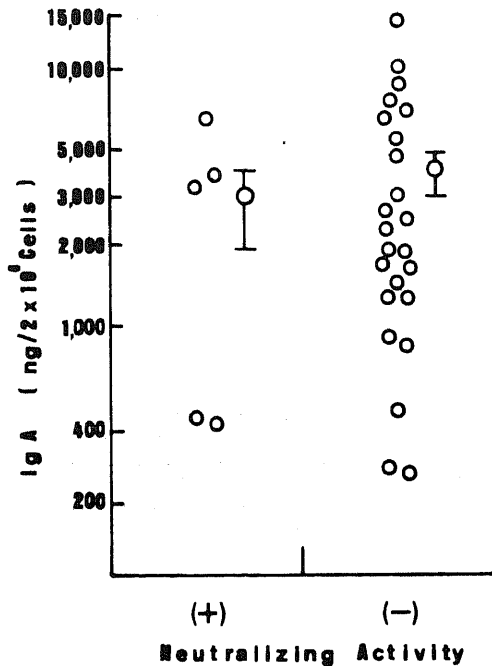


Fig. 2. IgA concentration and neutralizing activity against *C. difficile* toxin in culture supernatants of colostrum cells.

The samples which reduced the 50% cytopathic effect of toxin on Y1-adrenal cells to less than 10% were considered to have neutralizing activity against the toxin. (+) represents neutralizing activity-positive samples, while (-) represents neutralizing activity-negative samples. \bar{x} indicates the geometric mean value and its standard error. The difference of IgA concentrations between two groups was statistically not significant, as evaluated by Student's t test ($p > 0.5$).

トージェン刺激なしで7日間培養した。そして、その培養上清の *C. difficile* toxin に対する中和抗体活性の存在及び免疫グロブリンを定量して次の結果を得た。

1. Y1-adrenal cell assay にて 60 検体中 5 例 (8.6%) に *C. difficile* toxin に対する中和抗体活性が存在した。この 5 例は、初乳分画においてもすべて中和活性抗体を保持していた。これは初乳細胞 (主として macrophage) が中和抗体活性を放出することを示唆する。

2. 初乳細胞を 7 日間培養すると免疫グロブリンを放出する。IgA は平均 3,826 ng/ml (318~15,010 ng/ml), IgM は平均 1,063 ng/ml (405~2,604 ng/ml), IgG は平均 154 ng/ml (51~815 ng/ml) であった。IgA

は IgM の約 3 倍高く、IgG は極度に低かった。

3. 免疫沈降法により中和抗体活性と免疫グロブリンとの関係を調べてみると、抗ヒト IgA 家兎血清のみで中和抗体活性の消失をみた。つまり、中和抗体活性の主体は IgA によるものと思われた。

4. 中和抗体活性の保持する検体と、保持しない検体の IgA は、それぞれ $2,928 \pm 1,111$ ng/ml (standard error), $4,040 \pm 857$ ng/ml であり、統計学的には有意差はなかった ($P > 0.5$)。つまり中和抗体活性は IgA の量とは無関係であることが判明した。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました谷口昂教授に感謝いたします。また毒素液作製に御協力いただいた微生物学教室の西田尚紀教授、組織培養を直接御指導戴いた癌研究所ウイルス部の波田野基一教授、免疫グロブリンを測定いただいた分子免疫部の右田俊介教授に深く感謝します。また常に多大な御協力をいただいた西田直己助手、宮脇利男助手はじめ、第 7 研究室の諸兄に感謝します。

文 献

- 1) Pittard, W. B., III, Polmar, S. H. & Fanaroff, A. A. : The breast milk macrophage. A potential vehicle for immunoglobulin transport. J. Reticuloendothel. Soc., 22, 597 - 603 (1977).
- 2) Barlow, B., Santulli, T. V., Heird, W. C., Blanc, W. A., Pitt, J. & Schullinger, J. N. : An experimental study of acute neonatal enterocolitis. The importance of breast milk. J. Pediat. Surg., 9, 587 - 595 (1974).
- 3) Pitt, J., Barlow, B. & Heird, W. C. : Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. I: Role of milk leukocytes. Pediat. Res., 11, 906 - 909 (1977).
- 4) 和田直樹 : ヒト初乳中の *C. difficile* toxin に対する中和活性。(I)。初乳中の中和抗体。十全医会誌(投稿中)。
- 5) Miller, M. E. : Phagocytosis in the newborn infant. Humoral and cellular factors. J. Pediat., 74, 255 - 259 (1969).
- 6) Li, C. Y., Lam, K. W. & Yam, L. T. : Esterases in human leukocytes. J. Histochem. Cytochem., 21, 1 - 12 (1973).
- 7) Sawai, M., Morita, S., Sato, S., Nishida, H., Moriya, N. & Migita, S. : Latex agglutination by near infrared turbidimetry, its application for immunoglobulin assay for culture fluid of lymphocytes. Proc. Jpn. Soc. Immunol., 9, 114 - 115 (1979).
- 8) George, E. R. & Cohen, H. J. : Kinetics of immunoglobulin synthesis and secretion by resting

and pokeweed mitogen-transformed human leukocytes. Clin. Immunol. Immunopathol., 12, 94 - 104 (1979).

9) **Larsen, S. A., Jr. & Homer, D. R.** : Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle-class U.S. population. J. Pediat., 3, 417 - 418 (1978).

10) **Michael, J. G., Ringenback, R. & Hottensstein, S.** : The antimicrobial activity of human colostrum antibody in the newborn. J. Infec. Dis., 124, 445 - 448 (1971).

11) **Robinson, J. E., Harvey, B. A. M. & Soothill, J. F.** : Phagocytosis and killing of bacteria and yeast by human milk cells after opsonisation in aqueous phase of milk. Br. Med. J., 3, 1443 - 1445 (1978).

12) **Chandra, R. K.** : Immunological aspects of human milk. Nutr. Rev., 36, 265 - 272 (1978).

13) **Hanson, L. Å., Ahlstedt, S., Carlsson, B.,**

Fällström, S. P., Kaijser, B., Lindblad, B. S., Åkerlund, A.S. & Edén, C. S. : New knowledge in human milk immunoglobulin. Acta. Pediat. Scand., 67, 577 - 582 (1978).

14) **Goldblum, R. M., Ahlstedt, S., Carlsson, B., Hanson, L. Å., Jodal, U., Janson, G. L. & Åkerlund, A. S.** : Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunisation. Nature., 257, 797 - 799 (1975).

15) **Holmgren, J., Hanson, L. Å., Carlsson, B., Lindblad, B. S. & Rahimtoola, J.** : Neutralizing antibodies against *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins in human milk from a developing country. Scand. J. Immunol., 5, 867 - 871 (1976).

16) **Crago, S. S., Prince, S. J., Pretlow, T. G., Mcghee, J. R. & Mestecky, J.** : Human colostrum cells. I: Separation and characterization. Clin. Exp. Immunol., 38, 585 - 597 (1979).

Neutralizing Activity against Clostridium Difficile Toxin in Human Colostrum (II) Neutralizing Antibody in Culture Supernatant of Colostral Cells Naoki Wada, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 90, 703-708 (1981)

Key words: *C. difficile* toxin, Secretory IgA, Colostral cells

Abstract

Sixty colostrum cell specimens were cultured for 7 days without mitogens. Neutralizing activity against *C. difficile* toxin of 7-day culture supernatants of human colostrum cells was assessed by the use of Y1-adrenal cell assay.

1. Of 60 specimens, 5 samples exhibited neutralizing activity against *C. difficile* toxin. Colostrum also had a neutralizing effect against this toxin. It seemed that colostrum cells released neutralizing antibody in the culture supernatants.

2. Culture supernatants of human colostrum cells contained immunoglobulins which seemed to be secreted or released mainly from colostrum macrophages. In 7-day cultures of colostrum cells (2×10^6 cells per ml), mean concentrations of IgA and IgM were 3,826 ng/ml (318~15,010 ng/ml) and 1,063 ng/ml (405~2,604 ng/ml), respectively. Concentration of IgG in the culture supernatants was markedly lower (mean, 154 ng/ml; range, 51 to 815 ng/ml) than those of IgA and IgM.

3. Supernatant samples were incubated with human serum as a carrier and rabbit anti-human monospecific antibodies against IgA, IgM, or IgG at antigen-antibody equivalence for precipitation. The neutralizing activity in the culture supernatants of colostrum cells was completely eliminated only by precipitation with rabbit anti-human IgA antibody. These results suggest that the neutralizing activity against *C. difficile* toxin resides mainly in the IgA fraction in the culture supernatants of colostrum cells.

4. Concentrations of IgA in the culture supernatants of the five test-positive and the remaining test-negative samples were $2,928 \pm 1,111$ (standard error) and $4,040 \pm 857$ ng/ml, respectively. The difference in IgA concentration was not statistically significant, indicating that the concentration of IgA in colostrum cell culture was not directly related to the neutralizing activity against *C. difficile* toxin.