

学 位 論 文 題 名

未哺乳新生豚リンパ・血液中への
初乳蛋白質の移行に関する研究

学位論文内容の要旨

新生期の脊椎動物の抗病性は、母親から獲得した免疫グロブリンに負っている。一般に、抗体の移行経路には4つの型：Ⅰ)卵黄嚢を介する(卵生動物)型、Ⅱ)母乳の腸管吸収を介する型、Ⅲ)卵黄嚢内蔵板を介する型、Ⅳ)胎盤を介する型、がある。Ⅲ)に属するラットでは、若干の抗体が卵黄嚢と胎盤から移行するが、生後14日目まで上部消化管に存在するIgG 特異レセプターによって初乳中の免疫グロブリンが選択的に吸収されていることがよく知られている。一方、Ⅱ)に属する豚では、母親からの抗体が移行せず低 γ グロブリン血症の状態生まれてくるため、初乳摂取による消化管からのIgGの確保は本来非常に重要な意味を持つはずである。しかしながら、生後2～3日中は、免疫グロブリンのみならず、同種、異種の蛋白質や非蛋白性の高分子物質も吸収されることがin vivoの実験で報告されており、この時期の豚における消化管からの高分子物質の移行型は、“非特異的(nonspecific)”，非選択的(nonselective)”なものだと考えられてきた。ところが、豚と同型に属する仔牛においてIgG₁は、IgMよりも高率で吸収されるという報告もありⅡ)型における高分子物質の移行様式は未だ確定されていない状況である。

このような混乱が起きている背景には、今迄に有蹄類で行われてきた実験系に幾つかの問題点があったことが挙げられる。第一に、測定試料の問題であり、第二に測定法の選択の問題である。本研究では、これらの問題を解決するために移行物質が代謝の影響を受けにくいリンパ液を血液と同時に採取しうる実験手技を確立し、未哺乳新生豚の十二指腸へ牛初乳を投与した。採取した両液中の牛初乳成分の定量分析は、酵素抗体法(ELISA)を用いて行なった。その結果、牛初乳中のIgGの移行特性並びに移行経路を明らかにすることが出来た。

第1章 未哺乳新生豚における経時的な胸管リンパ液と血液の同時採取法の確立

胸管リンパ液の採取方法としては、開胸手術を施し胸部から採取する方法が広く羊、ラットで行われてきたが、この方法を用いると動物の生命に危険が及び実験に供した場合にも生理的な

状態から逸脱した状態となる。そこで、供試動物への負担を軽減するために、開胸術を施さない手術法を確立した。この方法を用いると、未哺乳新生豚でも長時間の実験に耐えうることが明らかになった。また、本方法は、ハロセン麻酔下で手術を行なうため麻酔死の懸念も少ない。

手術方法の概略を示す。まず左頸部を切開し、頸静脈に開口している胸管ヘカニューレ（外径0.5～1.0mm）を挿入する。次に末梢血採取用として、外頸静脈ヘカテーテル（外径1.35mm）を挿入し、頸部を整復する。次に腹部正中切開を施し、胃液排泄用ドレインを装着後、十二指腸投与用カテーテルを装着し、腹部を整復する。

麻酔覚醒後、保定枠内で実験を行なうが、この時、胸管リンパ液の流速は、 $6.1 \sim 16.6 \text{ ml/h/kg}$ 体重であり仔羊や仔牛での報告に近い値となった。また、流速は牛初乳投与後45分目で最大となった後、6時間後まで一定の流速を維持した。この実験系では、血液とリンパ液を分離した状態で同時に採取できることから、消化管からリンパ系或いは血管系を介する初乳 IgG の移行特性を別々に評価することが可能となった。

第2章 酵素抗体法（ELISA）による牛初乳蛋白質成分測定法の改良

消化管からの初乳蛋白質の移行については、電気泳動的、免疫学的手法がよく用いられている。しかしながら、これらの手法は定性的な判定を下す場合には有効であるが、定量的な測定については感度が悪いという問題点がある。そこで、牛初乳蛋白質成分に対する ELISA の改良を行った。

牛初乳中から測定する蛋白質；IgG（M. W. 150,000）、ガゼイン（M. W. 23,600）、初乳特有小分子蛋白質；SP（M. W. 約10,000）の3つをゲルろ過法（Sephadex G-100カラム）によって分画し、これに対するウサギ抗体を得た。これらの抗体は、アフィニティークロマトグラフィー（Sephrose 4 B カラム）によって更に精製した後、混合し、混合抗体にペルオキシダーゼを標識して混合標識抗体を得た。測定は、サンドウィッチ法によって行ない、各蛋白質とも $10 \sim 10^3 \text{ ng/ml}$ の範囲で再現性良く標準曲線が得られた。

第3章 覚醒下未哺乳新生豚の消化管からの牛初乳蛋白質の移行

1) リンパ液、血漿中への牛初乳蛋白質の移行

脂肪を除去した牛初乳を未哺乳新生豚の十二指腸に投与（ 40 ml/kg 体重）すると、投与後4時間でリンパ液及び血漿中に牛初乳蛋白成分が出現してくることが電気泳動法によって明らかになった。初乳投与前のリンパ液中蛋白質濃度は非常に低いため、投与後のリンパ液中の泳動パターン

ンは牛初乳のパターンを良く反映した。このことは、消化管からの初乳蛋白質の移行を解析するためにリンパ液を用いることが有効であることを示唆している。

また、仔牛では初乳蛋白質の移行は全て胸管リンパを介したものと報告されていたが、新生豚においては血液中へも初乳蛋白質の移行が確認されたことから、仔牛とは異なる血管系の関与が明らかになった。

2) リンパ液中への牛初乳蛋白質の移行速度

牛初乳投与後3時間以内でリンパ液中へのIgGの移行速度は速やかに最大($4.7 \pm 1.3 \text{ mg} / 15 \text{ min} / \text{kg}$ 体重)に達し、その後5時間まで変動が見られた。SPの移行速度はゆっくりと増加し、投与後5時間目で最大に達した($1.0 \pm 0.3 \text{ mg} / 15 \text{ min} / \text{kg}$ 体重)。カゼインの移行速度は、IgGやSPよりも著しく遅かった。また、リンパ液への移行速度に大きな変動が見られないカゼインの移行速度を基に、15分間でリンパ液中に移行してくるIgG：カゼイン比と初乳中のIgG：カゼイン比を比較すると、投与後3～6時間のリンパ液中には、IgGが著しく高い比率($p < 0.01$ 及び 0.05)で移行してきていることが明らかになった。また、SP：カゼイン比についても同様な比較を行ったがIgG：カゼイン比で見られたような著しく高い値は見られなかった。

3) 血漿中に移行した牛初乳蛋白質濃度の変化

血漿中のIgG濃度は、牛初乳投与後徐々に増加し、投与後5時間目で平坦値($2.5 \pm 0.9 \text{ g} / \text{L}$)に達した。また、SP濃度は投与後3時間目で平坦値($0.2 \pm 0.08 \text{ g} / \text{L}$)に達した。カゼイン濃度はゆっくりと増加し、投与後4時間目で平均値($0.01 \pm 0.001 \text{ g} / \text{L}$)に達した。投与後4時間目でのIgG濃度は、カゼイン濃度の128倍であり、SP濃度に比較しても11倍も高かった。

投与後6時間まで直線的に増加するカゼインを基に、投与した初乳中のIgG：SP：カゼインの濃度比を算出すると15：4：1であった。一方、血漿中の濃度比を算出すると、IgG：カゼイン比は牛初乳のそれよりも著しく高く($p < 0.05$)、SP：カゼイン比は投与後4、5、6時間で牛初乳中のそれよりも有意に高かった($p < 0.01$)。

以上の結果から、1) 未哺乳新生豚の消化管から移行する牛初乳IgGの移行速度は、リンパ液を介した系が血液を介した系よりもかなり速い、2) リンパ液及び血液中に吸収されたIgG濃度は、3つの初乳蛋白質最も高く、両液中のIgG：カゼイン比は初乳中のIgG：カゼイン比よりも有意に高い。3) 血液を介した初乳蛋白質(IgG, SP, カゼイン)総量は、リンパ液を介して移行した初乳蛋白質総量よりも多い、ことが明らかになった。

このことは、非選択的だと考えられてきた新生豚の消化管からの受動免疫機構にもIgGに対

する選択性があることを示唆するものであり、低 γ -グロブリン血症で生まれてくる豚にとって合目的であると思われる。また、仔牛では確認されていなかった消化管からの高分子物質の新たな移行経路が確認されたことは、比較生理学的にみて非常に興味深いものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 富 夫

副 査 教 授 波 岡 茂 郎

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 助 教 授 原 田 悦 守

脊椎動物の新生子は、母親から免疫グロブリン(IgG)を受け取って、抗病性を獲得している。母体から新生子への抗体の移行には4型が知られているが、Ⅱ型に属する牛や豚では、抗体は母体から胎仔期に移行せず、低 γ -グロブリン血症の状態で生まれてくるため、新生期に初乳を摂取し、消化管から初乳中のIgGを吸収することが生理的に大きな意義を有する。

本研究においては、新生仔豚の消化管からの牛初乳蛋白質の移行特性を明らかにするために、胸管リンパ液と血液を同時採取する実験系を確立し、高感度免疫酵素抗体法の改良を行った。これらの方法を用いて、未哺乳新生豚の消化管内に投与した牛初乳蛋白質(IgG, small proteins およびカゼイン)がリンパ液と血液中に移行する経過を測定し、次の結論を得た。

1) 未哺乳新生豚の消化管から移行する牛初乳IgGの移行速度は、リンパ液を介した系が血液を介した系よりもかなり速い。

2) リンパ液および血液中に吸収されたIgG濃度は、3つの初乳蛋白質中最も高く、両液中のIgG:カゼイン比は初乳中IgG:カゼイン比よりも有意に高い。

3) 血液を介して移行した各初乳蛋白質の総量は、リンパ液を介して移行した初乳蛋白質総量よりも多い。

新生豚の消化管からの高分子物質の移行が非選択的である従来の考えの背景には、消化管からの高分子物質の移行の選択性を論ずる際の定義が研究者の間で一致していなかったことが大きく関わっていると申請者は考察している。申請者は、高分子物質の選択性は定量的に比較されるべきだという立場に立ち、多数の成分の混合物である初乳を新生豚の消化管に投与する方法を採用

し、蛋白質成分の移行量を比較する手法を取った。

本研究の結果は、新生豚の消化管からの受動免疫機構にも IgG に対する選択性があることを示唆するものである。低 γ グロブリン血症で生まれてくる豚において、この特性は特に重要な機構である。また、仔牛では確認されていなかった消化管からの高分子物質の新たな移行経路、すなわちリンパ液を介さずに直接血漿へ移行する経路が確認されたことは、比較生理学的にみても価値のある所見である。審査員一同は、申請者桐山洋子氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。