

## 新生児における感染防御能に関して：特に母乳との関連において

山崎美恵子\* 佐藤 厚† 池田 智美† 小倉久美子†  
石黒 成人‡ 長谷川俊水¶ 吉川 清志■ 三木 鈴§

\* 高知女子大学家政学部看護学科

† 高知女子大学家政学部食物栄養学科

‡ 石黒小児科(土佐市)(現高知女子大学非常勤講師)

¶ 高知県立中央病院産婦人科(現高知女子大学併任教授)

■ 高知県立中央病院小児科(現高知女子大学併任教授)

§ 国立高知病院産婦人科

key words: 母乳, ラクトフェリン, 未熟児

(平成9年5月27日受理)

### INTRODUCTION

わが国における新生児死亡率は近年著しく減少している。しかしながら、新生児は成人に比べ感染症により死に至る場合が多い。特に本県(高知県)は新生児の死亡率では宮崎県、沖縄県に次いで全国ワースト3位である。かつその死因は、出産時外傷、先天異常を除くと、肺炎および気管支炎や敗血症などの感染症に起因するものが多い。

1994年度の統計<sup>(1)</sup>によれば、新生児(生後28日未満)の都道府県別死亡率(mortality rate per 1,000 live births)は高い順に宮崎県(3.8)、沖縄県(3.2)、高知県(3.1)の順である。

これに関してはいくつかの理由が考えられる。1)平成7年度の国勢調査によれば、これらの県では他県に比べ母親の就労率が高く、このことによって母体管理(育児休業、就業期間および母親の育児知識等)に問題が生じ、胎児発育、あるいは出産に異常が生じやすいと考えられる<sup>(2)</sup>。しかしながら、母体管理の程度を推測することはさまざまな理由により困難である。2)また、母乳育児の割合もこれらの県においては低いことが示唆されている。そこで今回、我々は母体の栄養状態を反映すると考えられる母乳に注目し、出産後の母乳中に含まれるタンパク質・脂質の量および質的な変化を経日的に検討することを試みた。

### MATERIALS AND METHODS

#### 検体

高知県下のC病院およびK病院において、満期産(妊娠37週以上42週未満の出産)および早期産(妊娠24週以降から37週未満の出産)の授乳婦より、出産後3日目(n=30検体)、5日目(n=36検体)および成熟乳である30日目(n=25検体)の各時点で母乳採取を行った。出産後3日目、5日目の母乳は、各病院の日勤帯である午前11時に採取を行った。母乳が出始めてから、ディスプレイのスピッツに約10mlをとり、穏やかに攪拌し小試験管に分注後、-75°Cで冷凍保存し、同一サンプルの融解冷凍の繰り返しを避けた。早期産の場合には、母乳の採取量は約5mlとした。採取期間中に採取できた早期産母乳は1検体のみである。30日目母乳は、母親の1ヵ月検診時に採取を行なった。なお、採取期間は平成8年10月1日~11月30日の2ヵ月間である。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法に準じた<sup>(3)</sup>。ゲルは 4%–20% (C=2.6%) 濃度勾配のスラブ型ポリアクリルアミドゲル(1mm厚, 10cm×10cm)を用い, 0.1% SDS を含む0.025M トリス–0.192M グリシン緩衝液, pH8.8を用いて, 母乳タンパク質をその分子量の差にしたがって分離展開を行なった。泳動終了後, 2.5%の Coomassie Brilliant Blue R250でタンパク質染色を行なった。泳動条件はゲル1枚あたり30mAの定電流で40分である。

#### タンパク質定量

出産後3日目, 5日目, 30日目の母乳中のタンパク質含量は Lowry の方法にしたがって定量を行なった<sup>(4)</sup>。検量線作成のスタンダードタンパク質は, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin)を用いた。

#### 脂質の抽出と定量

母乳中の脂質は Folch らの方法にしたがって抽出を行なった<sup>(5)</sup>。クロロホルム–メタノール (2:1, v/v) 溶液75mlを加え攪拌分散させ24時間放置後ろ過 (東洋ろ紙No.2)した。

得られたろ液に対して (クロロホルム–メタノール–水) が最終比 (8:4:3, v/v) になるように蒸留水を加え, よく攪拌した後24時間室温に放置し2層に分離を行なった。下層のクロロホルム層を注意深く採取し, ロータリーエバポレーター (30°C–35°C)で濃縮後窒素ガスで乾固させ, 試料の重量が一定 ( $\pm 0.05\text{mg}$ )になるまで繰り返し, その秤量値を総脂質量とした。

#### 二次元 HPTLC クロマトグラフィー

母乳脂質をクロロホルム–メタノール (1:1, v/v) になるように調整し, 脂質量として200 $\mu\text{g}$ を TLC プレート (10cm×20cm, Silica gel 60/Kieselguhr F<sub>254</sub>, MERCK KGaA)にアプライした。展開溶媒は一次元の展開に, クロロホルム–メタノール–酢酸–ギ酸–水 (35:15:6:2:1, v/v)を, 二次元目の展開にはヘキサン–エチルアルコール–酢酸 (70:30:1, v/v)を用いた。標準試料としては, トリグリセリド, ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリン, オレイン酸の純度の高い市販品を用いた。展開後, 酢酸銅溶液 (3%酢酸銅・8%リン酸)を用いて分離された脂質スポットの発色を行った。

#### 母乳タンパク質の塩酸に対する感受性

出産後3日目, 5日目, 30日目の母乳0.05mlに等量の0.1M HClを加え, 30°C, 120分のインキュベーションを行なった。インキュベーション終了後反応を止め, SDS-PAGEを行なった。泳動終了後, タンパク質染色を行い, 塩酸による加水分解 (hydrolysis) の中間産物を検出することによって, 母乳タンパク質の塩酸に対する感受性 (susceptibility) を測定した。母乳タンパク質との比較のためにはヒト血清タンパク質を用いた。

#### 試薬

SDS-PAGE に用いた試薬は, Bio Rad Lab., Hercules, CA より購入した。その他の試薬は全て Sigma Chemical Co., St. louis, MO より購入した。

## RESULTS and Discussion

#### 母乳タンパク質の経日的濃度変化

母乳中の総タンパク質濃度が出産後, 経日的にどのように変化するかのかの検討を行なった。

Table. 1に示したように、出産後3日目、5日目、30日目で各々、 $4.6 \pm 0.5$  g/dl,  $3.0 \pm 0.6$  g/dl,  $1.9 \pm 0.6$  g/dlと経日的に減少した。なお、早期産母乳は検体採取期間中に1例が得られたにすぎないが、そのタンパク質濃度は、出産後3日目、5日目で各々、8.1 g/dl, 2.8 g/dlと、満期出産に比べ高値が得られた。もしも Atkinson らの報告のように早期出産の母親が分泌する母乳タンパク質濃度が高い<sup>(6)</sup>とすると、母乳一定量あたりでは満期出産に比べ、より多くの窒素量を摂取できることになる。この機序は不明であるが、これは低体重児出産に対する生物学的な適応なのかもしれない。

TABLE 1. 母乳タンパク質の経日的変化

出産後日数	タンパク質濃度 (g/dl)
3 日 (n=30)	$4.6 \pm 0.5$
5 日 (n=36)	$3.0 \pm 0.6$
30 日 (n=25)	$1.9 \pm 0.6$

### 出産後の母乳タンパク質の質的变化

母乳タンパク質が産後、質的にどのように変化するかを SDS-PAGE を用いて検討を行った。Fig. 1, Panel A は出産後 (満期産) 3日目の母乳 (10検体) である。Lane. M は分子量

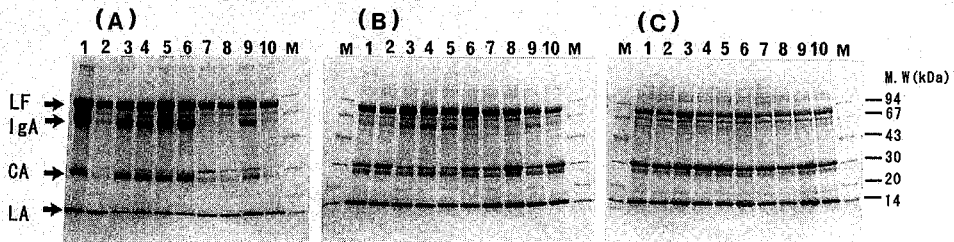


Fig.1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human milk.

マーカー (phosphorylase: 94,000, albumin: 67,000, ovalbumin: 43,000, carbonic anhydrase: 30,000, trypsin inhibitor: 20,100, lysozyme: 14,400) である。矢印で示した母乳の主要タンパク質染色バンドは上からヒトラクトフェリン、ヒトIgA、カゼイン、ヒトラクトアルブミンである。検討を行った3日目の母乳30例で、一定の泳動パターンは認められなかった。Fig. 1のPanel BおよびPanel Cは各々、出産後 (満期産) 5日目 (10検体) と30日目 (10検体) の母乳である。3日目で認められた母乳タンパク質分布パターンの個体差が5日目ではだいぶ小さくなり、30日目の成熟乳ではその差はほとんど認められなかった。

分泌型免疫グロブリンであるIgAは3日目で最も濃く染色され、30日目の成熟乳ではほとんど消失していることが認められた。これについては、新生児期、特に早期における消化管の感染防御能あるいは消化吸収能に、母乳由来のIgAが大きく関与していることを示唆するものである。

やはり母乳の主要タンパク質で、新生児におけるアミノ酸供給源の主役とされているカゼインは、出産後経日的に増加していくことが認められた。

またこれとは逆に、分子量80,000のラクトフェリンは出産後3日目では非常に濃く染色されるバンドとして観察されたが、5日目、30日目では経日的に減少していくことが認められた。

最近、このラクトフェリンは母乳、特に初乳に多く含まれ、IgAなどの免疫抗体とは別に、免疫機構がまだ未熟な新生児を細菌やウイルスなどの感染を防ぐ抗菌作用があることが明らかになっ

た<sup>(7,8)</sup>。このタンパク質は緑のう菌、サルモネラ菌、カンジダなどの種々の病原菌に対しては効果的な殺菌作用をもつが、人体に有用な細菌などには作用しないという非常にユニークな性質を持つことが知られている。

このラクトフェリンタンパク質分子が出産後経日的に減少するということから2つの可能性が考えられる。1)もしも何らかの理由で適切な母体管理が行われなければ、新生児の感染防御機構に必要な不可欠な母乳タンパク質、特にラクトフェリンの産生・分泌量が低下し、新生児がさまざまな感染症にかかりやすくなること。2)たとえ母乳分泌が十分であつたとしても、30才~40才女性の労働率は、全国平均の53.3%に対し、高知県においては、67.9%と全国平均を大きく上回っている(国勢調査)。このような高知県女性の労働環境から、母乳育児の割合が低いことが推測され、必要かつ十分な量の母乳を新生児が摂取できない可能性があることを示唆する。

高知県における高い新生児死亡率はこれらの要因またはこの相乗作用に起因しているのかもしれない。

また、早期出産した母親より、出産直後から経日的に母乳採取を行い、同様の方法を用いて母乳タンパク質の質的变化を検討し、満期出産母乳との比較を検討中である。

#### 母乳タンパク質の塩酸に対する感受性

我々は、母乳が初乳、移行乳、成熟乳と変化するにつれて、新生児の胃酸(HCl)に対する感受性が異なってくるのではないかと考え、出産後3日目、5日目、30日目の母乳タンパク質を *in vitro* でHClとインキュベーションを行った。もしも、胃酸に対する感受性が出産後の日数で異なるのであれば、SDS-PAGEの泳動パターンに違いが生じるはずである。Fig. 2のlane. 1は3日目の

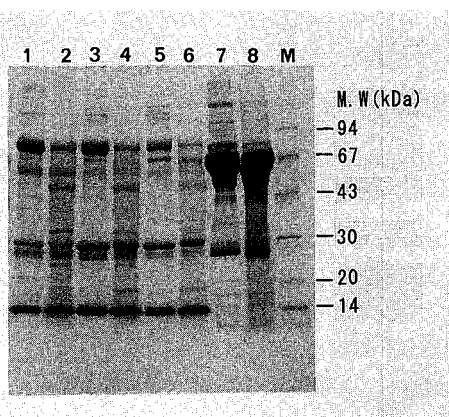


Fig.2. Limited hydrolysis of human milk with HCl.

コントロール母乳, lane. 2はHClを加えた3日目母乳, lane. 3は5日目のコントロール母乳, lane. 4はHClを加えた5日目母乳, lane. 5は30日目のコントロール母乳, lane. 6はHClを加えた30日目母乳, lane. 7はコントロールヒト血清, lane. 8はHClを加えたヒト血清である。図から明らかなように3日目、5日目、30日目母乳で大きな違いは認められなかった。しかし、母乳タンパク質中で特にラクトフェリンが、他の母乳タンパク質に比べ高い感受性を示した。

また、母乳タンパク質とヒト血清タンパク質(Fig. 2, lane. 10)とでHClに対する感受性の比較を行った。両者の泳動パターンを比較してみると、ヒト血清タンパク質に比べ、母乳タンパク質でよりHClによる加水分解を受けやすい傾向が観察された。

このように母乳タンパク質、特にラクトフェリンが塩酸による加水分解を受けやすいことは、新生児期早期においてラクトフェリンが抗菌作用のみならずカゼイン同様、栄養源として消化吸収に利用され得ることを示唆する。いわば、ラクトフェリンは抗菌作用を併せ持つ栄養タンパク質である。

満期出産児の胃壁細胞は比較的良好に発達していることが知られている<sup>(9)</sup>。Agunodら<sup>(10)</sup>は、ヒスタミン類似体であるヒスタログで胃を刺激し、塩酸とペプシンの胃からの分泌能について調べたところ、生後1週間では、単位重量あたりの塩酸およびペプシンの分泌は成人に比べ低いままであることを報告している。しかし、出生時から3週間ほどまでは、胃酸の総分泌量は経日的に増加していく。また、早期出産児の胃液は満期出産児に比べ、pHが高く、食後やヒスタミンで刺激した後の胃酸分泌は満期出産児に比べ早期出産児で低いことなどが報告されている<sup>(11)</sup>。一般に早期出産児は胃におけるタンパク質分解活性も低いとされている<sup>(11)</sup>。これらのことから、早期出産児および満期出産児を出産した母親の母乳タンパク質で塩酸に対する感受性が異なっている可能性が示唆される。

### 母乳総脂質濃度の経日的変化

母乳エネルギーの大部分を占める脂質含量は満期出産の場合、出産後3日目、5日目、さらに成熟乳の30日目と変わるにつれて各々、 $2.2 \pm 1.1$  g/dl (n=30),  $2.6 \pm 1.0$  g/dl (n=36),  $3.3 \pm 1.1$  g/dl (n=25)と増加した (table. 2)。早期産出 (n=1) では3日目、5日目で各々、 $3.5$  g/dl,  $2.4$  g/dlであった。

TABLE 2. 母乳総脂質濃度の経日的変化

出産後日数	総脂質濃度 (g/dl)
3 日 (n=30)	$2.2 \pm 1.1$
5 日 (n=36)	$2.6 \pm 1.0$
30 日 (n=25)	$3.3 \pm 1.1$

### 母乳脂質組成の経日的変化

満期出産母乳の総脂質を二次元 HPTLC を用いて、コレステロールエステル、トリグリセリド、コレステロールとに分離し、総脂質量に対する割合を%で示した (table. 3)。3日目、5日目、30日目のいずれにおいてもトリグリセリドが量的に大きな割合を占めた。

TABLE 3. 母乳脂質組成の経日的変化

出産後日数	%		
	CheE	TG	Che
3 日 (n=30)	12	59	9
5 日 (n=36)	9	61	17
30 日 (n=25)	9	59	5

## CONCLUSION

最近、栄養学、感染症、アレルギー予防および母子健康の立場から新生児・乳児にとって最も

適切かつ安全な栄養法として、母乳栄養が世界的に推奨されている。しかしながら、母乳栄養についてはまだ不明の点が多い。

今回、我々は出産後母乳を経日的に採取し、母乳タンパク質と脂質の量および質的な分析を行った。タンパク質量は出産後3日目 ( $4.6 \pm 0.5$  g/dl), 5日目 ( $3.0 \pm 0.6$  g/dl), 30日目 ( $1.9 \pm 0.6$  g/dl) と経日的に減少した。早期産母乳では1例だけの測定だが、そのタンパク質濃度は、出産後3日目, 5日目で各々, 8.1, 2.8 g/dl と、満期産母乳に比べ高値が得られた。

母乳タンパク質のSDS-PAGEは出産後3日目では、個人差が大きく一定の泳動パターンは認められなかった。しかし、5日目ではその差は、小さくなり、30日目の成熟乳ではほとんど消失した。分泌型免疫グロブリンであるIgAは3日目で最も濃く染色され、30日目の成熟乳ではほとんど消失し、カゼインは出産後、経日的に増加していくことが認められた。ラクトフェリンは出産後3日目では非常に濃く染色されるが、5日目, 30日目では経日的に減少した。

母乳の胃酸(HCl)に対する感受性は3日目, 5日目, 30日目で大きな違いは認められなかった。しかし、ラクトフェリンは他の母乳タンパク質に比べ高い感受性を示した。

母乳中の総脂質含量は満期出産の場合、出産後3日目 ( $2.2 \pm 1.1$  g/dl), 5日目 ( $2.6 \pm 1.0$  g/dl), 成熟乳の30日目 ( $3.3 \pm 1.1$  g/dl) と経日的に増加した。早期産出産では、3日目 ( $3.5$  g/dl), 5日目 ( $2.4$  g/dl) であった。

満期出産母乳の総脂質のコレステロールエステル、トリグリセリド、コレステロールの組成比率は3日目で各々12, 59, 9%, 5日目で各々9, 61, 7%, 30日目で各々9, 59, 5%といずれにおいてもトリグリセリドが量的に半数以上を占めた。

## ACKNOWLEDGMENTS

母乳採取にあたって、快く母乳を提供して下されたお母様に深く感謝いたします。また母乳採取にご協力いただきました2病院の産科病棟・未熟児センター・産科外来の看護婦各位に厚くお礼申し上げます。

本研究は高知女子大学・成田十次郎学長からの研究助成によって行われました。

## REFERENCES

1. 母子保健の主なる統計, 厚生省児童家庭局母子保健課監修 平成7年度刊行, (1995) .
2. 国勢調査 (1995)
3. U. K. LAEMMLI, Change of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage, *Nature*. 227, 680(1970).
4. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, Protein measurement with the folin reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265(1951).
5. J. Folch, M. Less, G. H. SLOANE-STANLEY, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226, 497(1957).
6. S. A. Atkinson, M. H. Bryan and G. H. Anderson, Human milk: differences in nitrogen concentration in milk from mothers of term and premature infants, *J. Pediatr.* 93, 67(1978).
7. KJ. H. Brock, Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection

- against enteric infection in the newborn infant, Arch. Dis. Child. 55, 417(1980).
8. S. E. Balmer and B. A. Wharton, Diet and Faecal Flora in the newborn: iron, Arch. Dis. Child. 66, 1390(1991).
  9. M. A. POLACERIC and E. H. ELLISON, Gastric acid secretion and parietal cell mass in the stomach of newborn infant, Amer. J. Surg. 117, 777(1966).
  10. M. Agunod, N. Yamaguchi, R. Lopez, A. Luhby and G. B. Glass, Correlative study of hydrochloric acid, pepsin and intrinsic factor secretion in newborns and infants, Amer. J. Dig. Dis. 14, 400(1969).
  11. M. D. AMES, Gastric acidity in the first ten days of life of the prematurely born baby, Amer. J. Dis. Child. 100, 122(1966).

### LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human milk.

Fig. 2. Limited hydrolysis of human milk with HCl.