

原 著

唾液中分泌型 IgA の測定条件の検討と 大学生の唾液中 IgA 濃度

竹内優子¹⁾ 渡辺弘子²⁾ 加藤保子²⁾

玉島中央病院栄養部¹⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科²⁾

(平成9年5月21日受理)

An Examination of Procedure for Measuring Secretory IgA in Saliva
and the Relationship Between Allergy and IgA Concentration in
Students

Yuuko TAKEUCHI¹⁾, Hiroko WATANABE²⁾ and Yasuko KATO²⁾

1) *Department of Nutrition, Tamashima Central Hospital
Tamashimachuou-cho, Kurashiki, 713, Japan*

2) *Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-01, Japan
(Accepted May 21, 1997)*

Key words : Saliva, secretory IgA, allergy, change in IgA concentration in a day

Abstract

Saliva samples from 6 subjects were collected hourly from 7:30 to 22:00. The IgA concentrations in the saliva samples were examined by ELISA competitive inhibition using antihuman IgA. The IgA concentrations of 2 subjects changed during the day, but those of the other 4 subjects remained constant. When the mean IgA values of the 6 subjects was compared, the highest value was 10 times higher than the lowest.

In another experiment, saliva samples were collected from 48 second year and 44 fourth year students at Kawasaki University of Medical Welfare. The mean IgA values of the salivas of the second and fourth year students were 0.107 ± 0.019 mg/ml and 0.107 ± 0.024 mg/ml, respectively.

A questionnaire pertaining to allergies was sent to 101 students. 40.6 % of the students were allergic. Pollen and rat mites were suggested of being the major causes of allergy in 28.7 % and 21.9 % of the allergic students, respectively. There was no difference in IgA

concentrations between allergic and no-allergic students.

要 約

6人の被験者から唾液を1時間おきに7:30~22:00の間採取して唾液中IgA濃度の1日の変動を競争阻害ELISA法で測定した。6人中2人の唾液中IgA濃度の日動変化は大きかったが、他の4人のIgA濃度は1日ほぼ安定していた。1日の平均IgA濃度が最も高い人と最も低い人で10倍近い開きがあり、個人差が大きかった。また、唾液中IgA濃度は朝夕より昼間部でより安定したものとなった。川崎医療福祉大学2年生48人および4年生44人から昼間部に一斉に唾液を採取して唾液中IgA濃度を測定した。2年生の平均IgA濃度は 0.107 ± 0.019 mg/ml、4年生の平均IgA濃度は 0.107 ± 0.024 mg/mlであった。101名を対象としてアレルギーに関するアンケートを行った。このうちアレルギー罹患者の割合は40.6%であった。アレルギーの主な原因としては、花粉(28.7%)、イエダニ(21.9%)があげられた。アレルギーの有無による唾液中IgA濃度の違いを調べたが、有意差は認められなかった。

緒 言

最近、運動負荷試験と免疫力との関係を知る指標¹⁾やストレスの生体防御系への影響をみる指標²⁾として、唾液中分泌型IgAが用いられ、免疫指標を直接評価する新たな試みが報告されてきている。免疫指標のうち、分泌型IgAを用いる方法は対象者に苦痛を与えない、血液採取のように医師などの資格を必要としない等の理由から利用しやすい方法とされる。また、低栄養状態では涙、唾液中の分泌物中のIgAやアルブミンの濃度は低下しないものの分泌型IgAの低下がみられる³⁾と言う。このように分泌型IgAは、運動、ストレス、低栄養など体調を測定する指標の一つとしても利用されてきている。

一方、経口的に投与されたタンパク質の吸収は卵白アルブミンを用いて証明されており、その0.002%が抗原性を保持したまま吸収されると計算された⁴⁾。分泌型IgAは局所免疫の中心となっている。分泌型IgA欠損者においてしばしば経口抗原に対する高い血清中抗体価が認められている⁵⁾。このように分泌型IgAは細菌感染を防ぐばかりではなく、食物アレルギーの予防にも役立っている。食物成分はかなりの大きさのまま消化管粘膜を素通りして体に入り、体内ではそれに対する抗体が産出されることが確認されて、過敏に反応した場合にはアレルギーを引き起こす。

このように唾液中の分泌型IgAは、各種の指標として用いられ始めている。しかし、分泌型IgAの日動変化、個人差、年齢差等基礎的なデータはまだ十分に得られていない。そこで本研究では液性免疫物質の一つであり、唾液中に多量に含まれる分泌型IgAの一日の変化、個体差およびアレルギーとの関係を調べることを目的とした。なお、唾液中IgAの大部分は分泌型であるとみなして実験を行った。

実験材料および実験方法

1 唾液の採取法

被験者は本学学生(20~23歳)および本学職員に協力を依頼した。唾液の摂取方法は、口をすすいだ後、5分間口の中にためた唾液をビニール袋に採取した。採取した唾液から不溶性成分を3000rpm、15分遠心分離して除去したものを試料として用いた。なお、使用時までは冷凍保存した。

分泌型IgAの日動変化を調べるために、7:30~22:30まで1時間間隔で、6人の被験者から上記同様に唾液を採取した。

2 SDS-PAGEおよびimmunoblotting

唾液タンパク質の電気泳動は、12.5%アクリルアミドを用いてLaemmli法⁶⁾の方法に従って行った。ImmunoblottingはTowbinらの方法⁷⁾に従って、電気泳動したゲルの一枚をニトロセルロース膜(0.45 μ m)に転写した。そのセルロー

ス膜を 3 %ウシ血清アルブミン (BSA) を含む Tris buffered saline (TBS) 溶液中, 4℃で一晩インキュベートし, 余分なタンパク質結合部位を飽和した。その後, 1 % BSA を含む TBS 溶液に, ラビット抗ヒト IgA 抗体 (DAKO A/S, Denmark) を 10^{-4} となるように加え, 2 時間室温でインキュベートした。TBST (0.02 % Tween 20/Tris buffered saline) で洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG (goat) (peroxidase-conjugated, goat anti-rabbit immunoglobulins (DAKO A/S, Denmark) および 4-chloro-1-naphthol で免疫染色した。

3 競争阻害 ELISA 法

Human IgA (purified immunoglobulin from colostrum) (Sigma Chemical Company, USA) を抗原として $0.05 \mu\text{g/ml}$ をマイクロプレートの各ウェルに吸着させた。PBST (0.05 % Tween-20 in phosphate buffered saline, pH7.5) 溶液で洗浄した。抗原が吸着していない固相に 1 % BSA を含む PBST 溶液で, 37℃, 30 分間インキュベートし, BSA を吸着させた⁸⁾。一方, 試験管内で唾液と抗ヒト IgA 抗体をインキュベートした。この試験管内の抗ヒト IgA 抗体および唾液混合物を上記プレートの各ウェルに加え, 4℃で一晩インキュベートして, 唾液中の IgA と反応しないで残った抗ヒト IgA 抗体とプレート上の IgA と反応させ, ついで二次抗体 (peroxidase-conjugated, goat anti rabbit immunoglobulins) (DAKO) を 37℃ 1 時間インキュベートした。合成基質である o-phenylenediamine (和光純薬工業) を加えて発色させ, 492nm の吸光度を測定した。唾液中 IgA 濃度は, 10 倍ずつ段階希釈した基準 IgA の 50 % 阻害の濃度から, 各試料に含まれる IgA 量を算出した。

4 唾液 pH の測定

採取した唾液の pH は, pH メーター (HORIBA) を用いての測定した。

5 調査方法

川崎医療福祉大学の学生 (101 名) を対象として, アレルギーの有無, アレルギーの種類, アレルギーの原因, 家族のアレルギーとその種類等, 7 項目について調査を行った。調査方法は

記述式で行った。調査結果集計システム (CROS-TAT, 東洋情報システム) を用いて処理した。唾液中 IgA 濃度の測定値も同時に集計処理した。

実験結果および考察

1 免疫化学的手法による唾液中の IgA の検出および定量

唾液中のタンパク質を SDS-PAGE で分画したパターンと, 抗ヒト IgA 抗体を用いて免疫染色した代表的なパターンを図-1 に示した。SDS-PAGE パターンから唾液中には種々のタンパク質が含まれるが, 抗ヒト IgA を用いた immunoblotting によって, 唾液中の多種類のタンパク質

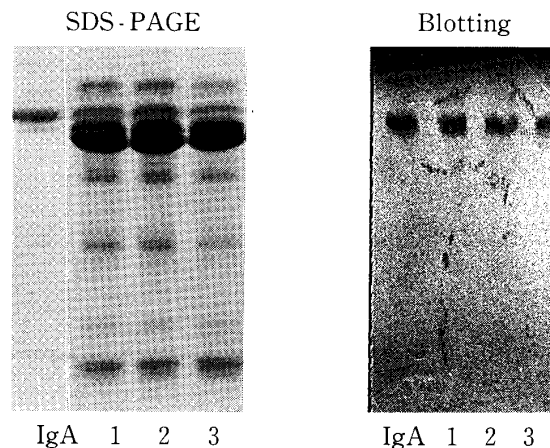


図-1 代表的な唾液タンパク質の SDS-PAGE パターンと Immunoblotting
1, 2, 3 : 唾液 samples

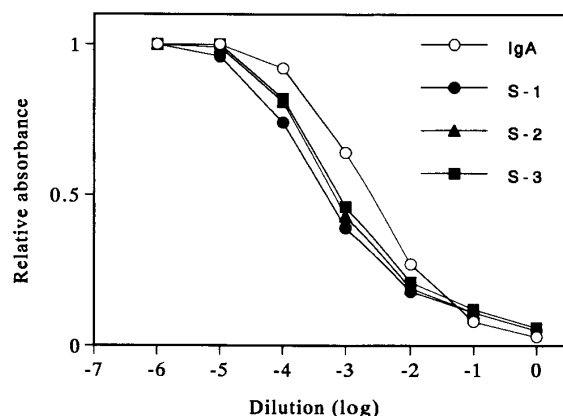
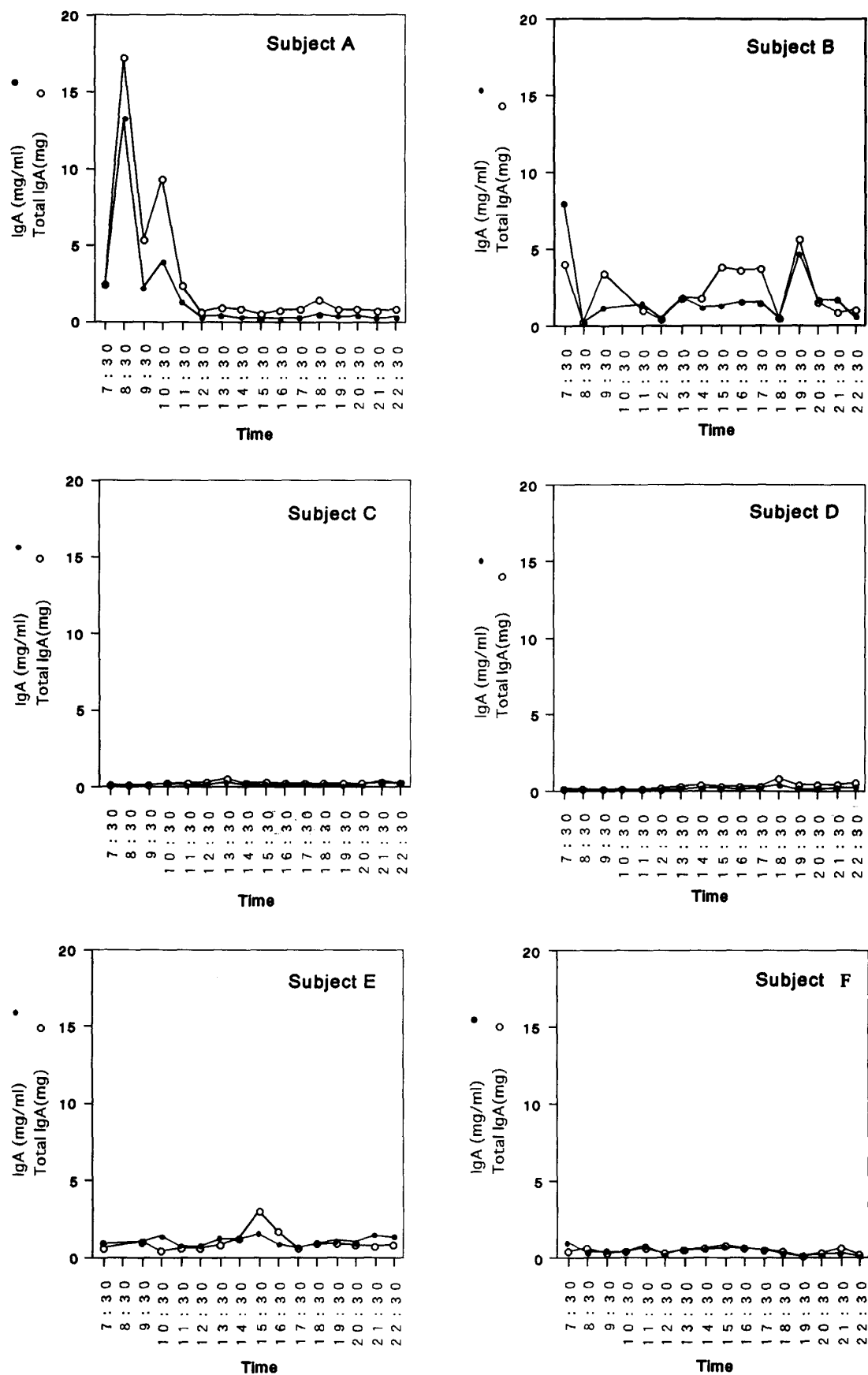


図-2 競争阻害 ELISA による唾液中分泌型 IgA の測定
S-1, S-2, S-3 : 唾液 samples



図—3 被検者6名の唾液中IgA濃度と5分間の総IgA量の1日の変化

のうちから IgA を検出できることを確認した。分泌型 IgA の定量は、初乳中に大量に含まれる分泌型 IgA を基準として用いた競争阻害 ELISA 法で定量した。定量の代表例を図-2に示した。50%阻害率の希釈度を基に、唾液中の IgA 濃度を基準とした IgA から求めた。唾液中に含まれる分泌型 IgA 濃度を得ることができたので唾液中に含まれる IgA 濃度の日動変化を調べた。

2 唾液中 IgA 量の1日の変化

1日の唾液中分泌型 IgA の変化を知るために、7:30~22:30の間、1時間おきに大学生4人および本学職員2人の計6人(20~34歳)から唾液を採取し、その IgA 濃度を競争阻害 ELISA 法で求めた。なお IgA 総量は1回の唾液量から求めた。被験者6人それぞれの IgA 濃度と1回の IgA 総量の日動変化を図-3に示した。被験者C、D、EおよびFの IgA 濃度は、1日中大きな変化は示さなかったが、被験者AとBは1日の IgA 濃度の変動が見られた。特に、被験者Aの午前8時30分に採取した唾液中 IgA 濃度は、13.2mg/mlと1日の平均 IgA 濃度1.63mg/mlの10倍近く高かった。5分間に分泌する唾液全量中の IgA 量ともに変動が大きく、その上分泌量も高かった。しかし、午後の IgA 濃度は安定

したものとなった。被験者Bでは、唾液1ml中に含まれる IgA 濃度が朝と夜に高く、唾液全量中に含まれる IgA 量は1日を通して大きく変動した。変動の少なかった被験者Eの唾液中 IgA 濃度の変動は、最大濃度は0.37mg/ml、最小濃度は0.07mg/mlであって約5.3倍濃度差があった。IgA 総量は IgA 濃度とほぼ対応した値となった。唾液中の IgA 濃度は個々人で1日中一定した値を示すものではなく、変動するものであって、その変動幅も個人によって異なった。

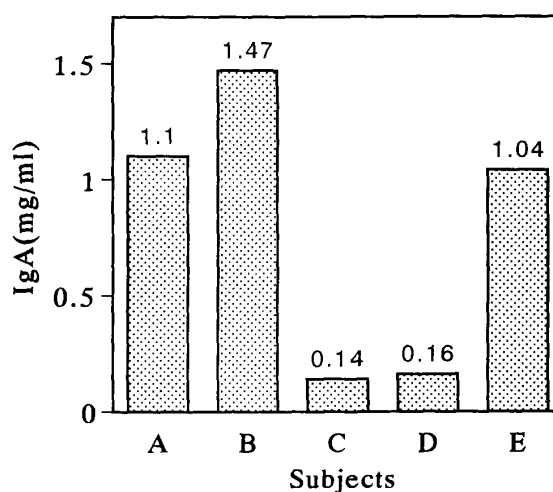


図-4 被検者6名の平均 IgA 濃度の比較

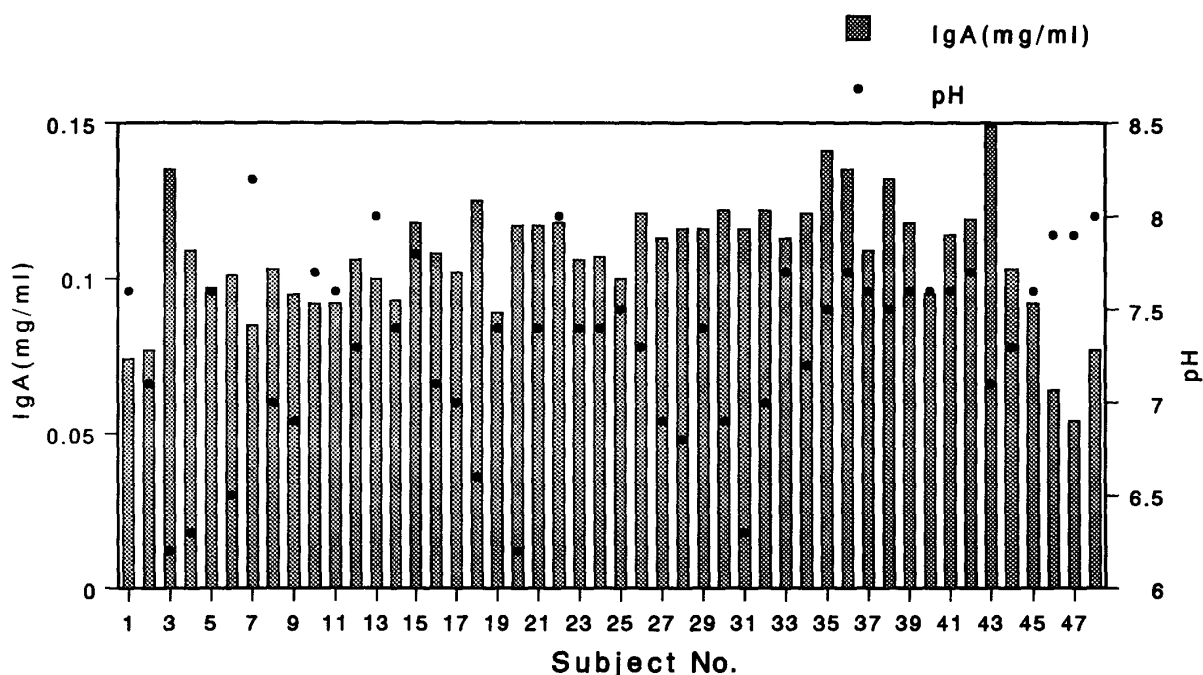


図-5 大学2年生48人の唾液中 IgA 濃度と pH

唾液中 IgA 濃度の 1 日の平均値を 6 人の被験者で比較した(図-4). 最も高い唾液 1 ml 中の IgA 濃度を示した人と最も低い値を示した人では約 10 倍の開きがあった.

以上のように 6 人の被験者の唾液中 IgA 含量は, 1 日の平均値では大きな差があった. しかし, 昼間時に採取した唾液中の IgA 濃度は安定した値を示し得ることができた. そこで, 大学生 92 人を対象として一斉に唾液を採取し, その IgA 濃度を測定した.

3 大学生の唾液中 IgA 濃度および唾液の pH

川崎医療福祉大学 2 年生の 48 人から 95 年 2 月昼食前の 11:00 ~ 12:00 に一斉に唾液を採取した. 唾液中に含まれる分泌型 IgA 量を競争阻害 ELISA 法で定量した結果と, 唾液の pH を測した

結果を合わせて図-5 に示した. また, 4 年生 44 人から 95 年 1 月 15:00 前後に一斉に採取した唾液を試料として, 同様に測定した結果を図-6 に示した. これらの測定結果の IgA 濃度および pH の平均値, 最大値, 最小値を比較したものを表 1 にまとめた. 大学生 48 人の 1 ml 中に含まれる IgA 濃度の平均値は, 0.107 mg/ml であった. 48 人のうち 3 人が平均値から ± 0.04 mg/ml 以上離れた値を示した. 大学 4 年生の IgA 濃度の平均値は 0.092 mg/ml であった. 44 人のうち 2 人が平均値から ± 0.04 mg/ml 以上離れた値を示した. その他の 4 年生 42 人は, ほぼ平均値前後の値を得ることができた. IgA 濃度の最も多い人と, 少ない人とを比較してみると, 2 年生の唾液では約 3 倍, 4 年生の唾液では約 8 倍の開

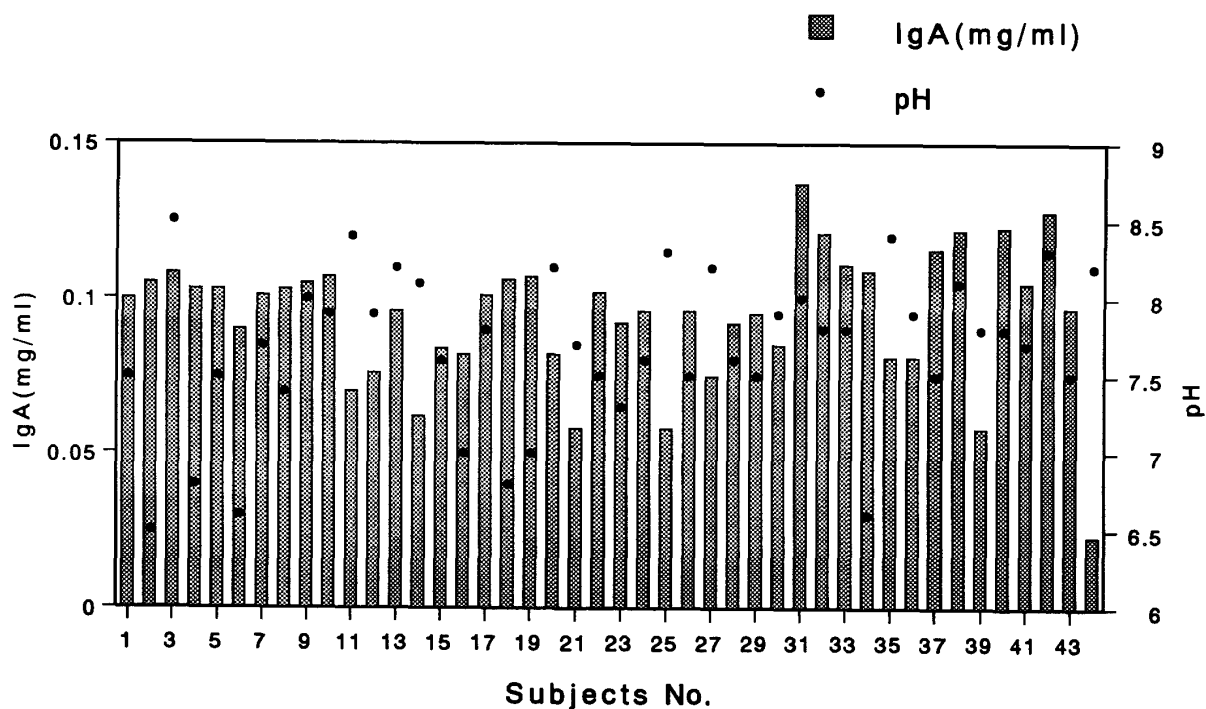


図-6 大学 2 年生 48 人の唾液中 IgA 濃度と pH

表 1 大学 2 年生および 4 年生の唾液中 IgA 濃度と pH

	人 数	IgA (mg/ml)				pH			
		平 均	標 準 偏 差	最 大 値	最 小 値	平 均	標 準 偏 差	最 大 値	最 小 値
2 年 生	48	0.107	0.019	0.149	0.054	7.3	0.489	8.2	6.2
4 年 生	44	0.092	0.024	0.137	0.012	7.7	0.507	8.5	6.5

きがあった。2年生と4年生の唾液中平均IgA濃度は、ほぼ同じ値を示した。唾液のpHの大学2年生の平均値は7.2であったが、最大値は8.2、最小値は6.2、標準偏差 ± 0.5 と人によって唾液のpHは大きく異なった。また、大学4年生の唾液のpHも平均値は2年生とほぼ同じ値の7.7を示したが最大値8.5、最小値6.5、標準偏差 ± 0.5 と大きな差が認められた。またIgA濃度とpH値との間には全く関係は認められなかった。

4 アレルギーの有無と唾液中 IgA 濃度

分泌型IgAは、細菌や各種の微生物等の抗原成分に対してその抗原活性が証明されており、

表2 アレルギーに関する調査結果

設 問		回答数 (%)
アレルギーの有無 (n=101)	ある	41 (40.6%)
	ない	60 (59.4%)
アレルギー症状 (n=41, 複数回答)	アレルギー性鼻炎	21 (51.2%)
	気管支喘息	3 (7.3%)
	アトピー性皮膚炎	17 (41.5%)
	アレルギー性結膜炎	7 (17.1%)
	その他	7 (17.1%)
アレルギーの原因 (n=41, 複数回答)	食べ物	3 (7.3%)
	イエダニ	7 (17.1%)
	花粉	9 (22.0%)
	薬物	0 (0%)
	寒冷・温熱	5 (12.2%)
	その他	11 (26.8%)
家族のアレルギー (n=101)	いる	32 (31.7%)
	いない	68 (67.3%)
	無回答	1 (1.0%)
アレルギーの家族 (n=32, 複数回答)	父親	6 (18.8%)
	母親	13 (40.6%)
	兄弟	19 (59.4%)
	祖父母	0 (0%)
家族の症状 (n=32, 複数回答)	アレルギー性鼻炎	17 (53.1%)
	気管支喘息	2 (6.3%)
	アトピー性皮膚炎	9 (28.1%)
	アレルギー性結膜炎	0 (0%)
	その他	4 (12.5%)

また、高い凝集活性によって種々のタンパク質と非特異的に結合して複合体を形成して粘膜内への抗原タンパク質の取り込みを防ぎ、生体感作を阻止する働きを持つとされている。さらに、抗原が腸管に達すると腸から離れた粘膜の分泌物、涙、唾液等から分泌型のIgA抗体が産生されることが知られている。そこで、分泌型IgA濃度とアレルギーの関係を検討するために、唾液提供者(101人：大学2, 4年生92人および3年生9人)にアレルギーに関するアンケートを行い、その回答の集計結果を表2にまとめた。大学生でアレルギーのある人は、41人(40.6%)と高いアレルギー罹病率であった。アレルギーの種類として、アレルギー性鼻炎21人(38.2%)、アトピー性皮膚炎17人(30.9%)が、やや高い値を示した。代表的なアレルギーの原因は、花粉9人(28.7%)とイエダニ7人(21.9%)であった。家族のアレルギーは32人(31.7%)で認められ、家族の患者は兄弟19人(50.0%)、母親13人(34.2%)、父親6人(15.8%)であった。家族のアレルギー症状も、アレルギー性鼻炎17人(53.1%)、アトピー性皮膚炎9人(28.1%)が高い割合を示した。

大学生でアレルギー罹病者(アレルギー性鼻炎、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎等)(計41人)の唾液中平均IgA濃度は0.106mg/ml、健常者(計60人)の唾液中平均IgA濃度は0.098mg/mlであった。気管支喘息と食物アレルギーを持つ6歳未満の小児の唾液中IgA濃度は48.3 μ g/ml、食物アレルギーを持たない小児の濃度は96.4 μ g/mlで両アレルギーを持つ小児の場合は、それらを持たない小児と比べると有意差はないものの低値を示し、その傾向は年齢が低いほど顕著であるという報告もあるが⁹⁾、ここで調べた大学生では、アレルギーの有無による唾液中IgA濃度に有意差は認められなかった。

本研究は総合研究テーマ「加齢と老齢」を進めるにあたっての基礎的なデータを得ることを目的としたもので、川崎医療福祉大学から助成をいただいたことを深謝いたします。また、本研究を遂行するにあたってチクバ外科栄養士小野晴美氏に実験の一部を援助いただいたことを感謝いたします。この場を借

りて唾液提供者にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 秋本崇之 (1995) 第50回日本体力医学会大会予稿集. pp227.
- 2) 山田富美雄, 官田 洋 (1995) 分泌型 IgA を用いたストレス反応性の評価. 大阪府立看護大学紀要, **1** (1), 47—50.
- 3) 坂本元子 (1984) 生存を支えるもの — 栄養と免疫 —, 坂本元子, 西岡久寿彌編著, 免疫と栄養, 第一版, 第一出版, 東京, pp15.
- 4) Gruskay FL and Cooke RE (1955) Gastrointestinal avsorption of unaltered protein in normal infants and in infants recovering from diarrhea. *Pediatrics*, **16**, 763—769.
- 5) Taylor B, Norman AP, Orgel HA, Stokes CR, Turner MW and Soothill JF (1973) Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy. *Lancet*, **2**, 111—113.
- 6) Laemmli VK (1970) Cleavageof structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London), **227**, 680—685.
- 7) Towbin H, Steehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **76**, 4350—4354.
- 8) Engvall E and Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assafy of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871—874.
- 9) 山口公一, 向山徳子, 馬場 実 (1985) 気管支喘息小児における唾液中分泌型 IgA の検討. アレルギー, **34** (4), 234—238.