

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08217

研究課題名(和文) 極低出生体重児に対する経母乳ヒトサイトメガロウイルス感染症対策

研究課題名(英文) Strategy for prevention of Cytomegalovirus infection via breast milk in very low birth weight infants

研究代表者

水野 克己 (Mizuno, Katsumi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80241032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cytomegalovirus(CMV)IgG陽性母体では、児に経母乳CMV感染が成立しうる。CMV IgG陽性母体の母乳(CMV母乳)の対策として、電子レンジ処理(MW)に着目した。CMVを添加した人工乳でMWを行った結果500W 40秒により細胞感染を防げた。また、母乳100mlを500W40秒MW後、母乳成分変化はなかった。臨床研究はCOVID19の為行なえていないが、母乳量に関わらず一定の温度変化を得る方法を検討した。25ml袋にいれた母乳を75mlの水に入れることで100ml母乳と同様の温度変化となった。CMV母乳100mlの200W/500W 60秒MWにより細胞感染率は低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超早産児において母乳は、単なる栄養ではなく薬としての効果もあるため、母乳育児が推奨される。一方、母親がCMV IgG陽性の場合、超早産児の6-37%で経母乳CMV感染が成立し、敗血症性ショックや肝機能障害を起こしうる。そのため、CMV IgG陽性母体の母乳に対して感染対策が検討されてきた。代表は62.5 30分の低温殺菌であるが、日本で低温殺菌器は一般的ではない。どのNICUでも利用できる電子レンジを今回用いた。児の母乳量に関わらず一定の温度変化を得る方法が確立されたこと、500W20秒であれば母乳成分のロスはなく、かつ、有意に細胞感染を抑制できることから、広く臨床応用できる方法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In preterm infants, human milk(HM) is the best, but if the mother is CMV IgG(+), CMV infection can occur via HM, leading to hepatic dysfunction. Consequently, preventive measures have been considered for HM from CMV IgG(+) mothers. Holder pasteurization(HP) is standard method, but uncommon in Japan, therefore we considered microwave treatment(MT) as a candidate. CMV added into formula resulted in no cell infection after MT at 500W, 40s. Additionally, HM components in 100ml HM was not changed after MT 500W, 40s, thus posing no disadvantage to infants. Clinical studies were supposed to conduct, but due to COVID-19 pandemic, hindering the realization of these studies. Therefore, we kept in vitro experiment. In order to achieve a consistent temperature change (TC) regardless HM volume, we put HM in a 25ml bag and immersing it in 75ml of water provided a equivalent TC to 100ml HM. MT at 200W/500W 60s resulted in prevention of cell infection by HM from CMV IgG(+) mothers significantly.

研究分野：新生児医学

キーワード：サイトメガロウイルス 電子レンジ 低温殺菌 分泌型IgA抗体 ラクトフェリン 超早産児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電子レンジ使用による経母乳サイトメガロウイルス (CMV) 感染予防について基礎研究を行ってきた。経母乳 CMV 感染対策のゴールドスタンダードは 62.5 30 分の低温殺菌処理であるが、この処理はどの施設でもできるわけではない。一方、電子レンジはどの施設でも利用できるため、有益な研究であると考えていた。

本研究は以下の 3 段階からなる：

- 1) 母乳量にかかわらず電子レンジ処理により一定の温度変化が得られるための研究
- 2) CMV IgG 陽性母体から得られた母乳による細胞感染実験

2. 研究の目的

1) 母乳量にかかわらず電子レンジ処理により一定の温度変化が得られるための研究

目的：これまでの報告において、Microwave (MW) 処理後の温度 (平均値)：30mL 入り：83℃、50mL 入り：62℃、100mL 入り：54℃であり、同じ MW 設定でも量が少ないほど温度が上昇することがわかっている (1)。NICU 入院中の児に使う母乳量は児の体重や生後日齢によってもばらつきがある。たとえば、一回量が 5ml で 1 日 8 回与えている場合などは母乳 100ml を電子レンジ処理すると 60ml が無駄になってしまう。このことから、実臨床に応用する前段階として、100ml 未満でも同じ温度変化が得られる方法を検討した (2)。

2) CMV IgG 陽性母体から得られた母乳による細胞感染実験

目的：我々は以前、母乳中の生理活性物質 (感染防御因子となるタンパク質や栄養分) には電子レンジ加温で有意な減少がなかったことを報告した。これら母乳中の生理活性物質は、壊死性腸炎など疾患予防に関係するとされており、そうした児に重要な物質に影響を与えることなく簡便に加温する方法の確立が今後求められる。電子レンジ処理は CMV 感染症予防に有用な可能性があり、低条件による電子レンジ処理についても検討が必要と考えられた。そこで、CMV IgG 陽性の母親からの母乳を得て、同様に低条件での電子レンジ処理も加えて細胞感染性を検討した。以前におこなった細胞実験は人工乳に CMV を混ぜたものであったため、もともと母乳に含まれている CMV で検討した (3)。

方法：2020 年 10 月～2021 年 2 月に出産し、産後 3～9 週目で提供された計 6 名の母親からの母乳を使用した。使用した母乳は、ドナーミルクとしては不採用となったものであり、本研究の使用許可を得て、倫理委員会承認のうえで行った。凍結保存された母乳を冷蔵庫で一晩かけて自然解凍し、よく攪拌して加温した。使用した電子レンジはツインバード社製 DR-D269 と DR-D278D である。温度計は安立計器株式会社；蛍光式光ファイバー温度計 FL-2400 (測定範囲 -195.0～450.0℃、分解能 0.1℃) を用いた。加温中の温度をモニターするため、電子レンジ内部にファイバーを通すための穴を上部に作成し、その穴にファイバーを通して測定した。

3. 研究の方法

1) 母乳量にかかわらず電子レンジ処理により一定の温度変化が得られるための研究

実験 1. 素材および容積の異なる 6 つの容器に、100ml ずつ同じ母親からの検体を入れ、600W で 60 秒加温。加温後の表面および底面温度を測定した。

実験 2. 500W で 60 秒加温して温度に異常高値が生じないかを調べるため、同じ容器中の 9 ポイントでの加温中の温度変化を測定した。

実験 3. 異なる母親からの検体での温度変化をみるため、計 5 人の検体を 500W で 60 秒加温し、実験 1 の方法で温度を測定した。

実験 4. 小袋の母乳 20ml を 500W で 60 秒電子レンジ加温した際の温度変化を測定した。

A) ポリプロピレン製の小袋を使用し 500W で 60 秒加温した際の小袋内外の温度変化を調べるため、以下 3 パターン測定した。

母乳 100ml を容器に入れ、加温中の温度変化を測定 (コントロール)

小袋に母乳 20ml を入れ、母乳 80ml を入れた容器にその小袋を入れて計 100ml とし、小袋内外での温度変化を測定

小袋に母乳 20ml を入れ、冷蔵庫保存した水道水 80ml を入れた容器にその小袋を入れて計 100ml とし、小袋内外での温度変化を測定

B)実験 4A-C の方法で、小袋中の母乳を計 5 人の検体を使用し測定した。

統計解析 すべて R ソフトウェアを用い、p 値 0.05 未満で有意差ありと判定した。

2) CMV Ig 陽性母体から得られた母乳による細胞感染実験

CMV Ig 陽性であることがわかっている 27 人の母親 (平均 32.1 歳、29~41 歳) から得られた母乳を使用した。母乳は出産後 6~16 週間に搾乳されたものである (中央値は 9 週間)。この母乳は使用前に冷凍保存され、1~3 か月間保存されたものである。母乳は実験前に、冷蔵庫で一晩かけて冷蔵解凍され、よく混和したのちに電子レンジ処理を行った。ツインバード社製 DR-D278D を用いて母乳の加熱処理を行ったのちに母乳は細胞実験までの間、20℃ で冷凍保存した。

実験 1: 160ml ガラス容器に 100ml の母乳を入れて 200W または 500W で 60 秒間電子レンジ処理を行った。**実験 2:** 160ml ガラス容器に 50ml または 100ml の母乳をいれて 500W で 60 秒間電子レンジ処理を行った。**HCMV-DNA コピー数測定:** 母乳中の HCMV-DNA コピー数測定: QIAamp DNA mini kit を用いて DNA を抽出し、リアルタイム PCR を Roche Diagnostics 社製 LightCycler 480 を用いて行った。

CMV 細胞感染実験 CMV 感染性は、50%細胞感染価 (TCID₅₀) 算出法によりウイルス感染価を何%減少させられるかで検討した。HFL-III 細胞は、DMEM/Ham's F-12 培地に 15%の胎児牛血清を添加して増殖させた。細胞は、5%CO₂ 下で 37℃ 培養器内で維持した。母乳は、8000 g5 分間遠心分離し、上清液を集めてウイルス感染価を決定するために用いた。遠心分離後の母乳の上清液 0.1 mL を感受性細胞層に塗布し、ウイルスが細胞に付着するために 90 分間培養されました。14 日間の培養後、TCID₅₀/mL を測定し、CMV 感染性価を定量化した。

4. 研究成果

1) 母乳量にかかわらず電子レンジ処理により一定の温度変化が得られるための研究

1. 異なる素材、容積のボトルでの表面および底面での温度変化

表面での温度変化は容器により有意差を認めたと (p=0.014)、底面での温度変化には容器による有意差はなかった (p=0.27)。平均値は表面で 48.4℃、底面で 42.9℃ であり統計学的な有意差があったが (p<0.001)、その実際の温度差は 5.5℃ であり、臨床的に大きな問題には結び付かないと考えられる。以降の実験では、この実験 1 で最も温度差が小さかったボトル D (ポリフェニルスルホン製、160ml) を使用した。

2. 容器内 9 点での加温前後の温度変化

さらに容器内の温度むらを調べるため、9 か所での温度測定を行った。

結果: 容器内での温度変化に異常な温度上昇があるかについて検討した結果、すべての点で外れ値を認めなかった (p=0.25)。電子レンジによる母乳加温には温度上昇にばらつきはあるものの、異常な値とはならないことがわかった。

3. 異なる母親からの母乳における電子レンジ処理開始から終了までの温度変化

異なる母親からの母乳で温度上昇に差があるかについて検討した結果を表に示す。加温後の温度変化に、検体間で有意差はなかった (p=0.48)。つまり、母乳であればある程度一定の温度変化が得られることが示された。

4. 小袋を使用した加温

つぎに少量母乳を 100ml 母乳と同様な温度変化となるように初乳用バッグを用いた。具体的には、小袋内外の温度変化を測定した。A: コントロール (小袋なし、母乳 100ml)、B: 母乳 20ml と母乳 80ml、C: 母乳 20ml と水道水 80ml

結果; A と B、B と C で比較し、加温開始時および終了時のいずれも温度の中央値に有意差はなかった (p= 0.86 と 0.25、p=0.35 と 0.57)。よって、25ml 未満であっても初乳用バッグを用い、容器内総量が 100ml となるように水を容器に入れると母乳 100ml と同等の温度変化が得られることがわかった。最後に母乳の違いにより温度変化に差がないことを確認するために、5 名の女性から得られた母乳を小袋内に入れて、小袋内外の温度差を比較したところ、有意差はなかった。

研究 1) のまとめ

異なるボトルで、いずれも表面温度は底面温度より有意に温度上昇が大きかったが、その差は 5.5℃ 程度であった。容器内の 9 点で異常な温度上昇はなかった。異なる容器における底面温度変化、異なる母親による温度変化に有意差はなかった。

小袋に入れた母乳の内外での温度変化、異なる母親間でも有意差はなかった。

考察：本研究ではボトル内底面と表面で温度変化が異なり、この違いはボトルの形状によると判断したが、その温度差は5程度と大きくなかった。以前の研究では、異なる条件(200mlの母乳を入れた250mlのボトル)での表面と底面の間に最大15の温度差があったと報告されている。今回、160mlのボトル(ボトルD)に入れた100mlの母乳を500Wで60秒加熱しても深刻な温度変化は生じないことが分かった。これまで母乳を電子レンジで加熱することは、温度ムラが生じること、および母乳中の分泌型IgA、リゾチーム、ラクトフェリン、TGF- β 2、遊離脂肪酸といった感染防御因子のタンパク質など、生理活性物質を減少させる可能性があることから推奨されてこなかった。温度ムラに関しては、水溶性分子および脂肪から構成されている母乳の組成によるところが影響していると考えられている。母乳を冷凍すると脂肪と水溶性分子が分離し、それを電子レンジ加熱することでそれぞれの温度上昇が異なるため温度ムラによる異常な高温を示す部位が生じると考えられている。今回の研究で行った設定(500Wまたは600W、60秒)では、異常高温を示す部位は検出されなかった。このことから、この条件が実臨床での母乳の加熱する際の一つの目安となりうると思う。

2) CMV IgG 陽性母体から得られた母乳による細胞感染実験

CMV 陽性母乳サンプル全てで CMV-DNA が検出され、一方で CMV 陰性母乳サンプルでは検出限界以下であった(表1)。200W または 500W の MW 処理後、CMV-DNA コピー数は対照サンプルと有意な差が見られなかった(表3)。TCID50/mL 値は、CMV 陰性母乳サンプルではゼロであり、感染性ウイルスは検出されなかった。しかし、CMV 陽性母乳サンプルのうち8つの未処理サンプルのうち7つで、-20℃での凍結後に感染性ウイルスが検出された。200W の MW 熱処理後、CMV 陽性母乳サンプルのうち8つのうち5つで TCID50/mL が減少した(表1)。60秒間の200W MW 熱処理後の乳液サンプルの TCID50/mL については、対照サンプルと比較して有意な減少が観察された($p=0.036$)。しかし、処理されたサンプルには依然として感染性の CMV が存在した。500W MW 熱処理後も同様の結果が得られた。そのため、同じ MW 熱設定での処理後に CMV 感染の防止が改善するかどうかを検討するために、母乳の量を減らし実験2を行った。非処理の母乳サンプルではすべてにおいて、TCID50/mL は100であった(表2)。100 mL の母乳を500 W 60秒間で電子レンジ処理を行った後、10のうち6つのサンプルで TCID50/mL が減少した。一方、50 mL にして同じ条件で処理したところ、12の CMV 陽性サンプル全てが TCID50/mL が減少し、うち4サンプルでは細胞感染を完全に予防できた(表4)。50 mL サンプルと100 mL サンプルの TCID50/mL の減少を比較したところ、50 mL サンプルでは100 mL サンプルよりも有意に高い減少が観察された(Wilcoxon 符号順位検定、 $p=0.016$)。MW 加熱処理を行っても、ベースライン時の CMV-DNA コピー数は変化しなかった。また、DNA コピー数と CMV 感染性タイトルの間に関連性は認められなかった。

表1 母乳100mlを200Wまたは500Wにて60秒間電子レンジ処理した前後のDNAコピー数とTCID50/ml

Table 1: The number of HCMV-DNA copies and the value of TCID50 in the human milk (100ml) after 200W/500W for 60s.

Sample	Number of CMV-DNA copies per milliliter			TCID50 per milliliter		
	No treat	200 W treat	500 W treat	No treat	200 W treat	500 W treat
A	679 ± 73	1352 ± 96	1281 ± 310	100	10	10
B	27300 ± 1229	3680 ± 1060	1056 ± 247	100	10	10
C	10760 ± 510	7087 ± 136	13030 ± 1811	100	10	10
D	1649 ± 271	1183 ± 351	1603 ± 217	10	10	10
E	1952 ± 604	1071 ± 323	1633 ± 993	0	0	0
F	2145 ± 1684	3636 ± 2323	3975 ± 2022	10	0	0
G	1336 ± 115	1300 ± 616	1083 ± 408	10	10	10
H	2329 ± 1613	2327 ± 446	2980 ± 225	10	0	0
I	< 200	ND	ND	0	ND	ND
J	< 200	ND	ND	0	ND	ND

ND: not done

表2 母乳50mlまたは100mlを500Wにて60秒間電子レンジ処理した前後のDNAコピー数とTCID50/ml

Table 2: The number of CMV-DNA copies and the value of TCID50 in the human milk with 500W for 60s (50ml and 100ml)

Sample	Number of CMV-DNA copies per milliliter			TCID50 per milliliter		
	No treat	50 mL treat	100 mL treat	No treat	50 mL treat	100 mL treat
K	3367 ± 151	3373 ± 31	ND	100	10	ND
L	108667 ± 14257	117467 ± 29223	73267 ± 60802	100	10	10
M	5393 ± 1068	3120 ± 647	3793 ± 1437	100	10	ND
N	45533 ± 8778	40067 ± 4163	35067 ± 5558	100	0	0
O	28600 ± 6762	23200 ± 3650	37400 ± 4915	100	10	100
P	4500 ± 1733	4173 ± 978	3387 ± 220	100	0	10
Q	5307 ± 808	2840 ± 410	3560 ± 92	100	0	10
R	4440 ± 1193	2893 ± 527	2947 ± 613	100	0	10
S	3267 ± 1196	5927 ± 2400	2827 ± 437	100	10	100
T	3680 ± 260	4426 ± 338	4220 ± 253	100	10	100
U	23467 ± 2203	20927 ± 2024	21473 ± 8192	100	10	100
V	30400 ± 721	9873 ± 471	30733 ± 2715	100	10	10

ND: not done

研究 2) の検討より、1 か月以上冷凍した母乳であっても母乳中の CMV は感染性を維持していた。また、200W または 500W による MW 処理によりある程度、母乳中 CMV 細胞感染性が減少することがわかった。100ml に比べて 50ml の母乳を同条件で処理するほうが細胞感染性は低下したが、これは温度上昇が大きいためと考えられた。しかし、100ml 母乳を 200W60 秒の電子レンジ処理でも有意に細胞感染性は低下した。200W60 秒では温度上昇は 25 以下であり、CMV 不活性化の条件である 58 に達することはなかった。このため、温度による CMV 不活性化以外に電磁波による効果も推測された。これまでに母乳 100ml を電子レンジ 500W60 秒処理において、SIgA、ラクトフェリン、TGF- β など生理活性物質にも有意な変化がないことを報告したが、すべての成分を調べたわけではなく、温度変化は少ないほうが母乳成分への影響は減少するため、臨床応用するには 200W60 秒という設定が望ましいと考えられた。

2) のまとめ：人工乳に人為的に CMV を加えて行った実験では 500W40 秒で完全に細胞感染を防ぐことができたが、CMV を含む母乳を使った今回の実験では、同様の結果はえられなかった。その理由として、最高到達温度が人工乳よりも低かったこと、また、乳腺組織で再活性化された CMV はより感染性が強いのかもかもしれない。

今回の研究の総括：新しく開発された低温殺菌処理器よりも、電子レンジ処理による経母乳 CMV 感染対策は SIgA やラクトフェリンといった生理活性物質の減少が少ないため、今後、臨床応用につなげるべき方法であると考えられた。今回の 4 年間は COVID-19 の影響を直接うけたため、臨床応用ができなかったことは大きな反省点である。

文献

1. 山本和也、水野克己、櫻井基一郎 他 電子レンジ処理による母乳の成分変化に関する検討 新生児育成医学会誌 2020;32:179-183
2. Yoshida Y, Furukawa K, Mizuno K, et al. Microwave heating of human milk with direct temperature monitoring. J Hum Lact 2022;38:323-31
3. Mizuno K, Kohda C, Den H. Microwave treatment prevents cytomegalovirus transmission to preterm infants through human milk. J Food Sci Nutr Res 2022;5:608-611

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizuno K, Kohda C, Den H	4. 巻 5
2. 論文標題 Microwave treatment prevents cytomegalovirus transmission to preterm infants through human milk.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Food Sci Nutr Res	6. 最初と最後の頁 608-611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/08903344211047452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Y, Azuma M, Furukawa K, Mizuno K, Den H, Kamiya T, Izumizaki M	4. 巻 38
2. 論文標題 Microwave heating of human milk with direct temperature monitoring	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Lactation	6. 最初と最後の頁 323-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/08903344211047452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 水野克己	4. 巻 16
2. 論文標題 母乳バンクから提供されるドナーミルクの母乳成分分析に関する検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本母乳哺育学会誌	6. 最初と最後の頁 160-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Y, Azuma M, Furukawa K, Mizuno K, Den H, Kamiya T, Izumizaki M	4. 巻 38
2. 論文標題 Microwave Heating of Human Milk With Direct Temperature Monitoring	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Lactation	6. 最初と最後の頁 323-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/08903344211047452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furukawa K, Mizuno K, Azuma M, Yoshida Y, Den H, Iyoda M, Nagao S, Tsujimori Y	4. 巻 38
2. 論文標題 Reliability of an Ion-Selective Electrode as a Simple Diagnostic Tool for Mastitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Lactation	6. 最初と最後の頁 262-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/08903344221075050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 水野克己
2. 発表標題 新生児・乳児期の母乳栄養について
3. 学会等名 第157回日本小児科学会栃木県地方会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野克己
2. 発表標題 早産児と母乳栄養～現在・過去・未来～
3. 学会等名 第66回日本新生児成育医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsumi Mizuno
2. 発表標題 Changes in breast milk properties due to microwave treatment
3. 学会等名 International Society for Research on Human Milk and Lactation (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

We are supposed to conduct randomize control trial at the NICU of Showa University Hospital, however, it was almost impossible to explain the study to parents of very preterm infants. Therefore, we accumulated results from basic studies. We believe the microwave procedure would be a better strategy for prevention of CMV infection via breast milk from mothers who are positive of CMV IgG. We would like to conduct a randomize control trail in near future.

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	幸田 力 (Kohda Chikara) (10365752)	昭和大学・医学部・准教授 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------