

ヒト母乳の抗ウイルス活性

岩手医大 細菌 川名林治, 松本一郎
東大医 保健学科・母子保健 平山宗宏, 斉藤 実

ヒト母乳の抗ウイルス活性を、母乳より抽出した各種成分毎に、組織培養系で、rhinovirus、respiratory syncytial virus (RSV)、さらに herpes simplex virus (HSV) を用い検討したので報告する。

実験方法：

1) 母乳成分；ヒト母乳成分としてヒト母乳成分としてヒト母乳より抽出した lactoferrin, pure lysozyme, crude lysozyme, polysaccharide (5容 ethanol 沈澱) を用いた。これらを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ に、細胞維持液に溶解し、 10 倍過減菌後、ウイルス希釈液あるいは細胞維持液として用いた。

2) 組織培養細胞； rhinovirus の実験には感受性の高い HeLa (Ohio 株) 細胞を用い、RSV には L132 細胞、HSV にはヒト胎児肺 (HEL) 細胞を用いた。HeLa および L132 細胞の増殖には 10% 仔牛血清加 Eagles MEM (30mM - MgCl_2 加) を用い、 1×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を 1ml ずつ roller tube に分注し、 37°C 、2日間静置培養した。HEL細胞は 20% 仔牛血清加 Eagles MEM に、もとの細胞の2倍量になるように浮遊し、 1ml ずつ、roller tube に分注、 37°C 、3日間静置培養したものを用いた。細胞維持液としては、L132細胞とHEL細胞には 2% 仔牛血清加 Eagles MEM 1ml を用い、HeLa細胞には、これにさらに tryptose phosphate broth (Difco) を 5% に、また、 MgCl_2 を 30mM に加え、その 1ml を用いた。

3) 使用ウイルス； rhinovirus は、米国 NIH より分与後、HEL細胞に3代、さらに HeLa細胞に3代継代した2型 (HGP株) を用いた。RSVは、かぜ症候群の生後4カ月の女兒より L132 細胞で分離されたものを用いた。HSVは医科研、吉野教授より分与をうけた HF 株を、さらに HEL細胞に2代継代した株を用いた。

4) 母乳各種成分の抗ウイルス活性；母乳成分を 100 、 10 、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に含ら細胞維持液で、ウイルスを 10 倍階段希釈し、室温 ($21\sim 22^\circ\text{C}$) に2時間放置後、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で incubate したウイルスは同一母乳成分を 100 、 10 、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む維持液 1ml で維持した細胞に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 中に、incubate したものは同一母乳成分を 10 あるいは $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に含む維持液で維持した細胞に、また、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 中に incubate したものは 100 あるいは $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の維持液で維持した細胞に、各希釈を 0.1ml ずつ、2本の tube に接種した。rhinovirus と RSV は 33°C 、HSV は 37°C で回転培養して、CPE を観察した。

実験成績：

1) 母乳成分の抗 rhinovirus 活性

母乳中の lactoferrin, pure lysozyme, crude lysozyme, polysaccharide を、個々に 100

あるいは $10^{4.0} \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む維持液中で、室温、2時間の作用では、ウィルスの不活化はみられなかった。すなわち、対照が $10^{3.5} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ であったのに対し、いずれの成分の場合も、 $10^{3.5} \sim 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ を維持していた。

2) 維持液中の各成分の rhinovirus 増殖に及ぼす影響

母乳成分を含まない維持液でウィルスを10倍階段希釈し、室温2時間放置後、母乳成分を100あるいは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に含む維持液で維持した細胞に接種したが、この場合も、感染価に対照との差はみられず、 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ であった。さらに、ウィルスを接種前、母乳成分で室温2時間作用後、希釈液と同一の維持液で維持した細胞に接種した場合にも増殖抑制効果はみられず、むしろ、pure lysozyme $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で前処置後、同一維持液の細胞に接種した場合、 $10^{5.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ に、また、crude lysozyme $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は $10^{4.5} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ に上昇した。他は $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ であった。

lactoferrin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合、最終的に、感染価は $10^{3.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ に達したが、CPEの出現は遅れ、多少、ウィルス増殖に影響があったものと思われる。そこで、わたしたちは、lactoferrin を中心に、RSVとHSVの増殖に対する影響を観察した。

3) RSVの増殖に及ぼす lactoferrin および pure lysozyme の影響

組織培養細胞と多少の維持液の違い以外は rhinovirus の場合と同様に実験をすすめた。

lactoferrin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合、多少L132細胞に毒性がみられ、syncytiumを観察しにくくしたが、ウィルス接種後7日目では、対照が $10^{2.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ を示したのに対し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で維持した場合は $10^{1.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ で、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は 10^{-1} 希釈でCPEは観察されなかった。さらに、この7日目に、従来の維持液と同一のもの1mlと液を交換し、CPEの観察を続けたところ、ウィルス接種後、10日目には、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は、対照と同等の $10^{2.0} \text{TCID}_{50}$ に達した。しかし、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合は、依然として、 10^{-1} 希釈でCPEは観察されなかった。また、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、室温2時間作用後、lactoferrin を含まない細胞に接種した場合にも、ウィルス接種後10日目でも $10^{1.0} \text{TCID}_{50}$ であった。

lactoferrin と同時に pure lysozyme $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の影響も検討したが、CPEは $10^{1.0} \text{TCID}_{50}$ までみられたのみであった。

4) HSVの増殖に及ぼす lactoferrin の影響

lactoferrin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の維持液について検討した。対照は、ウィルス接種後4日目に $10^{5.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ に達したが、lactoferrin を含む細胞では、 $10^{3.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ で、5日目も両者とも変らなかった。

以上、lactoferrin が、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ では低濃度のRSVとHSVの増殖を抑制し、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ではRSVのCPE出現を遅延させ、また、pure lysozyme もRSVの増殖に多少影響するものと思われる成績をえたが、これらの知見は、さらに、増殖曲線を作製するとともに、plaque reduction などにより、詳細に検討する必要がある。

母乳中の各種成分の rhinovirus type 2 の
不活化および増殖に及ぼす影響

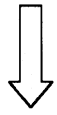
前処置 (室温, 2時間)		細胞維持液中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
		0	10	100
lactoferrin	($\mu\text{g}/\text{ml}$) 0	3.5*	3.5	3.0
	10	3.5	3.0	—
	100	4.0	—	3.0
pure lysozyme	0	3.5	4.0	4.0
	10	4.0	3.0	—
	100	4.0	—	5.0
crude lysozyme	0	3.5	3.5	3.5
	10	3.5	3.0	—
	100	4.0	—	4.5
polysaccha- ride (5容ethanol, pp ⁺ .)	0	3.5	3.5	4.0
	10	4.0	4.5	—
	100	4.0	—	4.0

* : $\log \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$

母乳 lactoferrin および pure lysozyme のウイルス増殖に及ぼす影響

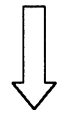
ウイルス	前処置 (室温, 2時間)		維持液中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) と観察日					
			0		10		100	
			7日	10日	7日	10日	7日	10日
Respiratory syncytial virus	lactoferrin	($\mu\text{g}/\text{ml}$) 0	*	2.0	1.0	2.0	<1.0	<1.0
		10	1.5	2.0	1.0	2.0		
		100	1.0	1.0			<1.0	<1.0
	pure lysozyme	0	2.0	2.0	1.0	2.0		
		100					<1.0	<1.0
Herpes simplex virus	lactoferrin	0	4日	5日	4日	5日	4日	5日
		100	5.0	5.0			3.0	3.0

* : $\log \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



ヒト母乳の抗ウイルス活性を, 母乳より抽出した各種成分毎に, 組織培養系で, rhinovirus, ・・ respiratory syncytial virus (RSV), さらに herpes simplex virus (HSV) を用い検討したので報告する。