

1 原著論文

2 フローサイトメトリーによるパスツール化し

3 たドナーミルク中の残存細胞の解析

4 著者氏名 鈴木学¹⁾、池田裕一²⁾、若林和代

5 ²⁾、水野克己³⁾、磯山恵一²⁾

6 1) 昭和大学病院小児科

7 2) 昭和大学藤が丘病院小児科

8 3) 昭和大学江東豊洲病院小児内科

9

10 Key words, donor human milk, milk somatic cell, flow cytometry,

11

12 著者連絡先 昭和大学病院小児科

13 〒 142-8666 東京都品川区旗の台 1-5-8

14 Department of Pediatrics, Showa University School of Medicine

15 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan

16

17 E-mail: m_suzuki@med.showa-u.ac.jp

18

19

20

1 【 要 約 】

2 新生児において、パステール化したドナーミ
3 ルク (DM) の使用は人工乳に比較して壊死性腸炎
4 (NEC) の罹患率を低下させると報告されている。
5 これは母乳に含まれる免疫物質が DM 精製に必
6 要な熱処理後も存在していることが理由のひ
7 とつと考えられている。新鮮母乳における総
8 細胞数や CD45+ 細胞数、細胞表面マーカーの解
9 析の検討は数多く行われているが、熱処理後
10 の母乳、すなわち DM 中に含まれる白血球数 (
11 CD45+ 細胞数) ・生細胞率の報告や、残存細胞
12 の表面マーカーを解析した報告はない。今回、
13 DM 中の残存細胞数と細胞の特徴を明らかにす
14 る目的で、フローサイトメトリー (FCM) を用
15 いて熱処理後の母乳中細胞の解析を行った。
16 DM 中の CD45+ 細胞数は $2.2 \pm 0.21 \times 10^5 / \text{ml}$ 、生細胞数は
17 $4.7 \pm 0.32 \times 10^4 / \text{ml}$ あった。CD45+ 細胞のうち CD3、CD4 (
18 T 細胞)、CD19、CD20 (B 細胞)、CD56 (NK 細胞) は全
19 て 0.5 % 未満で、CD163 (マクロファージ) は $83.7 \pm$
20 7.4% 、樹状細胞 (CD11c+CD11b-) は $62.8 \pm 26.1 \%$ であっ

1 た。母乳中の樹状細胞は児の免疫系に働きか
2 け、腸管粘膜で児のT細胞、B細胞を腑活化
3 するとされており、樹状細胞の残存がDMによ
4 るNEC発症率低下の一因になっている可能性が
5 示唆された。

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1 Analysis of a Cell of Pasteurized Human Milk by Using Flow Cytometry

2

3 Manabu Suzuki, Hirokazu Ikeda, Kazuyo Wakabayashi, Katsumi Mizuno

4 Department of Pediatrics, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan

5

6 Pasteurized human milk (donor milk) was reported to reduce necrotizing enterocolitis
7 (NEC) in neonates compared to the use of formula. Based on reports, immunological
8 subjects included in human milk continue to persist even after Holder pasteurization
9 and contribute to a neonate's immune system. There is no report pertaining to the
10 somatic cell count (SCC) in donor milk. We analyzed a cell of donor milk by using flow
11 cytometry. SCC in donor milk was $4.7 \pm 0.32 \times 10^4/\text{ml}$, the viable cell count was $2.2 \pm$
12 $0.21 \times 10^5/\text{ml}$, and T cell, B cells, and natural killer cells were $< 0.5\%$. Macrophages
13 were noted to be $83.7 \pm 7.4\%$, and dendritic cell count was $62.8 \pm 26.1\%$. Dendritic cells in
14 human milk reportedly act on the immune system of neonates. The possibility has been
15 suggested that the ability of dendritic cells to survive Holder pasteurization contributes
16 to the reduction in the rate of onset of NEC.

17

18

19

20

1 【 目 的 】

2 昭和大学江東豊洲病院では2014年度から母乳
3 バンクを開設しNICU入院児にドナーミルク(DM)の
4 使用を行っている。しかし、本邦全体では、
5 その普及に至るには、いまだ安全性の啓蒙、
6 有用性の提示が不足している印象が否めない。
7 DMは人工乳よりも壊死性腸炎(NEC)の罹患率を
8 低下させるとされており、母乳に含まれる免
9 疫物質がDM精製に必要な熱処理後も存在して
10 いることが理由のひとつと考えられている¹⁾。
11 DM中に含まれる免疫物質のうち、γグロブリン
12 ンやサイトカインの含有量を検討した報告は
13 散見される。Espinosa-Martosは、2013年にDM中の免疫
14 グロブリンやサイトカインを解析し50%程度
15 の残存を認めた²⁾という結果であった。一方
16 で、DM中の正確な白血球数(CD45+細胞数)・
17 生細胞率の報告はなく、残存細胞の特徴を解
18 析した報告はない。今回我々はDMの細胞成分
19 に関する検討を行う目的にFCMを利用して、細
20 胞数と細胞成分を解析した。

1 【 方 法 】

2 母 乳 は 2014 年 4 月 から 2015 年 12 月 に 昭 和 大 学 江
3 東 豊 洲 病 院 NICU に 入 院 し た 児 の 母 親 と 、 同 時 期
4 に 同 院 の 母 乳 外 来 を 受 診 し た 母 親 か ら 採 取 し
5 た 。 検 体 は 各 家 庭 で 搾 乳 さ れ た 後 に 各 家 庭 で
6 冷 凍 し 、 冷 凍 し た 状 態 で 母 乳 バ ン ク に 郵 送 さ
7 れ た 。 採 取 方 法 は 搾 乳 器 (シ ン フ ォ ニ ー , Medela,
8 Swiss) ま た は 用 手 搾 乳 で 行 っ た 。 郵 送 さ れ た
9 母 乳 は 母 乳 バ ッ グ (カ ネ ソ ン , 大 阪) を 使 用
10 し て 、 Holder pasteurization(62.5 °C 、 30 分) を 行 っ た 後
11 に 再 び 冷 凍 し て 硬 質 プ ラ ス チ ッ ク の 容 器 (
12 Medela, Swiss) で -20 °C 以 下 で 保 存 し た 。 Holder
13 pasteurization を 行 っ た 後 の 母 乳 を DM と 定 義 し た 。

14 解 析 は DM 作 成 か ら 約 3 か 月 後 に 施 行 し た 。
15 DM を -20 °C の 冷 凍 庫 か ら 研 究 室 に 搬 入 後 、 70ml 入
16 り の 硬 質 プ ラ ス チ ッ ク 容 器 ご と 37 °C 恒 温 槽 に
17 5 分 間 静 置 し 解 凍 し た 。 解 凍 後 速 や か に DM70mL
18 に リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (PBS)30ml を 加 え ト ー タ
19 ル 100mL に 希 釈 し て 遠 心 分 離 (300G, 20 分) し た 。 遠
20 心 後 に 上 清 を 吸 引 し 、 残 っ た 沈 殿 に PBS10ml を 加

1 えて再度同様の遠心分離と上清の吸引を計 3
2 回行い、沈殿に PBS1ml を加えて細胞混濁液を作
3 成し、これを検体とした。

4 DM 中の全細胞数と生細胞数に関しては検体
5 $10\mu\text{L}$ にトリパンブルー染色液 $10\mu\text{L}$ を加え
6 て細胞数測定器 (TC20™ 全自動セルカウンター)
7 にて解析し、DM1ml 中の全細胞数と生細胞数を
8 計測し、それを基に生細胞率 (%) を算定した。

9 フローサイトメトリーは FACS Caribla (Beckman Coulter,
10 Brea, CA, USA) を使用して行い、検体は $12 \times 75\text{ mm}$
11 polypropylene round-bottom tubes (BD Biosciences) に入れた後に検
12 査するものとした。検体はフローサイトメト
13 リーでは 10 000 events をカウントするまで検体を
14 medium speed で抽出した。

15 CD45+ 細胞数の測定は以下のとおりである。
16 抗体試薬として抗 CD45 抗体 10ul (BD Biosciences, San Jose,
17 CA, USA) と Via-Prove(7-AAD) (BD Biosciences) 10ul を染色ビーズ
18 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を含む Trucount tubes (BD Biosciences)
19 で解析を行った。International Society of Hematotherapy and
20 Graft Engineering (ISHAGE) のガイドラインに従い CD45+

1 細胞をゲートし算定した。CD45+ 細胞数 =CD45+
2 細胞数 /ul × テストチューブあたりのビーズ
3 数 × ビーズ数希釈因子 × 検体量 (50ul) である。
4 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、
5 樹状細胞の測定は以下の通りである。解析に
6 使用した抗体は抗 CD3 抗体 (PE) , 抗 CD4 抗体 (
7 FITC) , 抗 CD8 抗体 (PE) (以上 ; BD Biosciences, San Jose, CA,
8 USA) , 抗 CD11c 抗体 (PE) , 抗 CD19 抗体 (FITC) ,
9 抗 CD56 抗体 (APC), (以上 ; Immunotech, Maian, FL, USA) 抗
10 CD163 抗体 (FITC) , HLA-DR 抗体 , lineage 抗体 (以上 ;
11 Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) である。これらの検体の陰
12 性コントロールには FITC-IgG, PE-IgG, APC-IgG 抗体 (以
13 上 ; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いた。CD3+ 分画を
14 T 細胞 , CD8+ または CD19+ の分画を B 細胞、CD3- か
15 つ CD56+ の分画を NK 細胞、CD163+ の分画をマクロ
16 ファージ、CD11c+, かつ Lin- かつ HLA-DR+ の分画を樹状
17 細胞とし、検体 50ul にそれぞれの細胞に対応し
18 た抗体試薬を加え混和し、室温、暗所で 15 分
19 間静置した後にコントロール抗体を用いて陰
20 性分画をセッティングした。また抗 CD45 抗体陽

1 性細胞をゲーティングした。この CD45+ 細胞集
2 団のうち、それぞれの表面マーカーが占める
3 割合（細胞率%）を測定した。上記の方法によ
4 り、得られたデータは FlowJo software 10.0.5 (Treestar,
5 Ashland, OR, USA) を使用してそれぞれの細胞分画の
6 解析を行った。

7 【結果】

8 DM 中の総細胞数と生細胞数の平均値と標準
9 偏差はそれぞれ $1.2 \pm 0.69 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $2.7 \pm 2.1 \times 10^5/\text{ml}$ だっ
10 た。なお、各検体で細胞数の測定ができない
11 ものはなかった。【表 1】

12 CCD45+ 細胞は $2.2 \pm 0.21 \times 10^5/\text{ml}$ 、CD45+ 生細胞数は
13 $4.7 \pm 0.32 \times 10^4/\text{ml}$ だった。

14 CD45 ゲーティングによる免疫細胞の解析では、
15 CD4+ または CD8+ は 0.3%、さらに CD3+ または CD19+ の細胞
16 率は 0.3%、CD3- かつ CD56+ の細胞率は 0.2%、マクロフ
17 ーージの指標とされる CD163+ の細胞は $83.7 \pm 7.4\%$
18 であった。樹状細胞の指標とされる CD11c+ かつ
19 Lin- の細胞は $62.8 \pm 26.1\%$ で、この細胞中の 44.1 ± 13.6
20 % が HLA-DR+ だった。【図 1】 【図 2】 【表 2】

1

2 【 考 察 】

3 母 乳 に は 人 工 乳 と 比 較 し て 神 經 学 的 予 後 改
4 善 や 感 染 防 御 、 未 熟 児 網 膜 症 や 壊 死 性 腸 炎 の
5 リ ス ク 軽 減 な ど の 多 く の 利 点 が あ り ¹⁾³⁾⁴⁾ 、 新 生
6 児 に と っ て 最 良 の 栄 養 源 で あ る 。 特 に 感 染 防
7 御 に 関 し て は 、 新 生 児 の 腸 管 に は 欠 損 ま た は
8 ご く 稀 に し か 存 在 し な い IgA を 含 有 し て お り 、
9 腸 管 免 疫 に 働 き か け る ⁵⁾⁶⁾ こ と が 報 告 さ れ て い
10 る 。 ま た 、 母 乳 中 に 含 ま れ る 免 疫 物 質 の う ち 、
11 白 血 球 は 初 乳 中 に は $4.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 、 成 熟 乳 に は
12 $1.0 \times 10^5 / \text{ml}$ 程 度 含 ま れ て お り 、 そ の う ち 好 中 球 が
13 30 - 40% で 抗 原 提 示 細 胞 が 55 - 60%⁶⁾ と さ れ 、 こ れ ら
14 の 細 胞 は 児 の 生 体 内 、 特 に 腸 管 で 利 用 さ れ 免
15 疫 機 能 に 寄 与 し て い る ⁷⁾ 。 こ の よ う に 母 乳 が
16 新 生 児 の 感 染 防 御 、 腸 管 免 疫 に 果 た す 役 割 は
17 大 き く 、 細 胞 成 分 も そ の 一 端 を 担 っ て い る と
18 考 え ら れ る 。

19 そ の た め 米 国 小 児 科 学 会 (American Academy of Pediatrics
20 AAP) は 母 乳 育 児 推 進 を 提 言 し て い る ⁸⁾ 。 実 の 母

1 親の母乳 (Own mother's milk) での栄養が最も望ましい
2 が、母体の感染症などにより Own mother's milk が使
3 用できないことがある。Own mother's milk が得
4 られない状況では、過去には他の母親の母乳
5 (もらい乳) の使用が散見されたが、感染性
6 の問題から現在は一般的ではない。そこで次
7 善の策として使用が推奨されているのが DM で
8 ある。DM で栄養された児は人工乳で栄養され
9 た児と比較して NEC の罹患率を 2.5 倍から 4 倍低
10 下させる⁹⁾¹⁰⁾ことは DM が推奨される根拠となっ
11 ており、理由として母乳中に含まれる免疫物
12 質が DM 精製過程の熱処理後も残存することが
13 考えられている。DM 中の免疫物質に関する過
14 去の報告を示す。サイトカインや免疫グロブ
15 リンなどの免疫活性物質に関する検討は散見
16 され、macrophage inflammatory protein-1 β や、macrophage-monocyte
17 chemoattractant protein などの抗原提示細胞に関連する
18 サイトカインは熱処理により 50% 程度減少す
19 る²⁾と報告されている。しかし免疫担当細胞
20 に関しては、白血球数や生細胞数の報告や残

1 存細胞の特徴を解析した報告はなかった。こ
2 れは、DM精製過程で行われる熱処理による細
3 胞への影響が考慮された結果と考えられる。
4 実際、Holder pasteurization は母乳を感染経路とする
5 HCV, HTLV-1, CMV を不活化するだけでなく細菌を死滅
6 する¹¹⁾。また、Holder pasteurization 後の母乳をトリ
7 パンブルー染色した結果、生細胞がみとめら
8 れなかった¹²⁾との報告や、Holder pasteurization によ
9 り免疫担当細胞は完全に活性を失うとの報告
10 がある¹³⁾。しかし、過去には熱処理を行って
11 いない母乳を用いて flow cytometry で解析を行った
12 検討があり、泌乳期や在胎週数による差はあ
13 るが、 $1.0 \times 10^5 - 10^6/\text{ml}$ 程度の CD45+ 細胞がみとめら
14 れた¹⁴⁾ことが報告されている。また、Li らは
15 2015 年に Flow cytometry を用いてパスツール化と同様
16 の低温殺菌処理をした牛乳中の細胞を検討し
17 た結果、熱処理後にも生理活性をもつ細胞が
18 残存することを報告している¹⁵⁾。そのため DM
19 中にも生理活性がある免疫担当細胞が残存す
20 る可能性は否定できないと考え、我々は今回

1 Flow cytometry を用いて DM の検討をした。その結果、
2 DM 中には $2.2 \times 10^5/\text{ml}$ 程度の CD45+ 細胞が存在し、20%
3 程度が生細胞として存在していることが示さ
4 れた。今回の検討より、検体の加熱滅菌に
5 Holder pasteurization 法を用いても、相当数の細胞が
6 残存することが明らかになった。これは私た
7 ちが初めて明らかにした 1 つ目の知見である。
8 さらに、残存細胞を CD45+ でゲーティングし
9 て行った解析では、T 細胞、B 細胞、NK 細胞を
10 みとめず、マクロファージと樹状細胞のみ残
11 存していた。これは私たちが初めて明らかに
12 した 2 つ目の知見である。異種抗原の原因と
13 なりうる T 細胞、B 細胞は消失していたにも
14 かかわらず、抗原提示細胞のみが残存した理
15 由は現状では不明であり、今後 Holder pasteurization
16 前後でのより詳細な解析が行われる必要があ
17 る。また、樹状細胞残存の臨床的意義として、
18 母乳中の抗原提示細胞は微生物を貪食する¹⁶⁾
19 ことや、活性化を示唆する細胞表面マーカー
20 (CD11c) を発現しており、児の免疫系に働きかけ

1 T細胞、B細胞を腑活化する¹⁷⁾ことが報告さ
2 れており、樹状細胞の残存がDMによるNEC発症
3 率低下の一因になっている可能性が示唆され
4 た。

5 先に示した牛乳を用いた検討では、熱処理
6 後にも生理活性をもつ細胞が残存することが
7 示されており¹⁵⁾、DM中の生細胞にも生理活性
8 がある可能性は否定できない。そのため我々
9 はDM中に含まれる抗原提示細胞の生理活性を
10 熱処理前の母乳と比較検討すべく、DM中の抗
11 原提示細胞内のサイトカインの分析を予定し
12 ている。

13

14

15

16

17

18

19

20

1 【 文 献 】

2 1) Sisk PM, Lovelady CA, et al. Early human milk feeding is associated with a lower
3 risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol* 2007 ; 27 :
4 428-433

5 2) Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, et al. Bacteriological, biochemical, and
6 immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J*
7 *Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013 ; 56 : 560-8

8 3) Furman L, Taylor G, et al. The effect of maternal milk on neonatal morbidity of very
9 low-birth-weight infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003 ; 157 : 66-71

10 4) Hylander MA, Strobino DM, et al. Association of human milk feedings with a
11 reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J*
12 *Perinatol* 2001 ; 21 : 356-362

13 5) Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed
14 infant. *Vaccine* 2003 ; 21 : 3382-3388

15 6) Goldman, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory
16 and immunomodulating properties. *Pediatr. Infect. Dis. J* 1993 ; 12 : 664-671

17 7) Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune
18 development in infants. *J Nutr* 2005 ; 135 : 1-4.

19 8) American Academy of Pediatrics. Policy statement and the use of human milk.
20 *Pediatrics* 2005 ; 115 : 496-506.

- 1 9) Best practice for expressing, storing and handling human milk 3rd eds. Human milk
2 banking Asso North Am, Fort Worth Tx 2012.
- 3 10) Boyd CA, Quigley MA, Brocklehurst P. Donor breast milk versus infant formula for
4 preterm infants: systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child Fetal Neonatal
5 Ed. 2007 ; 92 : 169-75.
- 6 11) Davanzo R De Cunto A, et al. To feed or not to feed? Case presentation and best
7 practice guidance for human milk feeding and group B streptococcus in developed
8 countries. J Hum Lact 2013 ; 29 : 452-7
- 9 12) Liebhaber M, Lewiston NJ, Asquith MT, et al. Alterations of lymphocytes and of
10 antibody content of human milk after processing. J Pediatr. 1977 ; 91 : 897-900.
- 11 13) Lawrence RA . Storage of human milk and the influence of procedures on
12 immunological components of human milk. Acta Paediatr Suppl. 1999 ; 88 : 14-8.
- 13 14) Trend S, de Jong E, Lloyd ML, Kok CH, et al. Leukocyte Populations in Human
14 Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. PLoS One.
15 2015 Aug 19 ; 10 : e0135580. doi: 10.1371/journal.pone.0135580. eCollection 2015
- 16 15) Na Li, Romain Richoux, Marie-Hélène Perruchot, et al. Flow Cytometry Approach to
17 Quantify the Viability of Milk Somatic Cell Counts after Various Physico-Chemical
18 Treatments. PLoS One. 2015 30 ; 10 : e0146071. doi: 10.1371/journal.pone.0146071.
19 eCollection 2015
- 20 16) Michie CA. The long term effects of breastfeeding: a role for the cells in breast

1 milk? J Trop Pediatr. 1998 ; 44 : 2-3.

2 17) Rivas RA, el-Mohandes AA, Katona IM. Mononuclear phagocytic cells in human

3 milk: HLA-DR and Fc gamma R ligand expression. Biol Neonate. 1994 ; 66 : 195-204.

4

5

表1

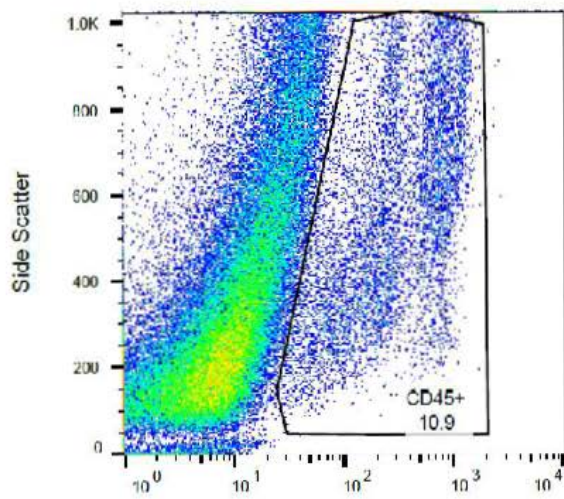
DM(n=8) 1mlあたりの細胞数	
細胞数測定器	
総細胞数 (生細胞数)	$1.2 \pm 0.69 \times 10^6$ ($2.7 \pm 0.25 \times 10^5$)
Trucount法	
CD45陽性細胞 (生細胞数)	$2.2 \pm 0.21 \times 10^5$ ($4.7 \pm 0.32 \times 10^4$)

表2

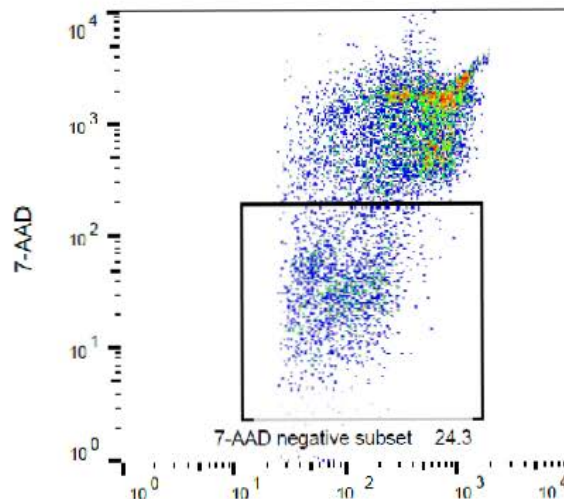
CD45陽性細胞の分画 (% n=8)	
樹状細胞	62.8 ± 26.1
マクロファージ	63.1 ± 37.4
T細胞	< 0.5%
B細胞	< 0.5%
NK細胞	< 0.5%

☒1

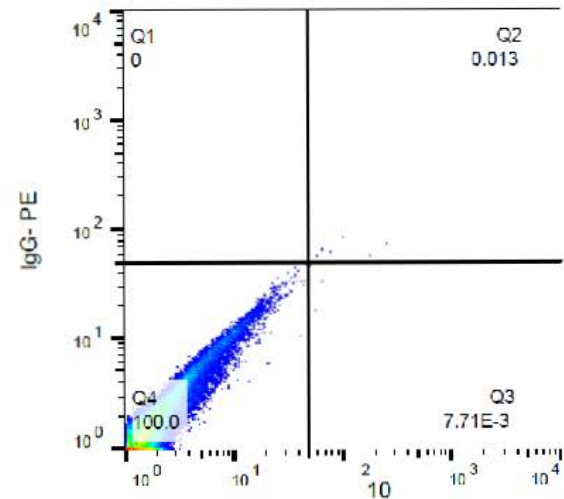
CD45



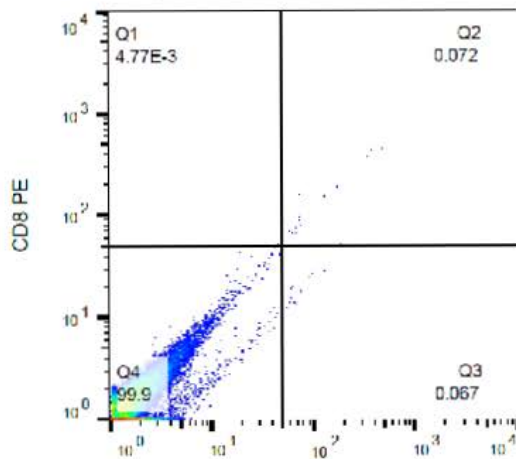
CD45+ / 7AAD-



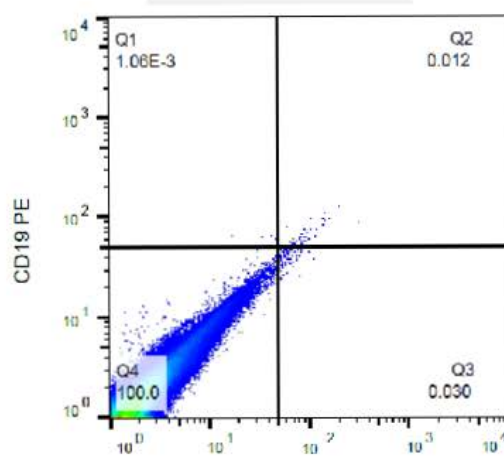
Control



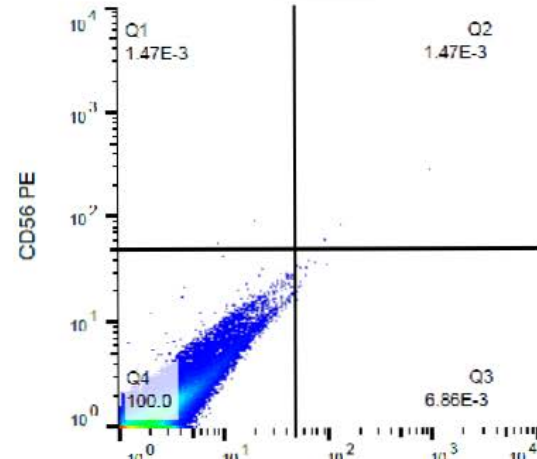
CD4/CD8



CD3/CD19

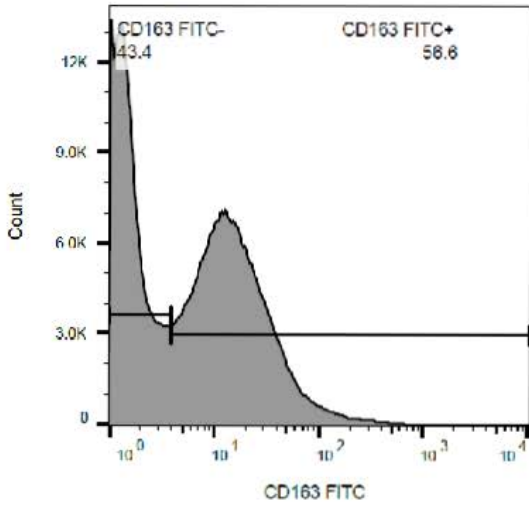


CD3/CD56

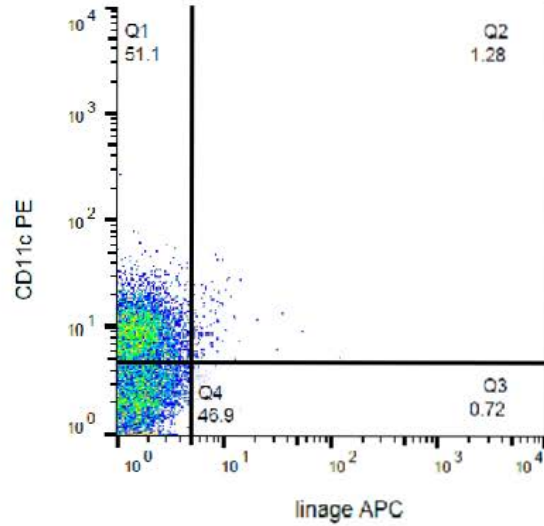


2

CD163



CD11c / Lineage-



CD11c / Lineage- / HLA-DR+

