

電子レンジ処理による母乳の成分変化に関する検討

山本和也¹⁾ k.yamamoto@med.showa-u.ac.jp

水野克己¹⁾ katsuorobi@med.showa-u.ac.jp

櫻井基一郎¹⁾ kii0124@med.showa-u.ac.jp

宮沢篤生¹⁾ miyazawa.t@med.showa-u.ac.jp

中野有也¹⁾ nakano_yt_tulip@yahoo.co.jp

村瀬正彦¹⁾ mrsmskh@yahoo.co.jp

田啓樹²⁾ denh@med.showa-u.ac.jp

辻森祐太³⁾ yuta-tsujimori@beanstalksnow.co.jp

1) 昭和大学医学部小児科学講座

2) 昭和大学医学部衛生学公衆衛生学講座

3) 雪印ビーンスターク株式会社

原稿枚数：11 枚、図表枚数：6

1 要旨

2 背景：超早産児では疾病予防効果も鑑み母乳栄養が推奨される一方、母乳はサイトメガロウ
3 イルス(CMV)など感染性もある。経母乳感染対策の標準はパスツール低温殺菌 (Holder
4 pasteurization:HP) 処理であるが、特殊な機器を要するため一般的ではない。

5 目的：我々は電子レンジ(500w 40 秒 : Microwave:MW)にて CMV 感染性が in vitro では消失
6 することを報告した。今回、同じ条件で電子レンジ処理をした場合の母乳成分変化について
7 検討した。

8 方法：母乳サンプル 9 検体を未殺菌、MW 処理、HP 処理での母乳中 sIgA、ラクトフェリン、
9 TGF- β 2、遊離脂肪酸、リゾチームを測定した。統計解析は Conover 検定を用いた。

10 結果：HP 処理では未殺菌に比べて、ラクトフェリンとリゾチーム濃度に有意な低下を認め
11 たが、全項目において、MW 処理では未殺菌と比較して有意差がなかった。

12 考察：母乳成分に与える影響は MW 処理の方が少なかった。今後、異なる機種 of 電子レンジ
13 でも同じ設定であれば同様の成分変化が起こるのか検討する必要がある。

14
15
16 Key Word: cytomegalovirus, human milk, microwave, pasteurization
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

緒言

超早産児では疾病予防効果や長期予後の改善を期待し、母乳栄養が推奨されている。一方で超早産児における経母乳ヒトサイトメガロウイルス (Human Cytomegalovirus: HCMV) 感染は敗血症様症状や胆汁うっ滞などを起こすだけでなく、長期的にも学習障害につながるという報告も散見される(1-3)。経母乳 HCMV 感染対策としてはパスツール低温殺菌 (62.5℃、30 分: Holder pasteurization: HP) 処理が標準的であり、フランスやオーストリアではたとえ母親の母乳であっても、母親が HCMV IgG 抗体が陽性であれば修正 32 週または 34 週まで HP を行うよう推奨している。(4, 5)。しかし、HP を行うには特殊な機器を必要とするため、どの施設でも簡単に行えるわけではない。また、HP による母乳中生理活性物質への影響も少なくないため、一律に HP を行うことには議論がある(6-8)。そのため、62℃5 秒間の低温処理(9)や UV-C 照射(10)など、より母乳成分に対する影響が少ない感染対策が検討されてきた。

我々は、これまでに電子レンジ (Microwave: MW) 500w40 秒間の熱処理が母乳中の HCMV の感染性を失わせると報告した(11)。MW 処理は HP と違って世界中のどこでも行うことができる。実際に臨床応用できるかどうかは、母乳成分への影響を見極める必要があり、今回、MW (500W 40 秒) による熱処理が母乳成分に及ぼす影響について、HP と比較検討した。

対象・方法

日本母乳バンク協会に提供された母乳のうち、母乳中細菌数が多い、家族に胃腸炎がいた、などの理由のため HP 処理を行わず、研究用に使用してよいと承諾を得た母乳をこの検討に利用した。なお、本研究は昭和大学医学研究科 人を対象とする研究等に関する倫理委員会の承認を得て行った(承認番号: 2714)。

9 名の母親(妊娠 37~40 週で出産した健康な正期産児の母親)から提供された産後 3-9 か月の母乳を用いた。母乳サンプル 9 検体(150mL)を処理前日に 5℃の冷蔵庫にて 15 時間かけて解凍した。解凍後、まず未処理サンプル用に 2.0mL サンプルチューブに分注し、測定日まで-80℃で保存した。残りを MW 処理用 100mL と HP 処理用 50mL に分けた。

MW 処理は、雪印ビーンスターク社製の 100mL 容のガラス製哺乳瓶を使用し、日立社製 MR0-TW1 を用い、母乳 100mL を 500w、40 秒で加熱を行った。HP は低温殺菌機器にて 62.5℃に到達したのち 30 分間 62.5℃にて加温した。MW 処理後ならびに HP 処理後に、それぞれから 2.0ml サンプルチューブに分注し、測定日まで-80℃で保存した。

MW 処理後の母乳温度変化が母乳量 (30mL、50mL、100mL) によって異なるのかを知るために同じ設定 (500W 40 秒) にて MW 処理し、温度を測定した。温度は液面から 0.5 cm と底面から 0.5 cm の 2 か所を測定した。なお、温度計はタニタデジタル温度計 (TT-508N-WH) を用いてそれぞれ 3 検体ずつ測定した。

処理を施した各種母乳を分泌型 IgA(secretory immunoglobulin A:sIgA), リゾチーム, ラクトフェリン, TGF- β 2, 遊離脂肪酸(Non-esterified Fatty Acid:NEFA)について濃度を測定した。sIgA については母乳を超純水にて 10000 倍希釈し、IDK® sIgA ELISA (Immundiagnostik AG 社製) を用い、説明書に従い測定した。リゾチームについては母乳を遠心分離 (800×g, 10min) し、上清の脂肪分を除去後、下層を EIA Diluent にて 100~2000 倍希釈し、AssayMax™ Human Lysozyme ELISA Kit (ASSAYPRO 社製) を用い、説明書に従い測定した。ラクトフェリンについては母乳を遠心 (800×g, 10min) に供し、上清の脂肪分を除去後、下層を MIX Diluent にて 300000 倍希釈し、AssayMax™ Human Lactoferrin ELISA Kit (ASSAYPRO 社製) を用い、説明書に従い測定した。TGF- β 2 については Quantikine ELISA Human TGF- β 2 (R&D systems 社製) を用い、説明書に従い測定を行った。遊離脂肪酸については母乳を超純水にて 5~36 倍希釈した後、NEFA C テストワコー (Wako 社製 CATALOG) を用い、説明書に従い測定した。各成分の吸光度は Ensight™ (Perkin Elmer 社製) を用いて測定した。

殺菌方法の 3 群間での比較には Freidman 検定を行った。事後解析として各殺菌方法間での比較に Conover 検定を行い、p 値は Holm 法を用いて調整を行った。 α エラー 0.05 以下を有意とした。全ての統計解析には software R (ver. 3.6.2) を使用した。

結果 (表 1)

sIgA 値は未殺菌と比較し MW 処理では有意差はなかったが、HP 処理で有意に低下した ($p<0.05$ Fig.1)。

リゾチームは MW 処理前後で未殺菌と比較し有意差はなかったが、HP 処理後には有

意な低下が見られた ($p<0.01$ Fig. 2)。

ラクトフェリンについては MW 処理に関しては未殺菌と比較して有意差は見られなかったが、HP 処理後には未殺菌、MW 処理とくらべて有意に低下が見られた ($p<0.05$ Fig. 3)。TGF- β 2、NEFA に関しては MW 処理、HP 処理ともに前後で濃度変化率の低下は見られなかった (Fig 4, 5)。

MW 処理後の温度 (平均値) : 30ml 入り : 83°C、50ml 入り : 62°C、100ml 入り : 54°C であり、同じ MW 設定でも量が少ないほど温度が上昇した。なお、2 か所での温度差は 3.5~4.5°C であり、液面に近い方が高かった。

考察

超早産児に対して母乳は壊死性腸炎、慢性肺疾患、未熟児網膜症、重症感染症などを予防する薬としての役割がある。このうち、壊死性腸炎予防にかかわる母乳成分としては human milk oligosaccharide (HMO) や上皮成長因子、ラクトフェリンなどが関係している (12)。つまり、疾患予防に関係する生理活性物質が量・機能ともに影響を受けないような処理方法が重要である。

HP 処理は母乳中の免疫グロブリン (IgA、IgG)、酵素 (リパーゼなど)、成長因子 (IGF-1、EPO など)、ラクトフェリンなどを減らす、ある種の成長因子 (上皮成長因子、TGF- β など)、HMO、ビタミン D などには有意な影響を与えないと報告されている (13)。一方、MW 処理は冷凍母乳の解凍には使わないように推奨されているが、その理由は 30 年前の論文にて冷凍母乳の解凍の際に冷蔵庫内で自然解凍した場合と 700W 50 秒間の MW 処理により sIgA 抗体の喪失が大きかったということ (14)、ならびに MW 加温では母乳の温度にばらつきが生ずるということである (15)。Quan らはより低い設定で MW 処理をするならば母乳中の sIgA 抗体に与える影響は少ないことを報告している (16)。また、Ovesen らは MW 処理による免疫グロブリンやビタミン E、ビタミン B1 の喪失はさほど大きくないと推測しており (15)、われわれの結果でも sIgA 値は未殺菌と比べて有意な低下はみられず、先行研究結果を裏付けるものとなった。なお、HP 処理は中央値では未殺菌 1.03 HP0.96 $p=0.04$ と有意差を認めたが、sIgA 値は HP 処理を行っても未殺菌と比較して有意な低下がないという報告もある (17, 18)。ラクトフェリンも HP 処理では有意な低下があることがわかっている (13) が、MW 処理による影響はこれまで報告されていない。

1 なお、リゾチームについては Quan ら (16) が、MW 処理によりリゾチーム活性が低
2 下することを示している。今回の検討では量をみており、活性の評価は行っていないことは、
3 この研究の limitation と考える。酵素であるため、活性は低下すると考えられるが、Quan
4 の報告でも低出力での MW 処理であれば 2 割未満の活性低下に過ぎない。今後、リゾチーム
5 活性についても検討する必要がある。

6 母乳温度のばらつきについては 250mL 容器を使って 200mL を MW 処理した検討で
7 は液面から 0.5 cm の温度と 4 cm の温度の差は 10℃未満であるが、0.5 cm と 8 cm の温度差は
8 15℃に達している (15)。今回の検討においても MW 処理する量により温度変化はことなる
9 ことがわかった。MW 処理後の温度のばらつきについては 100mL であれば 5℃以内であり、
10 許容される範囲と考えられた。

11
12 この研究の弱点として、電子レンジの機種によって母乳の温度変化が異なる可能
13 性があるが、今回一種類しか検討していないことがあげられる。電子レンジ 3 種類を用いて
14 じゃがいもの温度変化を見た報告では、温度変化に違いがあった (19)。ほかの電子レンジ
15 においても母乳成分の影響がみられないのかを改めて検討する必要がある。電子レンジ処
16 理が経母乳感染対策として一般化されるためには、異なる機種であっても 500w 40 秒間
17 の処理が母乳成分に有意な影響を与えないことを示す必要があるだろう。

20 結論

21
22 今回の検討結果から、MW 処理は HP 処理と比較し、母乳成分への影響はなく優れて
23 いると考えられた。

24
25
26 ※著者全員に本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもあ
27 りません。

参考文献

1. Goelz R, Meisner C, Bevot A, et al. Long-term cognitive and neurological outcome of preterm infants with postnatally acquired CMV infection through breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013;98:F430-F433.
2. Brecht KF, Goelz R, Bevot A, et al. Postnatal human cytomegalovirus infection in preterm infants has long-term neuropsychological sequelae. *J Pediatr* 2015;166:834-839.e1.
3. Goetz R, Meisner C, Bevot A, et al. Long-term cognitive and neurological outcome of preterm infants with postnatally acquired CMV infection through breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed* 2013;98:F430-F433.
4. Bonet M, Durox M, Blondel B, et al. Management of mother' s own milk for very preterm infants in tertiary-level neonatal units in the Ile-de-France region in France. *Breastfeed Med* 2014;9:47-48.
5. Ernährungskommission der Österreichischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde, Zwiauer K. Prävention von CMV-Infektionen bei Frühgeborenen durch Muttermilch. *Monatsschr Kinderheilkd* 2009;157:795-797.
6. Hartmann BT, Pang WW, Keil AD, et al. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Hum Dev* 2007;83:667-673.
7. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, et al. Cytomegalovirus(CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res* 2004;56:529-535.
8. Ewaschuk JB, Unger S, O'Connor DL, et al. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol* 2011;31:593-598
9. Hamprecht K, Goelz R. Postnatal cytomegalovirus infection through human milk in preterm infants. *Clin Perinatol* 2017;44:121-130.
10. Liloyd M, Hod N, Jayaraman J, et al. UV-C Inactivation of cytomegalovirus in breast milk using ultraviolet-C irradiation: opportunities for a new treatment option in breast milk banking. *PLOS ONE* 2016;11:e0161116
11. Mikawa T, Mizuno K, Tanaka K, et al. Microwave treatment of breast milk for

- prevention of cytomegalovirus infection. *Pediatr Int* 2019;61:1227-1231.
12. Patel AI, Kim JH. Human milk and necrotizing enterocolitis. *Sem Pediatr Surg* 2018;27:34-38.
13. Peila C, Moro GE, Bertino E, et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutritents* 2016;8:477.
14. Sigman M, Burke K, Sarner O. Effects of microwaving human milk: Changes in IgA content and bacterial count. *J Am Diet Assoc* 1989;89:690-692.
15. Ovesen L, Jakobsen J, Leth T, et al. The effect of microwave heating on vitamins B1 and E, and linoleic and linolenic acids, and immunoglobulins in human milk. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:427-436.
16. Quan R, Yang C, Rubinstein S et al. Effects of microwave radiation on anti-infective factors in human milk. *Pediatrics* 1992;89:667-669.
17. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D. et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr. Res.* 2004;56:529-535.
18. Czank C, Prime DK, Hartmann B. et al. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr. Res.* 2009;66:374-379.
19. 四宮陽子、中町敦子 3種類の電子レンジの温度むらの測定とか熱パターンの画像解析
日本食品工学会誌 2003;4 : 61-68.

表1：ラクトフェリン、Lysozyme、sIgA、NEFA、TGF- β 2 各項目での未殺菌群、MW 群、HP 群での中央値と p 値。

Figure1：sIgA の中央値は、未殺菌で $1.03 \mu\text{g/ml}$ 、MW で $1.02 \mu\text{g/ml}$ 、HP で $0.96 \mu\text{g/ml}$ であった。未殺菌群と比較し MW 群は有意差を認めなかった ($p=0.49$)。HP 群は未殺菌群と比較し有意に低下した ($p=0.04 < 0.05$)。

Figure 2：Lysozyme の中央値は、未殺菌で $419.4 \mu\text{g/ml}$ 、MW で $362.2 \mu\text{g/ml}$ 、HP で $265.8 \mu\text{g/ml}$ であった。未殺菌群と比較し MW は有意差を認めなかった ($p=0.12$)。HP 群は未殺菌群と比較し有意に低下した ($p=0.003 < 0.05$)。

Figure3：ラクトフェリンの中央値は、未殺菌で 2.6mg/ml 、MW で 2.4mg/ml 、HP で 0.5mg/ml であった。未殺菌群と比較し、MW は有意差を認めなかった ($p=0.64$)。HP 群は未殺菌群・MW 群とそれぞれと比較し、ともに有意に低下した ($p=0.04 < 0.05$ 、 $p=0.02 < 0.05$)。

Figure4：TGF- β 2 の中央値は、未殺菌で 1.5ng/ml 、MW で 1.4ng/ml 、HP で 1.6ng/ml であった。未殺菌群、MW 群、HP 群ともに有意差は認めなかった ($p=0.24$ 、 0.36)。

Figure5：NEFA の中央値は、未殺菌で 16.2mEq/L 、MW で 16.6mEq/L 、HP で 14.4mEq/L であった。未殺菌群、MW 群、HP 群ともに有意差は認めなかった ($p=1.00$ 、 1.00)。

Effects of microwave radiation on human milk properties

Objective: Mother's own milk (MOM) is the best nutrition for preterm infants, except for MOM from human cytomegalovirus (HCMV) seropositive mothers. Very premature infants are at a high risk of developing sepsis-like syndrome and cholestasis. Based on our previous findings that microwave (MW) 500W for 40 seconds can be a potential preventive strategy against HCMV transmission, we compared the effects of MW at the same settings *vs* those of holder pasteurization (HP) on the bioactive properties of breast milk.

Study Design: A total of 9 human milk samples were processed by Holder pasteurization (HP), MW 500W for 40 seconds, or no-treatment. sIgA, TGF- β 2, free fatty acid, lactoferrin, and lysozyme concentrations were measured and compared among the three groups.

Results: Concentrations of sIgA, lactoferrin and lysozyme were low after HP, compared to the control. However, we did not find any differences in any of the variables between the control and MW.

1 Conclusion: Compared to HP, MW 500W for 40 seconds minimally impacted the bioactive
2 properties of human milk. Although HP has been considered a gold standard for the
3 prevention of bacterial as well as viral infection via breast milk, MW could be a better
4 candidate.

5

median(min-max)	unpasteurized	microwave	pasteurized	p-value
Lactoferrin (mg/ml)	2.6(1.2-9.2)	2.4(0.3-7.6)	0.5(0.2-3.5)	0.004
Lysozyme (μ g/ml)	419.4(58.3-3394.5)	362.2(51.4-4086.2)	265.8(47.8-3208.4)	<0.001
slgA(mg/ml)	1.03(0.7-2.3)	1.02(0.7-2.3)	0.96(0.6-1.6)	0.013
NEFA	16.2(8.4-32.3)	16.6(5.8-31.8)	14.4(3.9-42.4)	1
TGF- β 2(ng/ml)	1.5(0.6-10.7)	1.4(0.5-10.4)	1.6(0.5-9.8)	0.032

表1

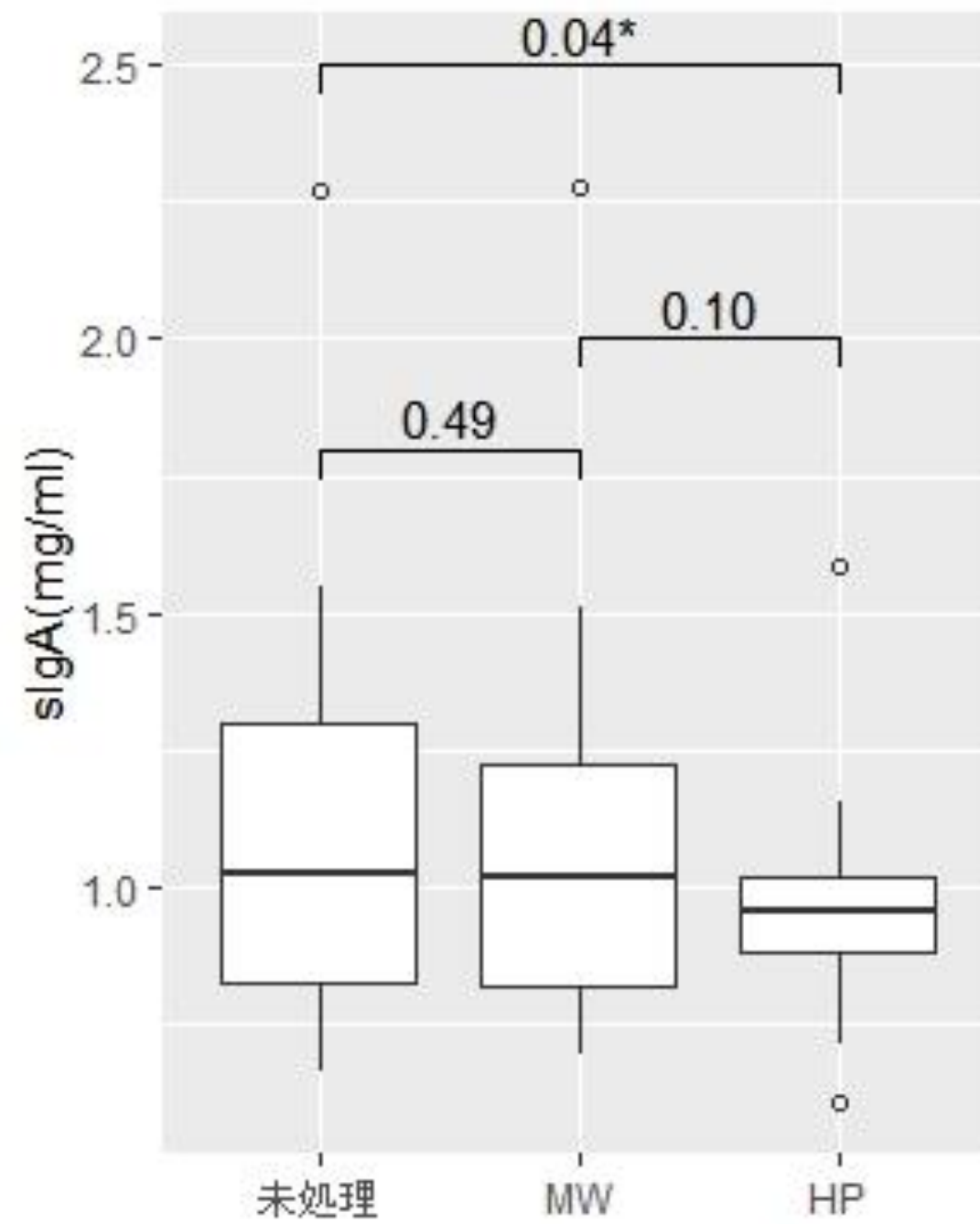


Figure1

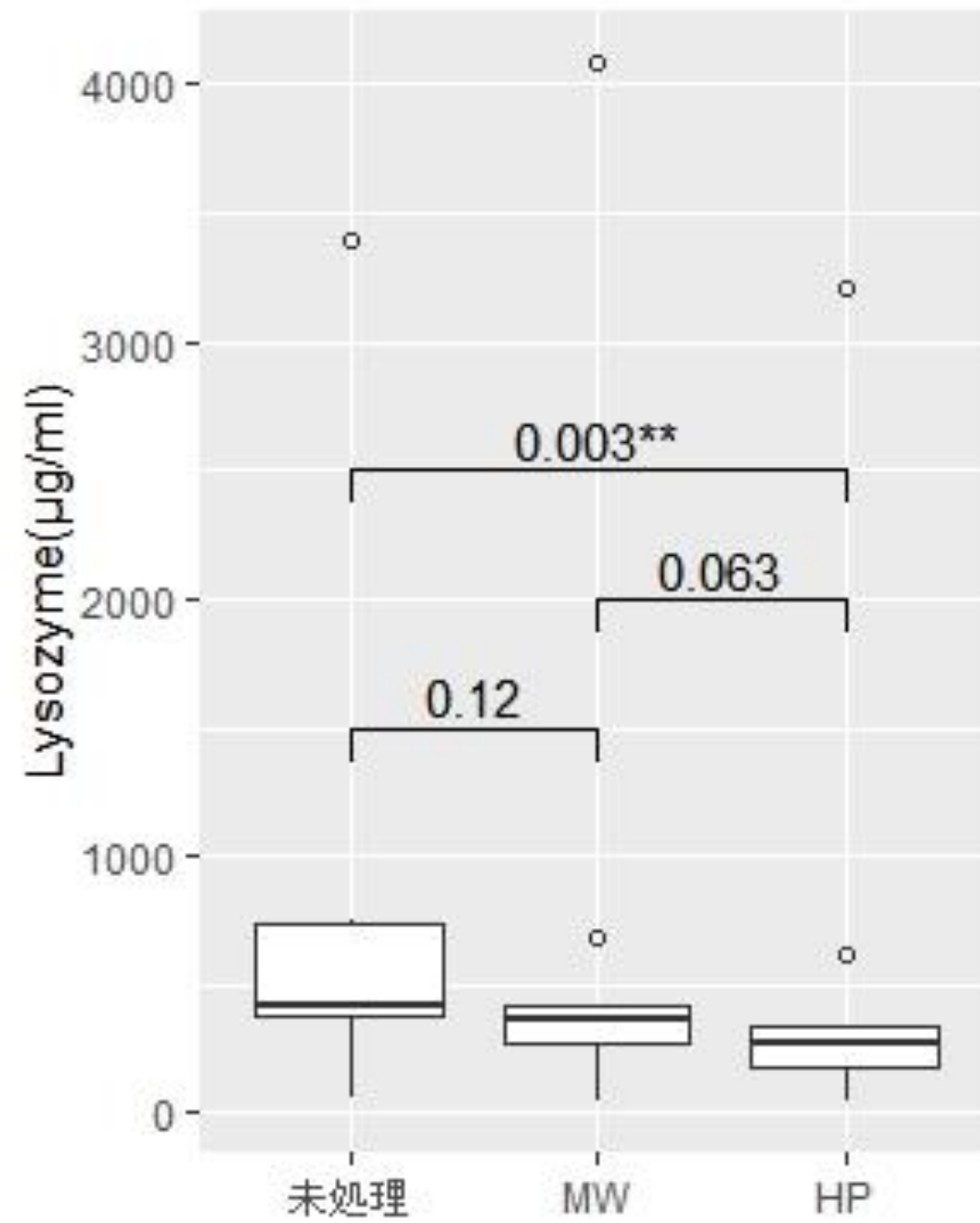


Figure2

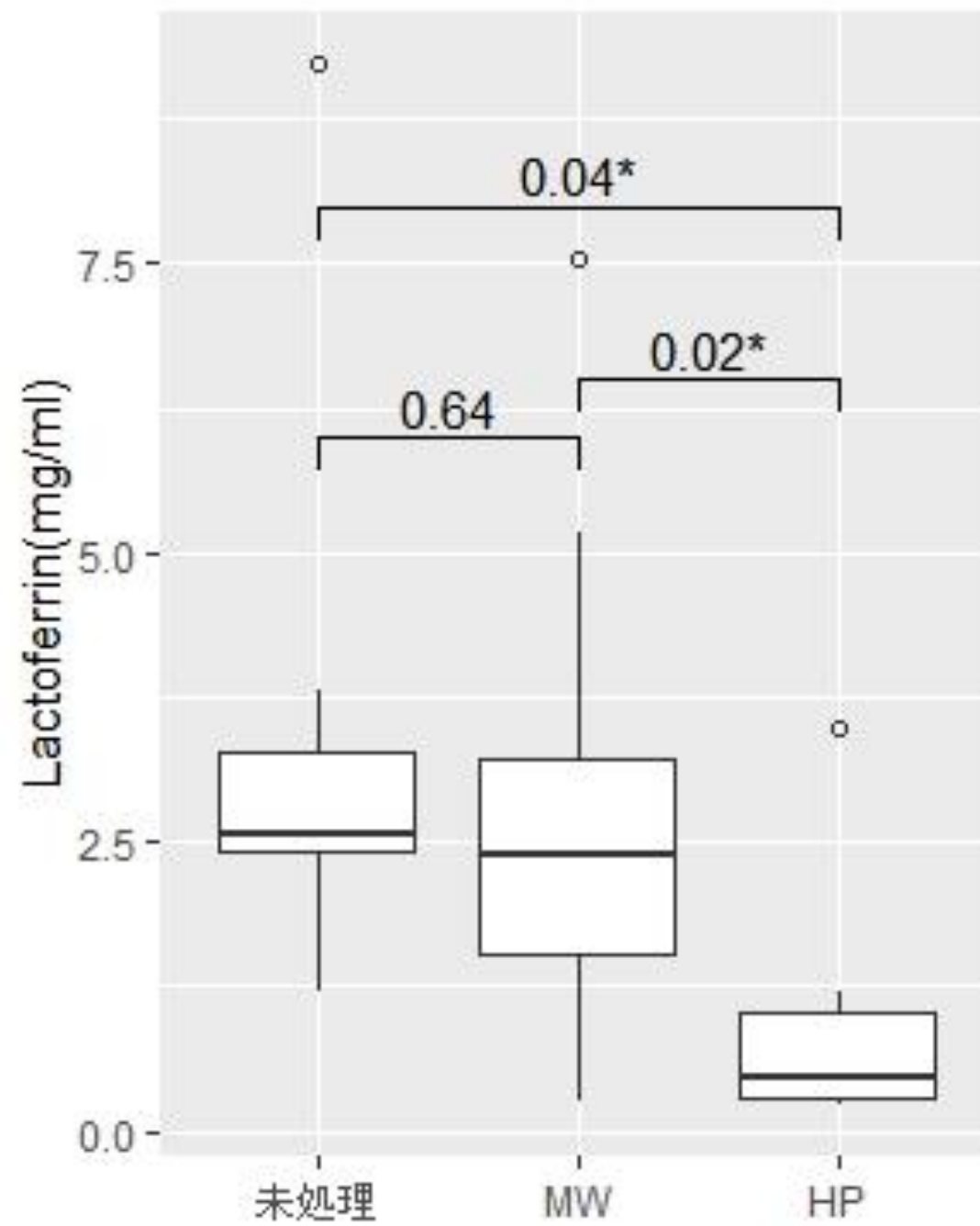


Figure3

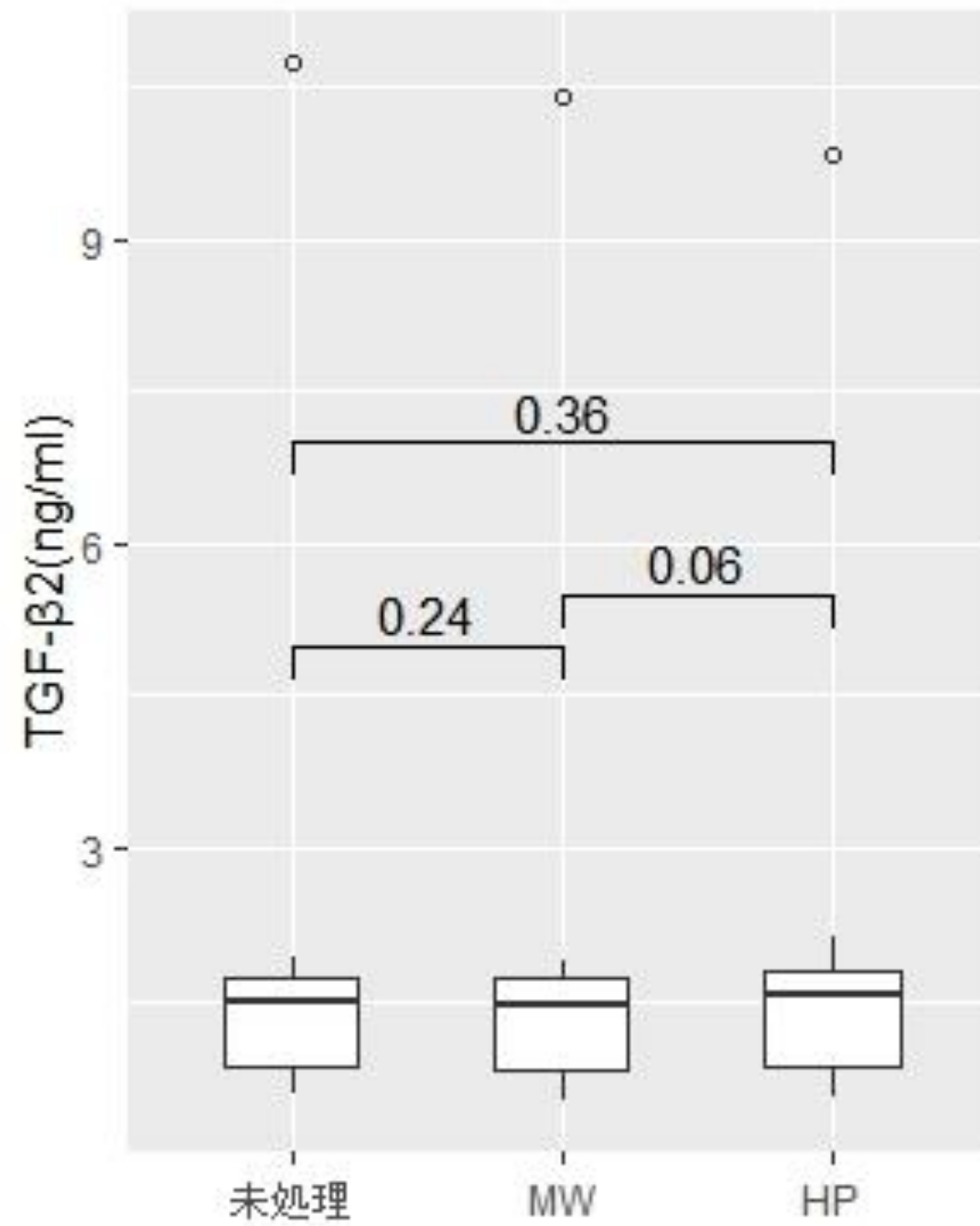


Figure4

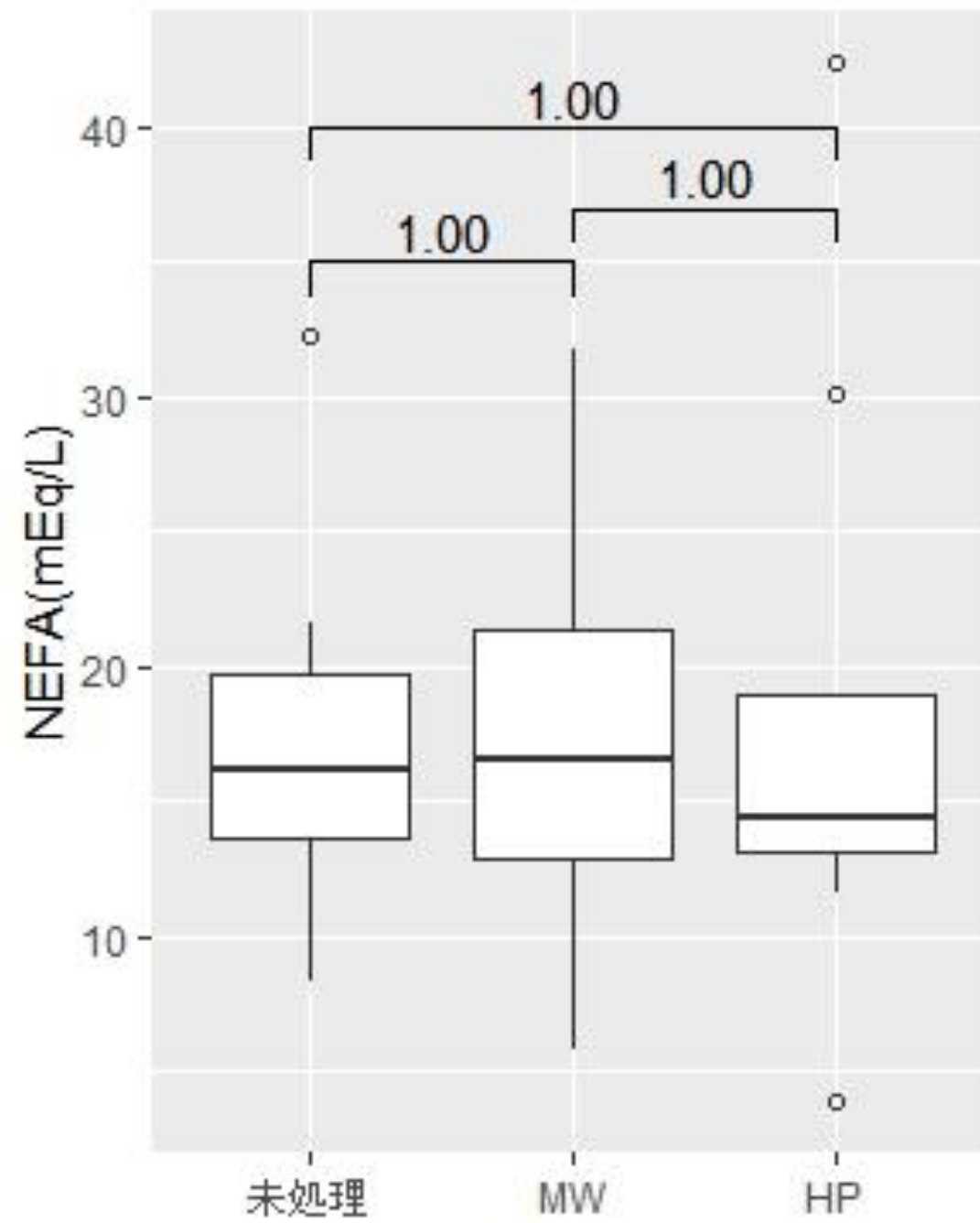


Figure5