

## 6. 感染症予防対策への活用に向けたウシ早期初乳の抗ウイルス効果に関する検討

○柴田ちひろ（秋田県健康環境センター）  
伊藤 隆（秋田県北部家畜保健衛生所）  
加藤真姫子（秋田県畜産試験場）

### 【目的】

手指を介して口や鼻に病原体が持ち込まれる間接触感染は、ウイルス性胃腸炎のみならず、インフルエンザ等の呼吸器ウイルス感染症についても最大の感染要因となっている。そのため、予防には手洗いが有効であり、アルコールを主成分とする手指用消毒剤等の製品が多数市販されている。しかし、構造としてエンベロープを持たないなど、種類によってはこれら市販消毒剤の効果が十分に期待できないウイルスも存在する。その一方で、どのようなウイルスにも効果のある薬剤は手指への侵襲性が強く、日常的な使用には適さない。

ウシの分娩直後の初乳には、様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある<sup>1),2)</sup>。また、分娩後5日以内の早期初乳は食品衛生法により飲用が規制されているため、現状では子ウシに給与される以外は全て廃棄処分されている。そこで、この早期初乳をハンドクリーム等の手指用衛生用品に添加することで、衛生用品に抗ウイルス効果が付加され、間接触感染の簡便な予防対策として活用し得る可能性を考えた。本研究では種々のウイルスに対するウシ早期初乳の不活化効果について検討した。

### 【対象と方法】

#### 1. 対象検体

平成23年10月～平成25年3月までに分娩した秋田県畜産試験場飼養牛17頭、一般酪農農家飼養牛6頭の初乳を対象とした。分娩後24時間を1日として、1～5日目の早期初乳を各日50mL採取し、検査実施まで-30℃で冷凍保存した。

#### 2. 検体の前処理

初乳は解凍後4,500×g、10分の粗遠心を行い、上層の脂肪分を除去した。その後、再度10,000×g、20分の遠心を行い、採取した中間層の乳清を0.45μmのフィルターでろ過滅菌した。粘性が強くフィルター滅菌が不可能であった初乳については、レンネット処理を行い、乳清に代えてホエーを検体とした。

### 3. ウイルス不活化効果の検討

検討対象ウイルスはインフルエンザウイルスとエンテロウイルスとした。インフルエンザウイルスは赤血球凝集抑制試験（HI 試験）、エンテロウイルスはマウスと培養細胞を用いた中和試験によりウイルス不活化効果を検討した。

#### 1) インフルエンザウイルス不活化効果の検討

HI 試験の前処理として、乳清検体に対し RDE 処理とモルモット血球を用いた非特異凝集成分の吸収処理を行った。

前処理後の検体 50  $\mu$  L をリン酸緩衝生理食塩水で 2 段階希釈し、16HA 単位に調製したウイルス抗原液 25  $\mu$  L を添加した。室温で 30 分放置後、0.75%モルモット血球 50  $\mu$  L を添加し、さらに室温で 60 分反応させた後の凝集の有無を判定した。凝集抑制がみられた最終希釈倍率を HI 価とした。試験に用いたウイルス株は表 1 のとおりである。

表 1 HI 試験に用いたインフルエンザウイルス株

型	株名	2012/2013シーズン ワクチン株由来抗血清とのHI価
AH1N1 2009pdm型	A/Akita/05/2013	320倍
AH3型	A/Akita/03/2013	640倍
B型 (Yamagata Lineage)	B/Akita/01/2013	80倍

#### 2) エンテロウイルス不活化効果の検討

動物試験および細胞培養試験には、分娩後 1~5 日目の乳清を等量ずつプールし、1 頭分を 1 検体として試験に供した。各試験の使用ウイルスおよび手順は次のとおりである。

##### ①動物試験（使用ウイルス；A 群コクサッキーウイルス 10 型）

1LD<sub>50</sub> (50%致死量) および 10LD<sub>50</sub> に調製したウイルス溶液と乳清とを等量混合して、37°C で 1 時間反応させた。反応後、1 週齢の乳飲みマウスに 100  $\mu$  L 皮下接種し、1 週間観察した。

なお、本検討は秋田県健康環境センター動物実験管理要綱を遵守し、秋田県健康環境センター動物実験委員会の承認の下で実施した。

##### ②細胞培養試験（使用ウイルス：エンテロウイルス 71 型）

1TCID<sub>50</sub> (50%組織培養感染量) および 10TCID<sub>50</sub> に調製したウイルス株と乳清とを 100  $\mu$  L ずつ等量混合して、37°C で 1 時間反応させた。反応後、HEAJ 細胞（ヒト胎児由来細胞）をシートさせた 48 穴マイクロプレートに、反応液全量と維持培地として E-MEM 培地を 500  $\mu$  L 添加した。乳清の細胞毒性による影響を除去するため、翌日維持培地を交換した後、細胞変性（CPE）の有無を 1 週間観察した。

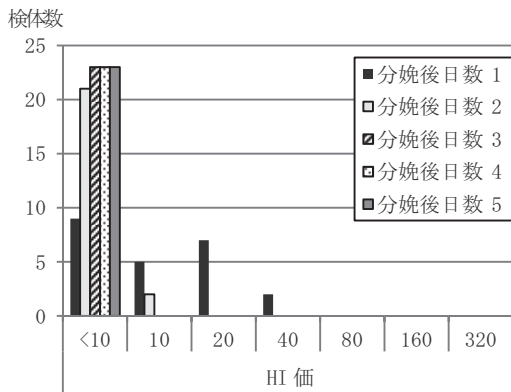


図 1A HI 試験結果  
(AH1N1 2009pdm 型)

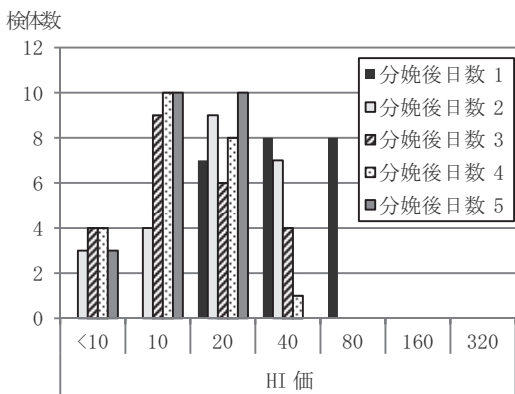


図 1B HI 試験結果 (AH3 型)

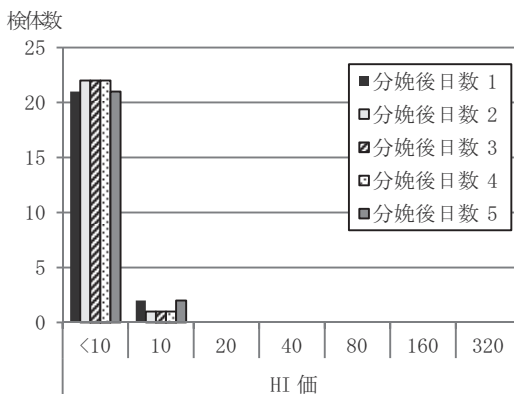


図 1C HI 試験結果 (B 型)

## 【結果】

### 1. インフルエンザウイルス不活化効果の検討

各型に対する HI 試験の結果を図 1A~C に示す。図 1B に示すとおり、AH3 型については 23 頭全てにおいて分娩後 1 日目の乳清で HI 価が確認された。分娩後日数の経過とともに HI 価は低下する傾向にあったが、分娩後 5 日目においても 20 検体が HI 価を有していた。一方、AH1N1 2009pdm 型と B 型は、AH3 型と比較して HI 価を有する検体が少なかった。AH1N1 2009pdm 型については、分娩後 1 日目では 14 検体が HI 価を示したものの、3 日目以降になると 23 頭全ての検体が 10 倍未満であった。B 型については、いずれかの日数で HI 価が確認されたのは 4 頭のみであり、残り 19 頭は全日数をとおして全て HI 価 10 倍未満であった。また 4 頭 7 検体から確認された HI 価も 10 倍と低値であった。

### 2. エンテロウイルス不活化効果の検討 (表 2)

#### 1) マウスを用いた動物試験結果

1LD<sub>50</sub> における死亡率は、対照群が 46.0% (40/87) であったのに対して乳清添加群は 19.6% (18/92) であったのに対して乳清添加群は 19.6% (18/92) であった。10LD<sub>50</sub> における死亡率は、対照群が 89.6% (69/77) であったのに対して乳清添加群は 14.8% (12/81) であり、いずれも乳清添加群で死亡率が低い結果となった。また、ウイルス量を 10 倍にすると対照群では致死率が上昇したのに対して、乳清添加群では変化が見られなかった。なお、生存個体中に後脚の弛緩性麻痺や著しい哺乳低下といったウイルス感染の症状を示す個体は確認されなかった。

#### 2) 細胞培養試験結果

1TCID<sub>50</sub> における CPE 発生率は、対照群が 62.5% (5/8) であったのに対して乳清添加群は 23.9% (22/92) であった。10TCID<sub>50</sub> における CPE 出現率は対照群が 87.5% (7/8) であったのに対して乳清添加群は 54.3% (50/92) であった。

表 2 中和試験によるエンテロウイルス不活化効果検討結果

対象牛		動物試験結果 (死亡数/供試数)				細胞培養試験結果 (CPE出現数/供試数)	
		1LD <sub>50</sub>		10LD <sub>50</sub>		1TCID <sub>50</sub> (対照群：5/8)	10TCID <sub>50</sub> (対照群：7/8)
		対照群	乳清添加群	対照群	乳清添加群		
畜産試験場飼養牛	1	1/4	1/4	2/3	1/3	0/4	0/4
	2	1/3	1/3	2/3	0/3	1/4	1/4
	3	1/3	0/3	1/2	0/3	1/4	1/4
	4	1/3	0/4	2/3	0/3	3/4	4/4
	5	1/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4
	6	1/4	1/4	3/3	0/3	1/4	1/4
	7	2/4	1/4	4/4	3/4	1/4	3/4
	8	1/4	3/4	4/4	0/4	2/4	2/4
	9	2/4	1/4	4/4	3/4	0/4	1/4
	10	2/4	2/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	11	3/4	3/4	4/4	0/4	0/4	2/4
	12	1/4	0/4	3/3	1/3	0/4	1/4
	13	1/3	0/4	3/3	0/3	1/4	3/4
	14	3/4	1/5	3/3	0/4	1/4	3/4
	15	3/4	0/4	3/3	1/3	2/4	3/4
	16	2/4	1/4	3/3	1/4	0/4	1/4
	17	3/4	1/5	3/3	0/3	1/4	3/4
酪農農家飼養牛	18	2/4	0/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	19	1/3	0/4	2/3	0/3	0/4	2/4
	20	2/4	0/4	3/4	0/4	0/4	3/4
	21	1/4	0/4	4/4	0/4	2/4	4/4
	22	2/4	0/4	3/3	1/4	0/4	4/4
	23	3/4	0/4	3/3	0/3	2/4	2/4
計	40/87 (46.0%)	18/92 (19.6%)	69/77 (89.6%)	12/81 (14.8%)	22/92 (23.9%)	50/92 (54.3%)	

【考察】

ウシの早期初乳についてインフルエンザウイルスに対する HI 試験を実施したところ、対象となる型によって大きく異なる結果が得られた。AH3 型については、23 頭全てのウシで分娩後 1 日目の乳清から HI 価が確認され、うち 8 検体は 80 倍とワクチン株由来抗血清に匹敵する値を示した。一方で、他の 2 型に対する反応性は乏しく、とりわけ B 型に対して HI 価を示したのは 4 頭 7 検体のみであり、AH3 型と比較して著しく劣る結果であった。しかし、今回用いた試験方法は、本来ウイルスの性状解析やヒトの血中抗体価測定等を目的としたものであるため、手指汚染で想定されるウイルス量よりもはるかに多い条件下で行われた。また、各型の血球凝集能を 16HA 単位に揃えているものの、株によって血球凝集能には差があることから、実際に含まれているウイルス量は異なっていたものと考えられる。したがって、各型間の反応性の違いは反応対象のウイルス量に起因したものである可能性があり、HI 価の差がそのまま有効性の差であるとはいえない。加えて、A 型および B 型インフルエンザウイルスのウシに対する感染性は未だ確立していないため、今回得られた HI 価は、抗体ではなくラクトフェリン<sup>3)</sup>や酸性ミルクオリゴ糖<sup>4)</sup>等の乳清成分によるも

のであったと推察される。HI 価 10 倍未満であった検体にもこれらの成分は含まれていることから、HI 価の差は含有量の違いによるものである可能性が高く、手指汚染で想定されるウイルス量に対しては十分にウイルス不活化効果が期待できるものと考えられた。

エンテロウイルスに対する動物試験においては、ウイルス量を 10 倍にすると対照群では致死率が 46.0% から 89.6% に上昇したのに対して、乳清添加群では変化がみられなかった。接種した乳清に含まれる成分によってマウスの成長が促され、ウイルスに対する抵抗性が増強した可能性も考えられたが、対照群と乳清群との間で哺乳状況や成育に明らかな差は認められなかった。加えて、細胞培養試験においても乳清群で CPE 出現率の低下が確認されたことから、ウイルスそのものに対する不活化作用があったものと考えられた。

早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加できれば、間接接触感染の簡便な予防対策として活用し得るだけでなく、現在は廃棄処分されている膨大な資源の有効活用にも繋がる。今回の検討から、早期初乳のインフルエンザウイルスとエンテロウイルスに対する不活化効果が確認された。今後は、接触感染によって感染が拡大する他のウイルスに対する効果や、初乳に熱処理等を加えることによる効果の消失の有無など、実現化に向けた更なる検討を重ねていきたい。

#### 【参考文献】

- 1) 牛島廣治, 他: ウシ初乳中の免疫グロブリン成分—特に抗ロタウイルス抗体—の基礎的研究, 感染症学雑誌, **64**, 274-279 (1990).
- 2) Tacket C. O. , et al. : Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*, New Engl. J. Med. , **318**, 1240-1243 (1988).
- 3) Pietrantoni A , et al. : Bovine lactoferrin inhibits influenza A virus induced programmed cell death in vitro, Biometals, **23**, 465-475 (2010).
- 4) 内田健志, 他: ウシ初乳中酸性ミルクオリゴ糖のインフルエンザウイルス感染阻害作用, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 81 (2011).

#### 【経費使途明細】

使 途	金額 (円)
試験用ウイルスおよび細胞培養 (培養用プレート、シリンジフィルター)	80,850
動物実験 (ICR マウス、注射器)	140,658
赤血球凝集抑制試験 (モルモット保存血、96 穴マイクロプレート)	58,800
その他消耗品 (遠沈管、レンネットパウダー等)	20,990
合 計	301,298