〔東京家政大学研究紀要　第40集　(2), p. 45～52, 2000〕

ヒト乳中オリゴ糖組成の泌乳期による変化に関する研究

川名　広子*, 有田　政信*

(平成11年9月30日受理)

Studies on Oligosaccharides Composition in Duration of Human Lactation

Hiroko KAWANA and Masanobu ARITA

(Received on September 30, 1999)

緒　言

今世紀の初めにヒト乳中にラクトース以外のオリゴ糖が単離され[1)], その後, HPLC, GC, MS, NMR などの分析機器類の発展に伴い，ここ30年間で研究が著しく進展してきた[2)~7)]. Kuhn, Montruil らによって，乳中に約130種類もの中・酸性糖が発見・単離され，構造決定されている. これらのオリゴ糖は, D－グルコース, D－ガラクトース, L－フコース, N－アセチルグルコサミン, 酸性糖であるN－アセチルノイラミン酸から構成されている. 更に中性オリゴ糖の基本構造は, (1) Lactose, (2) Lacto－N－tetraose, (3) Lacto－N－neotetraose, (4) Lacto－N－hexaose, (5) Lacto－N－neo－hexaose, (6) para－Lacto－N－hexaose, (7) para－Lacto－N－neo－hexaose, (8) Lacto－N－octaose, (9) Lacto－N－neo－octaose の9種であることも明らかとなっている[1)]. 同時に，乳糖以外の基本構造を持つオリゴ糖は，初乳で高濃度に含まれていること[8)], 他の哺乳動物と比較してオリゴ糖，糖タンパク質や糖脂質といった複合糖質が豊富に含まれていることが認められている.

乳中には9種の基本構造にフコースの結合したフコシルオリゴ糖が存在しているが[9)~12)], これは様々なフコシルトランスフェラーゼつまり，血液型を決定するABO (H) Type や Lewis (Le) Type との関連によって，各個体によって異なるとされている. Lewis 血液で見ると，女性の75%は Le (a+b+) で α－(1－2)－, α (1－4)－フコシルトランスフェラーゼを有し，20%が Le (a+b－) で, α (1－2)－トランスフェラーゼが欠損している. したがって，彼女らのミルク中には Fuc－α (1－2)－Gal 残基をもつオリゴ糖や糖タンパク質は検出されていない. 残りの5－7%の女性は Le (a－b－) で両方のトランスフェラーゼが欠損している. 又，哺乳動物の乳中主要糖質はラクトースであるが，単孔類のそれはフコシルオリゴ糖であるという興味深い報告もある[13),14)]. 一方，酸性のシアル化オリゴ糖は母の血液型とは関係なく存在しているが，これらのオリゴ糖の生理機能については未だほとんど明らかにされていない.

前報において[8),16),24)], 分析機器を用いたウシ及びヒトの初乳あるいは常乳中に含まれる酸性オリゴ糖に関する差異について報告した. 更に，器官や組織あるいは脳の発達が不十分である乳児に何らかの影響を与えていると推測されるヒト乳中オリゴ糖の組成を把握することは，育児用調製粉乳をより母乳成分に近づけるための基礎研究につながると考えられる. そこで，同一人物の乳中オリゴ糖の経時的な量，分子種及び組成の変動について検討を行ったので報告する.

実験材料及び方法

1. 実験材料

ヒト乳試料（出産後6日目～108日目）は，血液型A型の健康な母親（28歳，初産）から供与された. 乳試料は搾乳後, -80℃にて使用時まで保存した. 糖標準として用いた Glucose (Glc) 及び Galactose (Gal) は関東化学株式会社より, α-Lactose (Lac), 3'-Sialyllactose (3'-SL), 6'-SL, Disialyllactose (DSL), 3'-Fucosyllactose (3'-Fuc-Lac), Galactosyllactose (Gal-Lac) は, SIGMA CHEMICAL CO.より購入した. 3'-Sialyllactosamin (3'-SLN), 6'-SLN, 3'-SL (Fuc), SL-N-neotetraosec, 2'-FucLac, Lacto-N-tetraose は明治乳

*　栄養学科　食品学第二研究室

業㈱ライフサイエンス研究所より供与された．又ピリジルアミノ誘導体化試薬は，Glyco-TAG reagent Kit（宝酒造株式会社）を用いた．

2．乳中の粗糖質画分の抽出，分画方法

ヒト乳試料を37℃に加温し，Folch の分配法に基づいて実施した．即ち，各乳試料に5倍量の chloroform-methanol (2:1,v/v) を加え抽出・分配を行った．遠心後，上層（水溶性画分）を集め濃縮・凍結乾燥して粗糖質画分とし，イオン交換カラムクロマトグラフィーの試料とした．イオン交換クロマトグラフィーは DEAE-Sepharose CL-6B カラム (40×2.6㎝ I.D., Pharmacia Biotech) によって行った[15]．カラムは，10mM 酢酸ピリジン緩衝液 (pH5.0) で平衡化し，試料添加後，流速 1.0ml/min, 分画容量 3.5ml, 5℃の低温庫内で 10mM 酢酸ピリジン緩衝液 (pH5.0) 750ml と 1300mM 酢酸ピリジン緩衝液 (pH5.0) 750ml でリニアグラジエント溶出を行った．各溶出画分は，レゾルシノール塩酸法によってシアル酸，フェノール硫酸法によって全糖の検出を行った．得られた酸性オリゴ糖画分を凍結乾燥し，TLC 分析及びピリジルアミノ (PA) 誘導体として HPLC 分析を行った．一方，中性糖画分は凍結乾燥を行い，重量を測定し，母乳試料 1ml あたりの中性糖の重量を求めた．同様に得られた酸性オリゴ糖を凍結乾燥し，重量を測定し，試料乳 1㎖ あたりの各画分の酸性オリゴ糖量を求めた．イオン交換カラムクロマトグラフィーによって得られた酸性糖質画分を前報[8),16),17)]に従って TLC 分析を行い，全糖，シアル酸，ディットマー法[18)]によるリン酸基の検出を行った．

3．HPLC による PA-糖鎖構造の解析

乳試料よりイオン交換カラムクロマトグラフィーによって得られた酸性オリゴ糖画分及び糖標準を Glyco TAG（宝酒造㈱）を用いて糖鎖の還元末端に2-aminopyridine を還元アミノ化反応で結合させ蛍光誘導体（PA-糖鎖）とした[19)]．PA-オリゴ糖サンプル及び糖標準を，前報と同様に CLASS-LC10（島津製作所）HPLC 装置で2種類のカラムを用いて分析し糖鎖構造解析を行った[8),12)]．その際，PALPAK Type S カラムで分析を行い HPLC フラクションコレクターで各ピークを分取し，N_2 乾固させ，更に PALPAK Type N で分析し，保持時間を X 軸，Y 軸にそれぞれプロットし2次元糖鎖マップを作成した．座標表面上の糖標準の溶出位置により試料の糖鎖構造を推定すると同時に，ヒト乳の泌乳期による酸性オリゴ糖の特徴及び差異を検討した．

結　果

1. 乳中の粗糖質画分，中性及び酸性オリゴ糖画分の泌乳期による変動

Folch の分配法によって抽出した粗糖質画分の泌乳期による変動を Fig. 1 に示した．粗糖質画分の割合は約 6. 3%で泌乳期による大きな変化は認められなかった．

粗糖質のうち，中性糖が約 80% (data not shown)で，泌乳期の経過による量的な大きな変化は認められなかった．一方，粗糖質画分のうち酸性オリゴ糖の示す割合を Fig. 2 に示した．出産後 6 日目が最大で約 7%，その後泌乳期の経過とともに減少し，11 日目には 6 日目の約 60%の 4.2%，28 日目には 6 日目の約 30%の 2.1%に減少した．50 日目には 6 日目の 10%以下である 0.6%まで更に減少した．

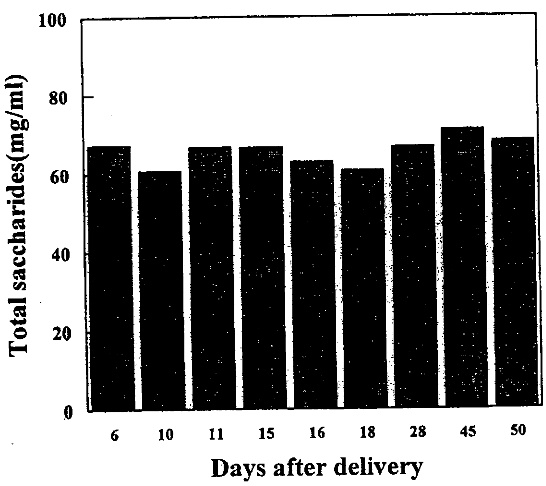

Fig.1 Variations in total oligosaccharides from human milk during lactation

2. イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画

各泌乳期における一定量の粗糖質画分を試料とし，イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い，シアル酸及び全糖の発色を行った．クロマトグラムの結果から，モノシアロ画分を FB (Fraction B)，ジシアロ画分を FC (Fraction C)，それ以外の画分を Others (Fraction A, Fraction D) として分画し，凍結乾燥，重量測定を行った．その結果，モノシアリルオリゴ糖が酸性糖中の約 60－70%

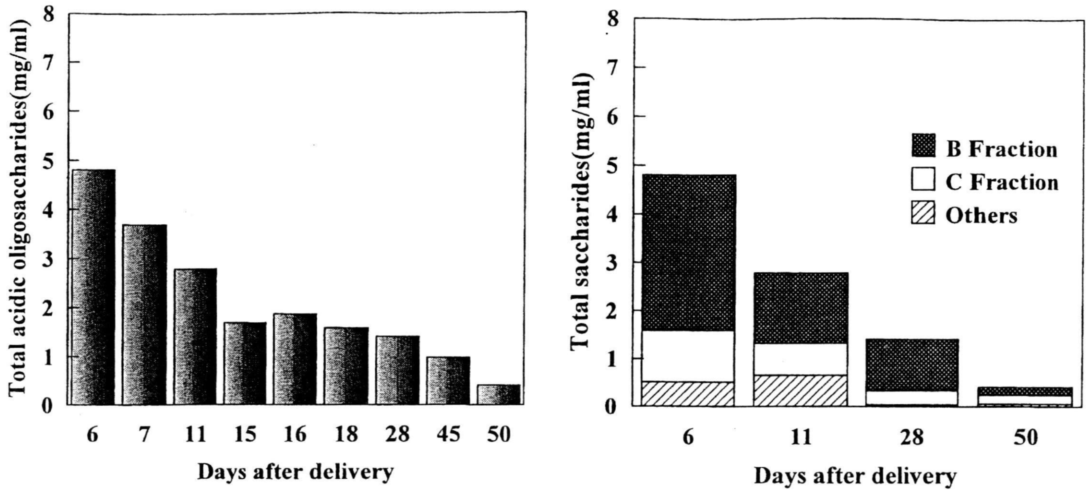

Fig.2 Variations in acidic oligosaccharides from human milk during lactation

を占め，主成分であった．次に，ジシアリルオリゴ糖が約20－30％を，そしてその他が約1－10％を示した．各画分の泌乳期による変動については，モノシアロ画分は10日目以降に急激に減少し50％以下となり，その後緩やかに減少した．ジシアロ画分の場合は泌乳期を経るごとに緩やかに減少した．

3. 薄層クロマトグラフィー及び二波長デンシトメーターによる各糖質画分の分析

一定量の総酸性オリゴ糖画分を，TLC及び二波長デンシトメーターによる全糖及びシアル酸の検出を行った．レゾルシノール塩酸試薬によるシアル酸検出の結果をFig. 3に，二波長デンシトメーターによって測定しピー

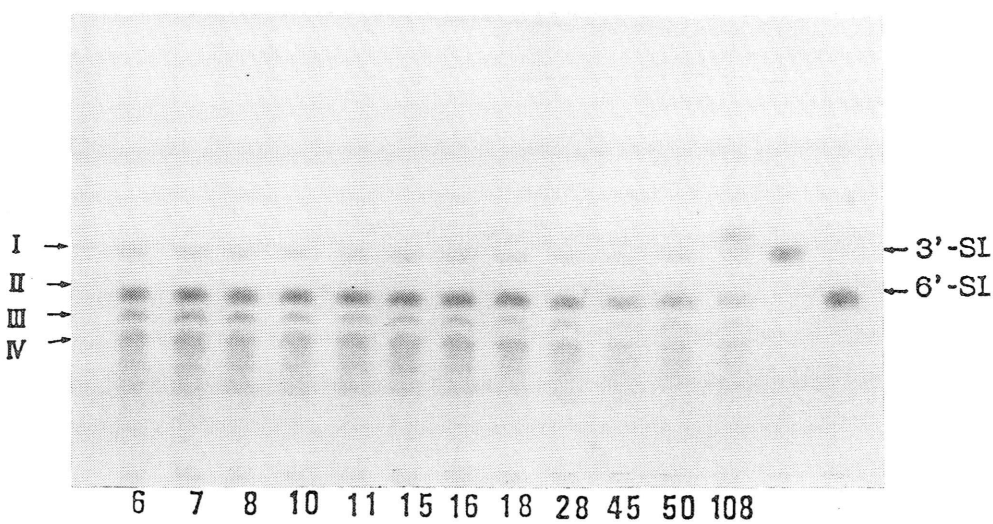

Fig.3 Thin layer chromatogram of sialyl oligosaccharides from human milk during lactation (6-108 days after delivery)
Developing solvent;EtOH:n-BuOH:Pyridine:Water:AA(100:10:10:30:3,v/v/v/v/v)
Visualized reagent;Resorcinol-HCl reagent

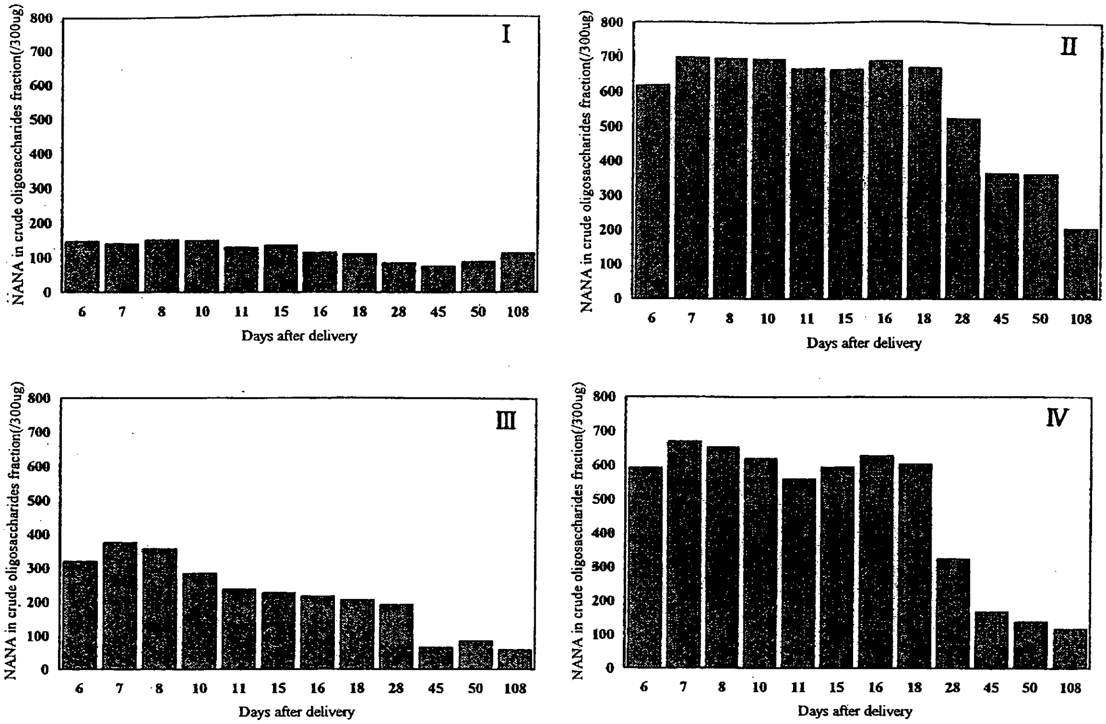

Fig.4　Variations in 3’-SL,6’-SL and other acidic oligosaccharides during lactation

ク面積を算出した結果を Fig. 4 に示した．TLC による分析結果，全泌乳期を通して 6’-SL 画分（Ⅱ）が酸性オリゴ糖の主要成分であった．出産後 6日目は，6’-SL が主成分であり，その他に 3’-SL，未知物質 3 種が認められた．

酸性オリゴ糖のうち，（Ⅰ）3’-SL は（Ⅱ）6’-SL の 20% 含有され，泌乳期によって大きな変動が認められなかった．主要成分である 6 ’-SL は 30 日目以降から約 50％に減少した．（Ⅲ）画分は出産後一週間で増加しその後一定量を保持し，30 日目以降から約 50%に減少した．（Ⅳ）画分は出産後一週間は高い値を示し，その後 10 日目に減少し，15 日目に再度増加し，30 日後には約 50％に減少した．又リン酸基を含む酸性オリゴ糖はほぼ全泌乳期で確認された．

4. HPLC と 2 次元糖鎖マップによる糖鎖の解析

イオン交換カラムクロマトグラフィーによって得られた酸性オリゴ糖画分を凍結乾燥後，PA 誘導体とし，HPLC 分析を行った．出産後 6，11，28，50 日目の母乳について分析し，更に，標準糖鎖及び各泌乳期の PA－糖鎖を 2 種のカラムで分析した結果を 2 次元糖鎖マップとして表し（Fig. 5)，泌乳期における糖鎖構造の変化について検討を行った．

全泌乳期中の酸性オリゴ糖は，(1) 低分子の 3 糖のスポット，(2) 中程度の 5－6 糖，(3) 高分子の 8－10 糖の 3 つのエリアに大きく分かれることが判明した．モノシアロ画分である FB 画分のオリゴ糖は 3 つのエリアに分けられ，ジシアロ画分の FC のオリゴ糖は (2)，(3) に分けられた．又，FD は (3) にのみ含有された．泌乳期を経るごとに全体的に酸性オリゴ糖含量が大きく減少した．そして，分子種も徐々に減少していることが明らかとなった．イオン強度の強い FD のスポットは 50 日目にはほぼ消失した．FC 及び FD に含有される (2) (3) エリアのオリゴ糖は 28 日目以降に量的に極端に減少した．

二次元糖鎖マップ及び MALDI-TOFMS, FABMS の結果からミルク中の微量成分の推定糖鎖構造を Table 1 に示した．sialyl－lacto－N－hexaose，sialyl－lacto－N－fucoheptaose，sialyl－lacto－N－tetraose，trisialyl－lacto－N－heptaose は，11 日目に最大の濃度を示し，これらの含有量は泌乳期を経るごとに減少した．disialyl－lacto－

N－tetraose は 49 日間すべての泌乳期において認められた．つまり，酸性オリゴ糖量は，出産後 1 週間の初乳で最大量を示すが，分子種は 11 日目に一番多く含有され，泌乳期を経るごとに分子種，量ともに顕著に減少することが認められた．

考　察

ヒト乳中に含まれる糖質は，約 6.3％であり，出産後 3 ヶ月間ほぼ一定であった（Fig. 1）．D. Viverge, G. V. Coppa らは出産後 3 ヶ月の間で高分子の中性糖質が減少し，Lactose が増加し，総糖質量は徐々に増加するという報告をしているが[21),22)]，本分析結果では粗糖質の

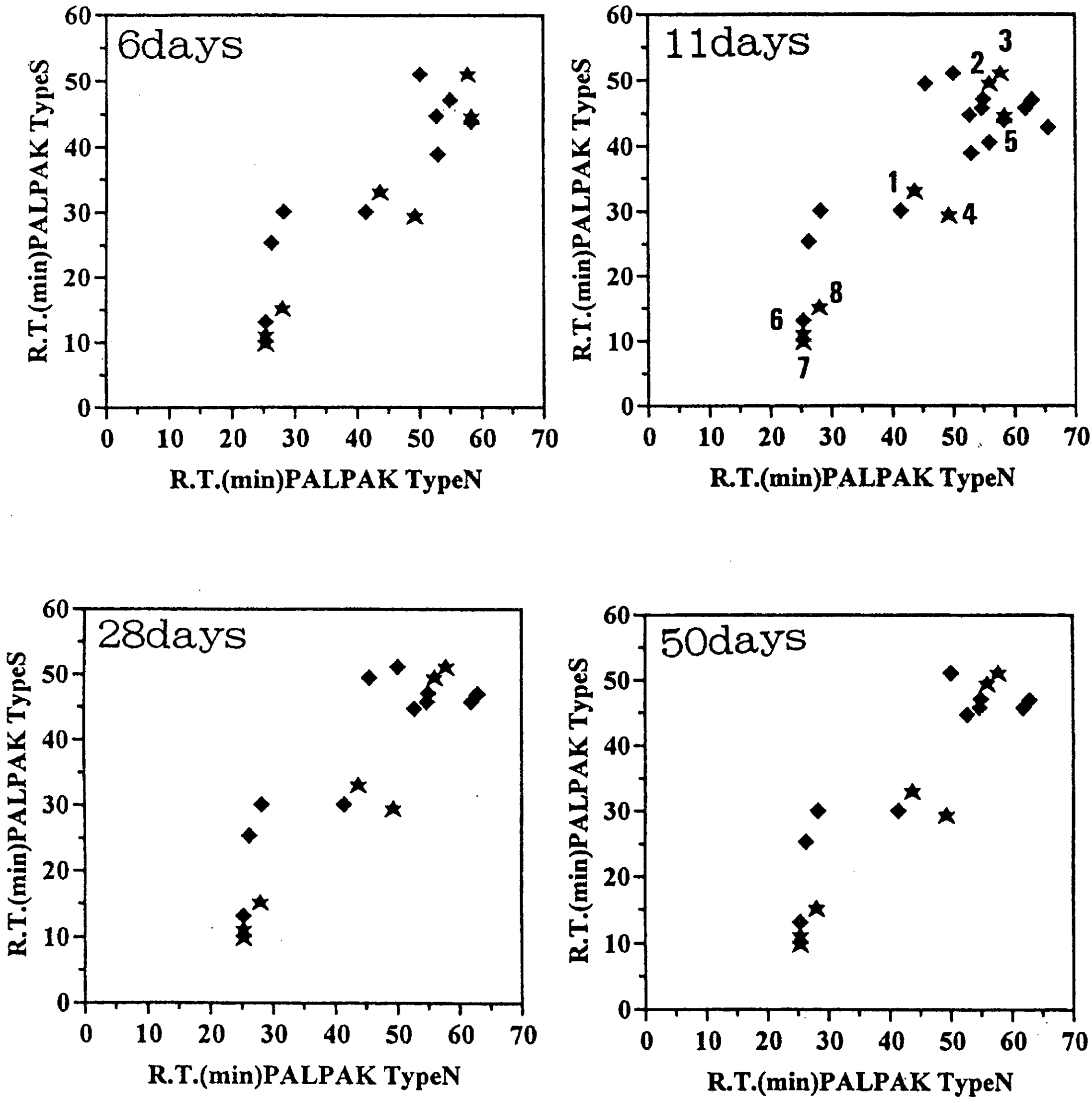

Fig.5　Two-dimensional sugar maps of acidic oligosaccharides from human milk during lactation
1:sialyl-lacto-N-tetraose,　2:silyl-lacto-N-hexaose
3:sialyl-lacto-N-fucoheptaose,　4:disialyl-lacto-N-heptaose
5:trisialyl-lacto-N-heptaose,　6:3'-SL,　7:3'-SLN,　8:6'-SL

Table 1　Estimation of oligosaccharides structure by HPLC and MS

name	structure
1: sialyl-lacto-N-tetraose	**NANA-Gal-GlcNAc-Gal-Glc-PA**
2: sialyl-lacto-N-hexaose	**NANA-Gal-GlcNAc＼** **Gal-Glc-PA** **Gal-GlcNAc ／**
3: sialyl-lacto-N-fucoheptaose	**(Fuc)+ NANA-Gal-GlcNAc＼** **Gal-Glc-PA** **Gal-GlcNAc／**
4: disialyl-lacto-N-heptaose	**NANA-NANA-Gal-GlcNAc-Gal-Glc-PA**
5: trisialyl-lacto-N-heptaose	**NANA-Gal-GlcNAc＼** **Gal-Glc-PA** **NANA-Gal-GlcNAc ／** **／** **NANA**
6: 3'-SL	**NANA α 2-3Gal β 1-4Glc-PA**
7: 3'-SLN	**NANA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-PA**
8: 6'-SL	**NANA α 2-6Gal β 1-4Glc-PA**

83.3%が中性糖質であり，それらの量に大きな変動が認められなかった．一方，酸性オリゴ糖の量は粗糖質画分のうち6日目で約7%，11日目で4.2%，28日目で2.1%，50日目には1%以下で顕著な減少が認められた．更に酸性糖質を分画すると，モノシアリルオリゴ糖が約60－70%，ジシアリルオリゴ糖が約20－30%，その他約1－10%であった．各成分の泌乳期変動については，モノシアロ画分は6日目に3.22mg/ml，10日目に急激に減少し1.46mg/ml，その後徐々に減少し50日目には0.23mg/mlとなった．ジシアロ画分の場合は6日目には1.07mg/ml，10日目には0.67mg/ml，50日目には0.18mg/mlと緩やかに減少した(Fig. 2)．また，6日目～8日目の画分はそれ以降と比較してシアル酸量に比べ全糖量が多いことから高分子酸性オリゴ糖が多く含有されていることが予測された．これらのことから，泌乳期の経過とともに糖鎖が低分子化しているものと考えられた．

酸性オリゴ糖画分をTLCによって分析を行った結果(Fig. 3，4)，全泌乳期を通して6'－SL画分(Ⅱ)が酸性オリゴ糖の主要成分であり，30日目以降には初乳の約50%に減少した．しかしながら，3'－SL(Ⅰ)は6'－SLの20%含有され，泌乳期によって大きな変動が認められなかった．井戸田らは，ヒト乳中の酸性オリゴ糖の主成分である6'-SL，3'-SLの含量は，出産後3～5日目では73.8mg/100ml (6'-SL)，17.1mg/100ml (3'-SL)，241～482日目では12.8mg/100ml (6'-SL)，15.0mg/100ml (3'-SL)と報告しており[23]本研究も類似した結果となった．哺乳動物の種類によって主要酸性糖質が異なることから，6'-SLにはヒト乳児に対して重要な生理機能を有していることが強く示唆された．

泌乳期中の 酸性オリゴ糖の特徴を2次元糖鎖マップによって検討すると(Fig. 5)，(Ⅰ)低分子の3糖のスポット，(Ⅱ)中程度の5－6糖，(Ⅲ)高分子の8－10糖の3つのエリアに大きく分かれた．ヒト乳の特徴としては，ウシ乳に認められる低分子でイオン強度が高いスポットがなく，高分子でイオン強度が強い糖鎖が多く含有されていた．二次元糖鎖マップ及びMALDI-TOFMSを用いた機器分析[24]結果から得た微量成分の構造を推定した(Table1)．イオン強度の強いtrisialyl－lacto－N－heptaoseは28日目には消失し，sialyl－lacto－N－hex-aose，sialyl－lacto－N－fucoheptaose，sialyl－lacto－N－tetraoseは，

11日目に最大の濃度を示し，これらの含有量は泌乳期を経るごとに減少した．disialyl－lacto－N－tetraose は49日間すべての泌乳期において認められた．よって，酸性オリゴ糖の分子種は出産後11日目に最も多く含有され，泌乳期を経るごとに顕著に減少することが認められた．

乳中糖質の構成糖の1つであるシアル酸は，インフルエンザウイルスや大腸菌の細胞への付着阻止，コレラトキシン及び大腸菌のエンテロトキシンに対する中和作用に関与している[25]と考えられているが，その他にもビフィズス菌の増殖活性や中枢神経系の器官形成と機能発達，大脳と小脳のガングリオシドや糖蛋白に含まれるシアル酸含量の増加による学習効果の向上などにも関与している[26),27]ことが示唆されている．ヒト乳児は脳のガングリオシド濃度を上昇する2つの重要な時期があり，1つは胎児期の3ヶ月，もう一つは生後約8ヶ月までの時期である．Morgan, Carlson らはラットに脳ガングリオシド構成の発達が著しい時期にシアル酸の腹腔内投与を行ったところ，脳ガングリオシド及び糖タンパク質中のシアル酸濃度が上昇したと報告している[26),27]．又，細胞培養へガングリオシドを添加すると神経の伸展を高め，中枢神経の再生を刺激するという報告[28]もある．

上述のように，乳中の生理活性物質の機能研究が進む一方，近年では母体及び母乳中のダイオキシン類や農薬の乳幼児への影響にも関心が集められている．生後3－4ヶ月以内に6－7％もの乳児がアトピー性疾患になり，しかも3歳児の発症率は母乳栄養児が最も高く10％，混合乳栄養児が8.4％，調製粉乳栄養児が6.3％という結果[29]も報告されている．食物連鎖の最上位にいるヒト，その中でも感受性が強く，生体機能が未熟かつ免疫機能が十分発達していない胎児や乳児への影響が深刻である．哺乳動物であるヒトは，生理機能や免疫機能を調節する因子を生体内で合成するための材料となる食品つまり母乳を乳児に与えることが必須である．乳中酸性オリゴ糖の構造解析や生理活性を検討するだけでなく安全な母乳を与える環境を考えることも重要となってきている．

今後，検体数を増やして乳中酸性オリゴ糖の経時的変化や日内変動を追っていくことはとても興味深い．初乳中に含有されているヒト乳特異的な高分子オリゴ糖・酸性オリゴ糖の構造及び生理学的機能の解析を更に進展させていく予定である．

謝　辞

本研究の実験にご協力頂いた食品学第二研究室の小山順子さん，赤堀仁美さん，石川浩美さんに感謝致します．

参考文献

1）Renner：Micronutrients in Milk and Milk based Food Products, 192－197（1989）
2）S. Hase, T. Ilkenaka and Y. Matsushima：*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 257－263（1978）
3）K. Ohara, M. Sano, A. Kondo and I. Kato：*J. Chromat.*, **586**, 35-41 (1991)
4）W. T. Wang, N. C. Jr. Dedonne, B.Ackerman and C. S. Sweely：*Anal. Biochem.*, **141**, 366-369 (1984)
5）H. S. Aparna, P. V. Salimath：*Carbohyd. Res.*, **268**, 313－318 (1995)
6）S. Fievre, J. M. Wieruszeski, J. C. Michalski, J. Lemoine, J. Montreuil and G. Strecher：*Biochem. Biophys. Res. commun.*, **177** (2), 720－725 (1991)
7）T. Urashima, T. Saito, Y. Taneda, T. Takasawa：*Biochim. Biophys. Acta,* **1200**, 64－72 (1994)
8）川名広子，齋藤尚子，有田政信：東京家政大学紀要，**38**, 51－57（1998）
9）E. EGGE, A. DELL and H. V. Nicolai：*Arch. Biochem. Biophys.*, **224** (1), 235－253 (1983)
10）N. Sharon：複合糖質，131－141（1990）
11）H. Kitagawa, H. Nakada, S. Fukui, I. Funakoshi, T. Kawasaki, I. Yamashina, S. Tate and F. Inagaki：*J. Biochem.*, **114**, 504－508 (1993)
12）G. Gronberg, P. Lipniunas, T. Lundgren, F. Lindh and B. Nilsson：*Arch. Biochem. Biophys.*, **296** (2), 597－610 (1992)
13）M. Messer, 浦島匡：化学と生物，**33** (12), 816－824 (1995)
14）J. Amano, M. Messer and A. Kobata：*Glycoconjugate J.*, **2**, 121－135 (1985)
15）J. Parkkinen and J. Finne：*Methods Enzymol.*,

138, 289－300 (1987)
16) 有田政信，川名広子：東京家政大学研究紀要，**36**, 17－24 (1996)
17) K. Ohara, M. Sano, A. Kondo, and I. Kato : *J. Chromato.*, **586**, 35－41 (1991)
18) 滝　孝雄：新生化学実験講座 "脂質Ⅲ-糖脂質-" 135－151 (1990)
19) P. V. Nikrad, M. A. Kashem, K. B. Wlasichuk, G. Alton and P. Venot : *Carbohyd. Res.*, **250**, 145-160 (1993)
20) D. S. Newburg, P. F. Daniel, N. E. O' Neil and R. H. McCluer : Human Lactation **2**, 581－588 (1986)
21) G. V. Coppa, O. Gabrielli, P. Pierani, C. Catassi, A. Carlucci and P. Giorgi : *Pediatrics*, **91** (3) 637－640 (1993)
22) D. Viverge, L. Grimmonprez, G. Cassanas, L. Bardet and M. Solere : *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **11**, 361－364 (1990)
23) 井戸田正，松岡康浩，中埜拓，川上浩，中島一郎：日本栄養食糧学会誌，**47** (5), 363－367 (1994)
24) 川名広子，有田政信：東京家政大学研究紀要，**39**, 23－29 (1996)
25) C. Kunz and S. Rudolff : *Acta Pædiatr*, **82**, 903－12 (1993)
26) S. E. Carlson and S. G. House : *Am. Inst. Nutr.*, **116**, 881－886 (1986)
27) BLG. Morgan, M. Winick : *J. Nutr.*, **110**, 416－424 (1980)
28) S. Tsuji, M. Arita, Y. Nagai : *J. Biochem.*, **94**, 303－306 (1983)
29) 小栗秀，竹内誠：化学と生物，**37** (2), 80－84 (1999)

Abstract

In this study, we have analyzed neutral and acidic oligosaccharides composition in duration of human lactation. Human milk samples were obtained within 6-108 days after parturition from a healthy woman and crude oligosaccarides fraction was prepared with Folch's partition method. These fractions were analyzed and purified by TLC and column chromatographs, and oligosaccharides structures were presumed by two dimensional sugar map method with HPLC.

66mg/l crude saccharide was contained in human milk through 3 months of lactation. Acidic oligosaccharides content decreased from 7% of the total carbohydrate on 6th day to 1% on 50th day. 6'-sialyllactose (6'-SL) of major acidic oligosaccharides of human milk was decreased to 60% on 30th day. Sialyl-lacto-N-hexaose, sialyl-lacto-N-fucoheptaose, sialyl-lactoN-tetraose, disialyl-lacto-N-heptaose, minor components of milk, showed the highest concentration on 11th day and these oligosaccharides concentration was decreasing day by day. On the other hand, trisialyl-lacto-N-heptaose was recognized only in colostrum (6th and 11th day) by HPLC. Acidic oligosaccharides were classified into three groups, (Ⅰ) trisaccharide, (Ⅱ) penta- and hexasaccharide, (Ⅲ) octa- and decasaccharide over 3 months of lactation from the result of two-dimensional sugar map.