

## ウシ初乳及び常乳中のオリゴ糖組成の ピリジルアミノ化分析法による比較

有田 政信, 川名 広子

(平成7年10月12日受理)

## Comparison of Oligosaccharides in Bovine Colostrum and Mature Milk by Pyridylamination Method

Masanobu ARITA and Hiroko KAWANA

(Received October 12, 1995)

### 緒 言

一般哺乳動物乳に含まれる糖質は、ほとんどが乳糖 (Gal  $\beta$ 1-4Glc; Lac) であることが知られているが、他の微量糖質中に多数のオリゴ糖分子種を含有していることも認められている。これらの微量オリゴ糖組成及び分子種は、泌乳時期によって異なり、とりわけ初乳 (出産後約1週間) と常乳では大きな差異が認められ、それらの生体内での役割が注目されている (1-4)。

ウシ初乳中の中性オリゴ糖は、最近までにLac以外に8種; Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc, GalNAc  $\beta$ 1-4Glc, Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc, Gal  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc, Gal  $\beta$ 1-6Gal  $\beta$ 1-4Glc, Gal  $\beta$ 1-4 [Fuc  $\alpha$ 1-3] GlcNAc, GalNAc  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc, Gal  $\beta$ 1-3 [Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-6] Gal  $\beta$ 1-4Glc の存在が確認されている (5-7)。これらの中性オリゴ糖の生体内での役割は現在までほとんど明らかとなっていないが、Gal  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc やGal  $\beta$ 1-6Gal  $\beta$ 1-4Glc (3'-や6'-ガラクトシルラクトース) と末端Galの結合位置の異なるGal  $\beta$ 1-4Gal  $\beta$ 1-4Glc (4'-ガラクトシルラクトース) には、腸内細菌であるビフィズス菌の増殖活性が認められ調製粉乳に添加されて一般に市販されている (8, 9)。

一方、シアル酸 (NeuAc; N-アセチルノイラミン酸, NeuGc; N-グリコリルノイラミン酸) の結合した酸性糖質も、8種; NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal, (o-acetyl-)NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4Glc, NeuAc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4Glc,

NeuGc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4Glc, NeuGc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4Glc, NeuAc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc, NeuGc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc, NeuAc  $\alpha$ 2-8NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4Glc等が報告 (10) されているが、これらの生理活性については未だ明確にされていない。これらのウシ乳中に含まれる中・酸性糖質は、出産後急速に減少して常乳では非常に微量となって99%以上が乳糖となっている。この様に初乳と常乳で大きく存在する分子種及び含有量が異なること、さらに乳腺上皮細胞中の糖転移酵素によって乳糖を主たる受容体として生合成されていることを考え合わせれば、乳児に対する生理的重要な役割を果たしていると考えられる。

乳中に含まれ現在までに明らかにされている生体調節機能物質の主な物質としては、タンパク質であるカゼインフォスフォペプチド、ラクトフェリンやラクトパーオキシダーゼ等がある。これらは、微生物感染防御・殺菌作用やヘモグロビン値、赤血球数およびヘマトクリット値を改善する鉄吸収促進作用等 (11) が見いだされている。しかしながら、微量含有糖質成分については未だ構造解析やそれらの生体内での役割が明確でないオリゴ糖が多種含有されている。

最近、細胞表面の糖タンパク質や糖脂質糖鎖構造の解析方法が種々開発され、糖鎖の構造解析が従来に比較して非常に早くかつ高感度で行えるようになった。これらの一つの方法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による糖鎖の解析方法があるが、高感度で微量成分まで検出し、夾雑物の影響を受けずにオリゴ糖

のみを選択的に分析するためにはオリゴ糖を誘導体化する必要がある。この誘導体化方法としては、還元末端を  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  で還元すると同時に放射性同位元素で標識する方法、*p*-アミノ安息香酸エチルエステルと反応させて紫外吸収をもたせる方法(12)や2-アミノピリジンと反応させて蛍光標識(PA化)する方法(13)等がある。この中でPA化法は、放射性同位元素を使用しない簡便さや分離の良さ等の点で現在最も優れた方法と考えられる。本手法を用いると、極めて高い分解能を有する逆相HPLCで従来非常に困難であった中性オリゴ糖が分析でき、酸性オリゴ糖も同様に分析される。そこでウシ乳の構成糖質への応用と泌乳期の差異による中性・酸性オリゴ糖の構成分子種の違いを明確にする事を目的として検討を行った。

#### 実験材料及び方法

ウシ初乳及び常乳は、森永乳業株式会社・栄養研究所から供与された。初乳は、出産後1日目、常乳は一般市販用の生乳であった。試料は搾乳後、直ちに冷凍し、 $-80^\circ\text{C}$ にて保存したものをを用いた。糖標準として用いたグルコース及びガラクトースは、関東化学株式会社より、 $\alpha$ -Lactose,  $\beta$ -Lactose, 3'-N-Acetylneuramin Lactose, 6'-N-Acetylneuramin lactose, Disialyllactose, 3'-Fucosyllactoseは、SIGMA CHEMICAL CO.より購入した。Globotriose, GM3-Neu5Ac-Trisaccharide-PA, GM3-NeuGc-Trisaccharide-PA, Neu5Ac-Lac-PAは宝酒造株式会社より購入した。又、ピリジルアミノ誘導体化試料は、GlycoTAG Reagent Kit(宝酒造株式会社)を用いた。

#### 乳中の粗糖質画分の調製方法

ウシの初乳及び常乳を $37^\circ\text{C}$ に加温し、Folchの分配法(14)に従って実施した。すなわち、試料乳11に対しクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)51を加え、ホモジナイザーを用い常温で均質化して抽出した。この懸濁液を $4^\circ\text{C}$ 、6,000rpm、20分間遠心分離を行った。上層(水溶性画分)を集めて減圧下でロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥を行って粗糖質画分とした。

#### ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分画方法

粗糖質画分を、Cellulofine GCL-25-mカラム(100×2.6cm I.D., チッソ(株)製)によって分画した。カ

ラムは10mM酢酸ピリジン緩衝液(pH5.0)で平衡化しておき、試料添加後、流速1.0ml/min, 分画容量4.5ml,  $5^\circ\text{C}$ の低温庫内で平衡化した溶液で溶出した。各溶出画分は、シアル酸はレゾルシノール-塩酸試薬法、糖はフェノール-硫酸試薬法によって検出した。検出されたオリゴ糖画分は、凍結乾燥を行って、ピリジルアミノ誘導体として高速液体クロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーの試料とした。

#### 薄層クロマトグラフ法及び二波長デンシトメーターによるオリゴ糖成分の分析

ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画されたオリゴ糖画分を、HPTLC plates silica gel 60(MERCK)にスポットし、展開溶媒としてエタノール-n-ブタノール-ピリジン-水-酢酸(100:10:10:30:3, v/v/v/v/v)を用いて展開を行った。シアル酸及び糖の検出は、展開・乾燥後、レゾルシノール-塩酸試薬及びオルシノール-硫酸試薬を噴霧、加熱して行った。更に発色後、スポットを二波長デンシトメーターCS-9300PC(島津製作所製)で、490(全糖)および573nm(シアル酸)の吸収を測定した。

#### オリゴ糖画分のピリジルアミノ(PA)誘導体化

ウシ初・常乳より得たオリゴ糖画分及び糖標準としてGlucose, Galactose,  $\alpha$ -Lactose,  $\beta$ -Lactose, 3'-N-Acetylneuramin-Lactose, 6'-N-Acetylneuramin-Lactose, Disialyllactose, 3'-FucosyllactoseをGlycoTAG(宝酒造(株)製)を用いて糖鎖の還元末端に2-アミノピリジン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。この反応はオリゴ糖試料に $4.2\mu\text{l}$ メタノール,  $6.3\mu\text{l}$ 酢酸,  $12.6\text{mg}$ 2-アミノピリジンの混合試薬を $20\mu\text{l}$ 添加し, 30分間,  $100^\circ\text{C}$ で反応させアミノ化させる。次に反応混合物に $2.7\mu\text{l}$ トリエチルアミン,  $18.1\mu\text{l}$ 酢酸,  $1.09\text{mg}$ ボラン-ジメチルアミンを混合した還元試薬を $20\mu\text{l}$ 添加し, 10分間,  $80^\circ\text{C}$ で反応させ還元アミノ化反応を行う。そしてPA化反応後の余剰の試薬を減圧、濃縮操作によって除去する。この一連の反応はGlyco TAGによって自動的に行った。この様にして得られたPA化-糖鎖を直接HPLCによって分析を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるPA-糖鎖の解析

PA-オリゴ糖試料は, CLASS-LC10 (島津製作所製) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置で2種類のカラムによって分析を行い糖鎖の解析を行った。

カラムⅠは, アミンを化学結合させた多孔性シリカカラムPALPAK Type N column (250mm×4.6mm I.D.; 宝酒造(株)製) を用いた。溶出溶媒は, トリエチルアミン・酢酸溶液 (TEAA, pH7.3) : アセトニトリル, 10:90 (v/v) とTEAA:アセトニトリル, 50:50 (v/v) を用いてグラジエント溶出を行った。溶出条件は, 流速1ml/min, カラム温度は40℃, 蛍光強度は, EX 320nm, EM 400nmの吸収波長によって測定した。

カラムⅡは, アクリルアミド基を化学結合させたアミド-シリカカラムPALPAK Type S column (250mm×4.6mm I.D.; 5 μm粒径; 宝酒造(株)製) を用いた。溶出溶媒は, トリエチルアミン・酢酸溶液 (TEAA, pH7.3) : アセトニトリル, 20:80 (v/v) とTEAA:アセトニトリル, 50:50 (v/v) を用いてグラジエント溶出を行った。溶出条件は, 流速1ml/min, カラム温度は40℃, 蛍光強度は, EX 310nm, EM 380nmの吸収波長によって測定した。

#### 2次元糖鎖マップによる糖鎖の解析

HPLC 2種類のカラムによるPA-オリゴ糖の溶出位置 (保持時間), すなわちイオン交換型カラムによるHPLC (PALPAK Type N column) の保持時間をX軸, 順相型カラムによるHPLC (PALPAK Type S column) のそれをY軸にプロットし, 2次元糖鎖マップを作成した。糖標準の溶出位置より試料の糖鎖構造の解析を行った。

#### 結 果

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによるウシ初乳・常乳の分画

ウシ初乳及び常乳の糖質画分のゲル濾過カラムクロマトパターンを図1及び図2に示した。オルシノール試薬による糖質の検出結果, 初乳・常乳共にラクトース (画分V及び画分IV) が大部分であったが, 初乳は常乳に比

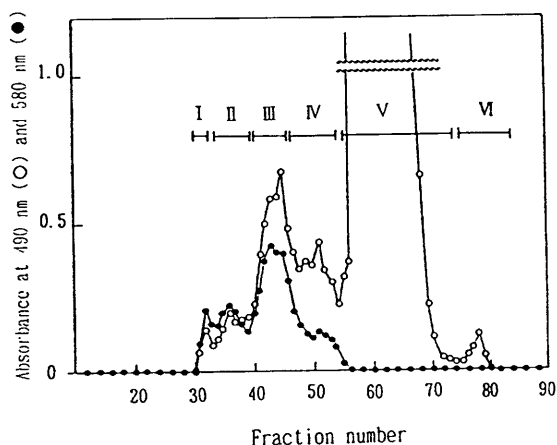


Fig. 1 Elution Profile of concentrated aqueous phase after extraction of bovine colostrum on Cellulofine GCL-25-m.  
(O) total sugar (●) sialic acid

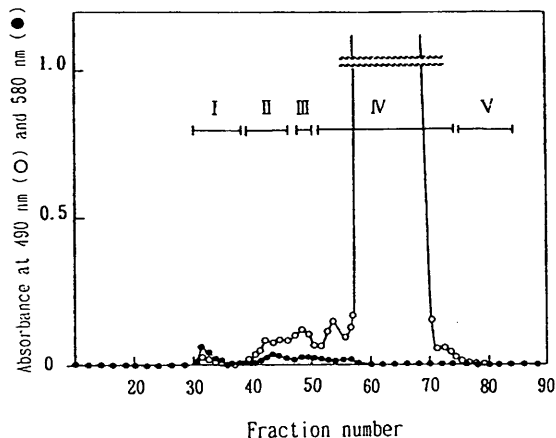


Fig. 2 Elution Profile of concentrated aqueous phase after extraction of bovine mature milk on Cellulofine GCL-25-m.  
(O) total sugar (●) sialic acid

べてラクトースより高分子の糖質画分の量が多く, 分子種も多種存在しているものと考えられた。シアル酸検出試薬による検出結果からシアル酸結合型糖質の量及び分子種も常乳に較べて初乳には多量に含有されていることが判明した。

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画分の分析

ゲル濾過カラムクロマトグラムの結果より各フラクションを図1, 2の様に分画して凍結乾燥後, 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って分析した結果を図3, 4, 5, 6に示した。初乳の各画分のオルシノール試薬(図3)及びレゾルシノール試薬(図4)による分析を行ったところ, ウシ初乳中のシアル酸含有糖質は, 画分Ⅱに6種でdisialyllactoseが主成分であり, 3'-sialyllactoseとその他のシアル酸含有糖質が検出され, 画分Ⅲには4種で3'-sialyllactoseが主成分でその他6'-sialyllactoseが検出され, 画分Ⅳには3'-sialyllactose及び構造未知のオリゴ糖が検出された。これらの結果からウシ初乳中にはシアル酸含有オリゴ糖が約12種が存在すると考えられた。一方, 常乳中(図5, 6)のそれは, 画分Ⅱに3'-sialyllactoseを主成分として3種, 画分Ⅲには, 3'-sialyllactoseと初乳の画分Ⅳに含有される構造未知のオリゴ糖が検出された。常乳中には

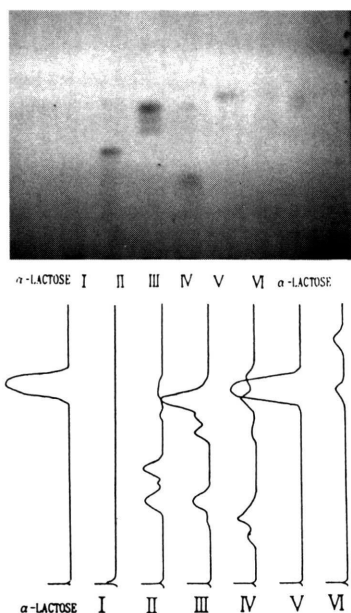


Fig. 3 Chromatography of bovine colostrum fractions from gel filtration chromatography (Fig. 1) on silica gel thin-layer plates in ethanol-n-butanol-pyridine-water-acetic acid (100:10:10:30:3, v/v) and densitometric chromatogram. Total sugar is visualized with orcinol- $\text{Fe}^{3+}$  spray reagent.

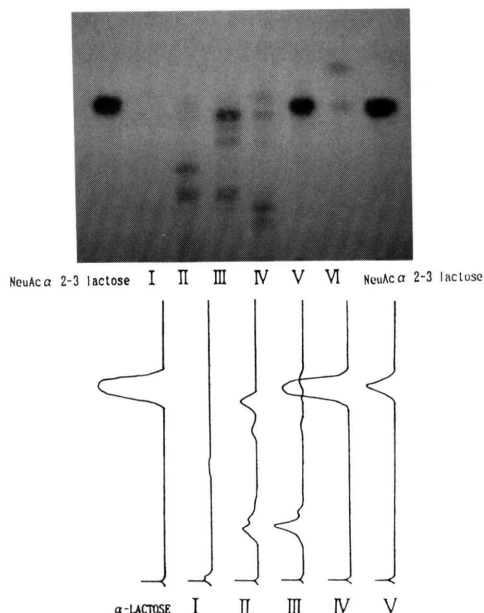


Fig. 4 Chromatography of bovine colostrum fractions from gel filtration chromatography (Fig. 1) on silica gel thin-layer plates in ethanol-n-butanol-pyridine-water-acetic acid (100:10:10:30:3, v/v) and densitometric chromatogram. Sialic acid is visualized with resorcinol spray reagent.

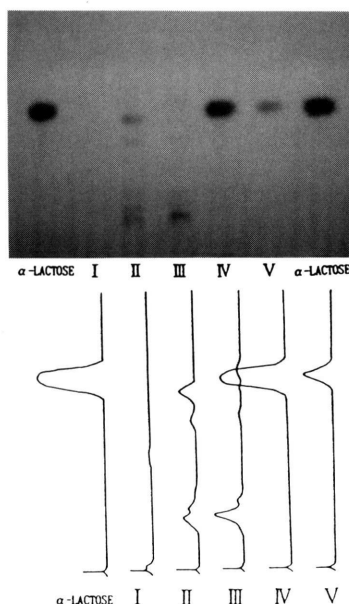


Fig. 5 Chromatography of bovine mature milk fractions from gel filtration chromatography (Fig. 2) on silica gel thin-layer plates in ethanol-n-butanol-pyridine-water-acetic acid (100:10:10:30:3, v/v) and densitometric chromatogram. Total sugar is visualized with orcinol- $\text{Fe}^{3+}$  spray reagent.

ウシ初乳及び常乳中のオリゴ糖組成のピリジルアミノ化分析法による比較

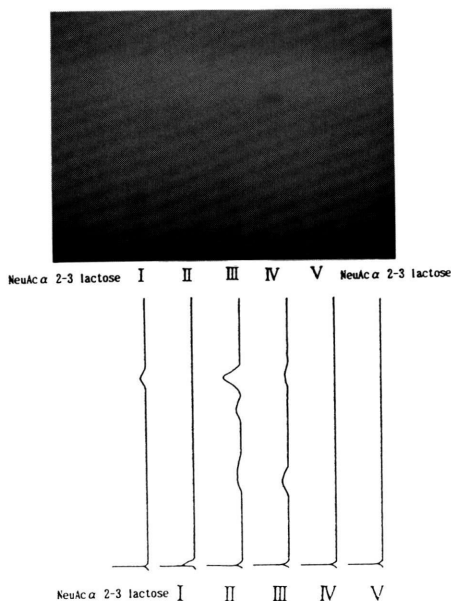


Fig.6 Chromatography of bovine mature milk fractions from gel filtration chromatography (Fig.2) on silica gel thin-layer plates in ethanol-n-butanol-pyridine-water-acetic acid (100:10:10:30:3, v/v) and densitometric chromatogram. Sialic acid is visualized with resorcinol spray reagent.

約5種のシアル酸含有糖質が認められた。これらのことよりウシ初乳と常乳に含まれるシアル酸含有糖質は、初乳にはシアル酸が複数結合したオリゴ糖が存在し常乳にはこの様なオリゴ糖が存在していないことが判った。一方、シアル酸が1分子結合したmonosialyllactoseは初乳、常乳の両方に含有されていたが量的には大きな差が認められ、初乳の方に多量に含有されていることが判明した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による PA-糖鎖の解析

ウシ初乳及び常乳のゲル濾過カラムクロマトによって得られた各糖質画分を凍結乾燥後、ピリジルアミノ化誘導体としてHPLC (イオン交換型, PALPAK Type N column) によって分析した結果を図7 (常乳) 及び図8 (初乳) に示した。標準物質は、3'-sialyllactose (34.3分)、6'-sialyllactose (39.8分) 及びdisialyl-

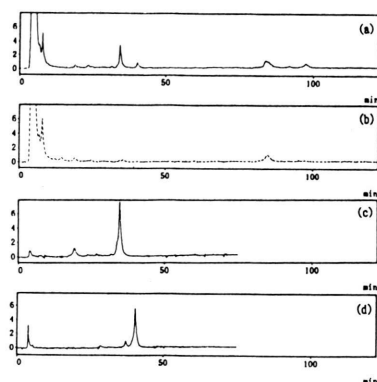


Fig.7 HPLC profiles of PA-oligosaccharides from bovine mature milk and PA-standrd sugars .  
(a)PA-oligosaccharides fractionII from gel filtration chromatography(Fig.1) with mature milk.  
(b)PA-oligosaccharides fractionIII from gel filtration chromatography(Fig.1) with mature milk.  
(c)NeuAc α 2-3 lactose-PA  
(d)NeuAc α 2-6 lactose-PA

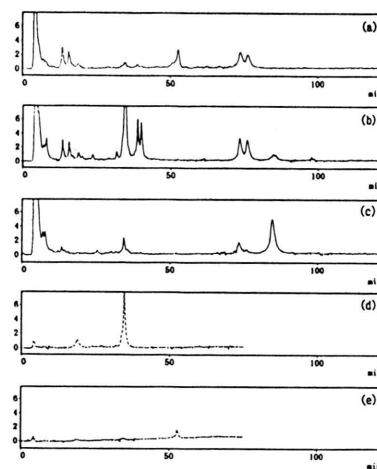


Fig.8. HPLC profiles of PA-oligosaccharides from bovine colostrum and PA-standrd sugars .  
(a)PA-oligosaccharides fractionII from gel filtration chromatography(Fig.2) with bovine colostrum.  
(b)PA-oligosaccharides fractionIII from gel filtration chromatography(Fig.2) with bovine colostrum.  
(c)PA-ologosaccharides fractionIV from gel filtration chromatography(Fig.2) with bovine colostrum.  
(d)NeuAc α 2-3 lactose-PA  
(e)NeuAc α 2-8 NeuAc α 2-3 lactose-PA

lactose (52.6分) に検出された。

常乳では (図7), 画分Ⅱに2種のsialyllactoseとこれらより更にイオン強度の強い3種の酸性オリゴ糖が検出された。画分Ⅲには僅かに3'-sialyllactoseとイオン強度の強い1種が検出された。初乳では (図8), 画分Ⅱにdisialyllactose, 画分Ⅲには多量の3', 6'-sialyllactoseが検出された。更に画分Ⅱ, Ⅲ, Ⅳにdisialyllactoseよりもイオン強度の強い酸性オリゴ糖が検出された。

#### 2次元糖鎖マップによる糖鎖の解析

ピリジルアミノ化糖鎖を2種のカラム (イオン交換型PALPAK Type N column及び順相型PALPAK Type S column) を用いてHPLCによる分析結果を2次元に表したものが図9である。

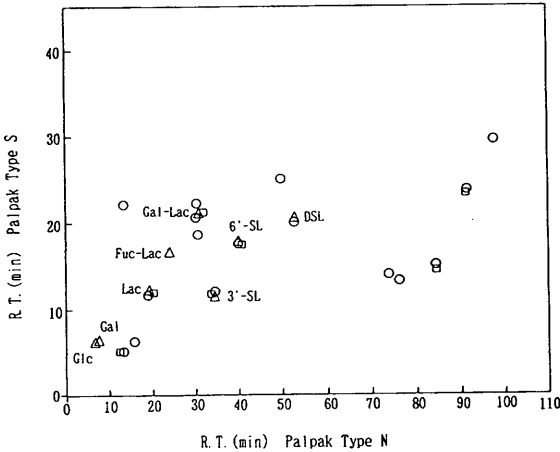


Fig. 9 Two-dimensional sugar map of PA-oligosaccharides from bovine colostrum (O) and mature milk (□) and PA-standard sugars (Δ).

中性オリゴ糖では, Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcあるいはGal  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glcと考えられるオリゴ糖が初乳, 常乳共に微量であるが認められた。しかしながら, Fuc  $\alpha$ 1-2Gal  $\beta$ 1-4Glcは検出されなかった。酸性オリゴ糖では, NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4GlcおよびNeuAc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4Glcは初乳, 常乳共に検出されたが, 初乳の方に多量に含有されており, NeuAc  $\alpha$ 2-8NeuAc  $\alpha$ 2-3(6)Gal  $\beta$ 1-4Glcは初乳に検出され, 常乳には検出されなかった。更に, NeuAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc及びNeuAc  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAcにリンの結合した酸性オリゴ糖と考えられるスポットが初乳に, 現在まで報告されていないNeuGc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-4Glcと硫酸基の結合したsialyl-

lactoseと考えられるスポットが初乳, 常乳の両者に認められた。又, 初乳にはtrisialyllactoseと考えられる酸性オリゴ糖のスポットが認められた。

#### 考 察

ウシ乳中の中性或いは酸性オリゴ糖は, ラクトースを除いて現在までに約20種程度構造が明らかとなっている(5-7)。これらのオリゴ糖の分子種及び量は泌乳期によって大きな差異が認められているが, 一般的には泌乳期の初期にのみ分子種及び量的にも多いことが明らかとなっている(15)。中性オリゴ糖成分では, 腸内細菌のビフィズス菌増殖活性を有すると考えられているGal  $\alpha$ 1-4Gal  $\beta$ 1-4Glc(8, 9)は初乳, 常乳共に検出されたが非常に少量であった。初乳と常乳における量的比較をすると初乳に明らかに多量に含有されていることが判った。しかしながら, Gal  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4GlcあるいはGal  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glc及びアミノ糖含有オリゴ糖についても初乳と常乳共に検出することが困難であった。又, フコース含有オリゴ糖は, Gal  $\beta$ 1-4[Fuc  $\alpha$ 1-3]GlcNAcが報告(5)されているが, 本結果(図9)からは同定ができなかった。しかしながら, Fuc  $\alpha$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Glcは初乳, 常乳共に含有されていないものと考えられたこの様に中性オリゴ糖成分が明確に解析されない理由としては, 本研究が酸性オリゴ糖(特にシアル酸含有オリゴ糖)の分析を主体としたため高速液体クロマトに用いたカラムが酸性オリゴ糖分析に最も適したカラムを使用した為と考えられた。しかしながら, 単純糖鎖の中性オリゴ糖の分析は充分可能であることが判明した。

酸性オリゴ糖成分は, 3', 6'-sialyllactose共に初乳, 常乳に含有されることが明らかとなったが, 量的には3'-sialyllactoseが6'-sialyllactoseに較べて倍以上含有されていた。シアル酸を複数含有するオリゴ糖は常乳には含有されず, 初乳のみに含有されるものと考えられた。複合糖質糖鎖中のシアル酸の役割については数多くの報告があり, 常乳に較べて初乳中に特に3', 6'-sialyllactoseが多量に含有されることを考え合わせると出産後の仔ウシに対して何らかの生理活性が予想された。この様な生理活性をヒト乳中のシアル酸化合物の生理活性で見ると, ウイルスや病原菌の感染予防, 細菌毒素による下痢等の予防や中枢神経系の発達への寄与等(11)のことが予想された。初乳中にはモノシアロ以外に複数

のシアル酸を結合した酸性オリゴ糖が存在することが明らかとなったことは、シアル酸化合物のこれらの生理作用を示唆しているものと考えられた。酸性オリゴ糖の中で特異的と考えられるリン酸結合型のオリゴ糖としては、ウシ初乳中に6'-sialyllactosamineにリン酸が結合したタイプが見いだされているが(1)、本研究の2次元糖鎖マップの結果から、6'-sialyllactosamine以外に3'-sialyllactosamineに結合したタイプも存在していると考えられた。これらのリン酸結合タイプのシアル酸化合物の生理作用は現在まで全く不明である。更に、複合糖質中には硫糖脂質の存在が明らかになっているが(16)、本研究における2次元糖鎖マップからもシアル酸の8位に硫酸基の結合したオリゴ糖と考えられる物質が認められた。

本研究の結果、検出感度の高い糖鎖のピリジルアミノ化法による分析によって食品中のオリゴ糖の解析が、酸性糖質画分のみならず一部の中性糖質画分も迅速に行えることが判明した。更に、ウシ初乳中には現在まで未知の酸性オリゴ糖が存在していることも明らかとなった。乳中の酸性オリゴ糖の生体での役割は未だほとんど明らかとされていないので本手法によってこれらの解明の手がかりとなるものと考えられる。更には、他の食品中の糖質分析によって新規の中、酸性オリゴ糖の検出や生理活性の解明に大きな手がかりを与え、食品の糖質成分の生理学的意義の解明に重要な役割を果たすものと考えられた。

## 要 旨

ウシ初乳及び常乳中の中性、酸性オリゴ糖の分析を、微量糖質成分の分析に有効であるアミノピリジル化法によって行った。中性オリゴ糖画分では、ビフィズス菌増殖活性を示す3'-galactosyllactoseが初乳、常乳共に認められたが、量的には常乳で非常に微量であった。酸性オリゴ糖画分では、初乳、常乳共に3'-, 6'-sialyllactoseが主成分であったが、初乳には常乳に較べて多量に含まれていた。更に特殊なオリゴ糖としてリン結合型sialyllactosaminや硫酸基結合型sialyllactoseが存在することが示唆された。本手法は食品中に含まれる微量オリゴ糖成分を迅速に解析することができ、更に中性、酸性オリゴ糖が同時に解析できるため食品中のオリゴ糖成分の解析に有効な方法であることが判明した。

## 謝 辞

本研究の実験にご協力いただいた栄養学科吉田育未、斎藤尚子、小樽智恵子さんに感謝致します。

## 参考文献

1. J. Parkkinen and J. Finne: Method in Enzymology, **138**, 289-300 (1987)
2. D. S. Newburg, P. F. Daniel, N. E. O'Neil and R. H. McCluer: Human Lactation 2 (Plenum Press, New York), 581-588 (1986)
3. H. Egge, A. Dell and H. Von Nicolai: Arch. Biochem. Biophys., **224**, 235-253 (1983)
4. G. Harzer and F. Hascheke: Micronutrients in Milk and Milk-based Food Products (Elsevier Applied Science), 193-197 (1989)
5. T. Saito, T. Itoh and S. Adachi: Biochim. Biophys. Acta, **801**, 147 (1984)
6. T. Saito, T. Itoh and S. Adachi: Carbohydr. Res., **165**, 43 (1987)
7. T. Urashima, T. Saito, K. Ohmisya and K. Shimazaki: Biochim. Biophys. Acta, **1073**, 225 (1991)
8. K. Ohtsuka, K. Endo, H. Ueda, O. Ozawa, R. Uchida and T. Mitsuoka: ビフィズス, **2**, 143 (1989)
9. K. Sidara: 医学と生物学, **117**, 371 (1988)
10. R. Kuhn and G. Gauhe: Chem. Ber., **98**, 395 (1965)
11. S. Dosako: 日本食品工業学会誌, **41**, 523-528 (1994)
12. W. T. Wang, N. C. Jr. LeDonne, B. Ackerman and C. S. Sweeley: Anal. Biochem., **141**, 366 (1984)
13. S. Hase, T. Ikenaka and Y. Matsushima: Biochem. Biophys. Res. Comm., **85**, 257-263 (1978)
14. J. Folch, M. Lees and G. H. Stanley: J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957)

15. D. Viverge, L. Grimmonprez, G. Cassanas, L. Bardet and M. Solere : J. Pediatr. Gastroenterol Nutr., **11**, 362-364 (1990)
16. N. Sakakibara, S. Gasa, K. Kamio, A. Makita and T. Tokunaga : Cancer Res., **49**, 335 (1989)