

ヒト初乳及び常乳中のオリゴ糖に関する研究

川名 広子* 齋藤 尚子* 有田 政信*

(平成9年10月2日受理)

Studies on Oligosaccharides in Human Colostrum and Mature Milk

Hiroko KAWANA, Naoko SAITO and Masanobu ARITA

(Received on October 2, 1997)

緒 言

母乳はほとんどの新生児が最初に出会う食品であり、母乳栄養児は人工栄養児と比較して生後1年間に胃腸及び呼吸器系疾病にかかる割合が低いことが知られている。このため、母乳中には乳児の成長・発達に関わる因子だけでなく、生体調節あるいは生体防御に関与する成分が含有されていることが示唆される。現在明らかになっている母乳中の生体調節機能としては、乳清タンパク質の血清コレステロールの低下作用、ラクトフェリンの免疫機構への関与・鉄吸収作用、ラクチュロースによる血中アンモニアの除去作用等¹⁾が報告されている。このような生理活性物質の研究は、タンパク質成分についてが主体であったが、糖質のエネルギー源としての機能(一次機能)、味覚・嗅覚・視覚に訴える嗜好品としての機能(二次機能)、更に免疫・生体防御系調節、神経系調節、循環器系調節、内分泌系調節、外分泌系調節などに関与する機能(三次機能)が明らかになり、母乳中の糖質成分及び複合糖質(糖タンパク質・スフィンゴ糖脂質)への関心が近年高まりつつある。

その母乳中糖質は、主成分であるラクトースの他に、約130種類のオリゴ糖、微量の単糖から構成され、乳児が必要とするエネルギーの約40%を補っている。更にこれらの糖質は、D-ガラクトース、D-グルコース、N-アセチルグルコサミン、L-フコース、酸性糖であるシアル酸から構成されている。このシアル酸とはノイラミン酸のアシル誘導体の総称で、動物界に広く分布しており植物界には見出されていない。G.Blixが1936年に顎下

腺ムチンから単離したのが最初であるが²⁾、天然には糖タンパク質やガングリオシドの糖鎖に結合して、生体内では気道、消化管、尿道、膺などの分泌液に高い粘度を付与している。また、シアル酸を含有する複合糖質は動物細胞の表層に多く存在して、細胞の陰性電荷に大きく寄与し、細胞間の情報伝達^{3), 4)}、病原性細菌やウイルスに対するレセプター機能⁵⁾のような細胞膜の営む種々の機能に関与している。

前報⁶⁾において、ウシ乳中酸性オリゴ糖の主成分は3'-sialyllactose(3'-SL)及び6'-sialyllactose(6'-SL)であり、初乳には常乳の数倍多くそれが含有されていることを示した。また、初乳中には12種、常乳中には5種のシアルオリゴ糖が検出された。一方、ヒト乳中の酸性オリゴ糖は6'-SL、3'-SLを主成分として、ウシ乳中シアルオリゴ糖よりも量及び種類が豊富であることが知られている。

つまり、ヒト乳中の中性及び酸性オリゴ糖は、他の哺乳類の乳と比較して多種、多様で特徴的である。よってヒト乳中オリゴ糖を分析することは、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、ヒト乳中オリゴ糖の分泌時期による差異、特徴づけを行うことを目的とし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

ヒト初乳(出産後4日目)は23歳の健康な母親(初産)から、常乳(出産後264日目)は健康な母親(2回目の出産)から供与された乳を用いた。初、常乳は搾乳後、-80℃にて使用時まで保存したものをを用いた。糖標準と

*栄養学科 食品学第二研究室

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'-SL, 6'-SL, Disialyllactose(DSL), 3'-Fucosyllactose(3'-Fuc-Lac), Galactosyllactose(Gal-Lac)は、SIGMA CHEMICAL CO.より購入した。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

ヒトの初乳及び常乳を37℃に加熱し、Folchの分配法に基づいて実施した。即ち、初乳84ml, 常乳180mlに各5倍量のchloroform-methanol(2:1,v/v)を加え抽出, 分配を行った。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た。前報に従って, 粗糖質画分をCellulofine GCL-25-mカラム(100×2.6cm I.D., チッソ製)によって分画した⁷⁾。各溶出画分は, 全糖及びシアル酸を検出し, 得られた各画分を凍結乾燥し, 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(40×2.6cm I.D., Pharmacia Biotech)によって分画した⁷⁾。カラムは, 10mM酢酸ピリジン緩衝液(pH5.0)で平衡化しておき, 流速1.0ml/min, 分画容量2.8ml, 5℃の低温庫内でリニアグラジエント溶出を行った。各溶出画分は, シアル酸検出を行い, 得られた酸性オリゴ糖画分を凍結乾燥し, TLC及びピリジルアミノ(PA)誘導体としてHPLCの試料とした。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に従ってTLC分析を行い^{6), 8)}, 全糖, シアル酸, ディットマー法⁹⁾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

ヒト初乳, 常乳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 (宝酒造機)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¹⁰⁾。PA-オリゴ糖サンプル及び糖標準は, 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を行い糖鎖構造解析を行った^{8), 11)}。更に, PALPAK Type N column及びPALPAK Type S columnにおける保持時間をX軸, Y軸にそれぞれプロットし二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, ヒト初乳及び常乳中の酸性オリゴ糖の特徴及び差異を検討した。

結果

1. ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる分画

ヒト初乳及び常乳から得た粗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。全糖検出結果から, 初乳には主成分であるLac(画分VII)より高級なオリゴ糖の量及び分子種が多く存在しているが, 常乳中にはそれらは減少し, 大部分がLac(画分V)となっていた。一方, シアル酸含有オリゴ糖についても, 初乳にその量や分子種が多く含有されているが, 常乳になると著しく減少していた。各画分を凍結乾燥後PA-誘導体としてHPLC分析を行った結果, 初乳にはFuc-Lac及びGal-Lacが多量に検出されたが, 常乳ではFuc-Lacの量は減少し, Gal-Lacは検出されなかった。

また, CG(colostrum gel-filtration fraction) I及びMG(mature milk gel-filtration fraction) IはTLC分析結果から糖タンパク質と考えられたため, ここで分析を保留にした。

2. イオン交換カラムクロマトグラフィーによる酸性オリゴ糖画分の分画及び薄層クロマトグラフィー(TLC), 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析

ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得られたシアル酸含有オリゴ糖画分(CG II~CGV, MG II~MG

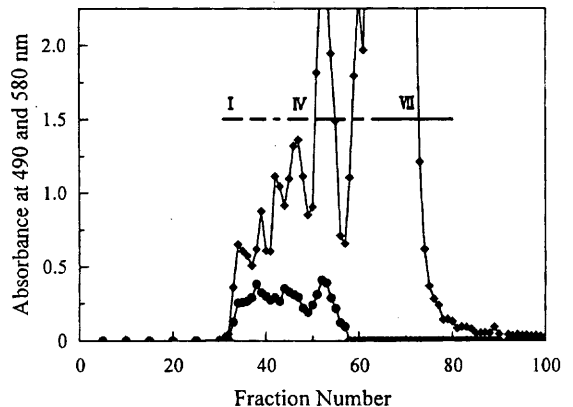


Fig.1 Elution profile of extracted crude saccharides fraction from human colostrum on Cellulofine GCL-25-m column.
(◆) total sugar (●) sialic acid

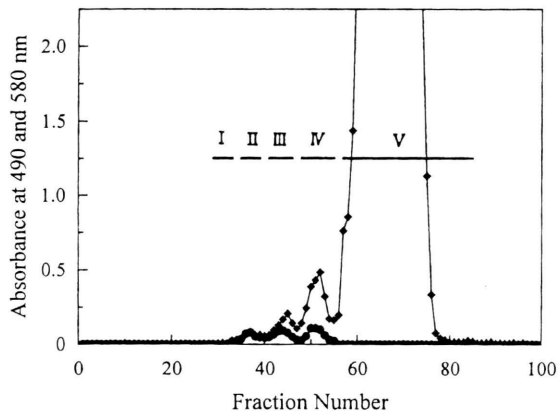


Fig.2 Elution profile of extracted crude saccharides fraction from human mature milk on Cellulofine GCL-25-m column.
 (◆) total sugar (●) sialic acid

IV) をイオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた各画分をTLC分析及びピリジリアミノ誘導体としてHPLC (イオン交換型: PALPAK Type N column及び順相型: PALPAK Type S column) 分析を行い、ヒト乳中に含有されている酸性オリゴ糖の構造推定を行った。その結果をFig.3~6及び表1, 2に示した。

CG IIは7つの画分に分画され、CG II-I及びIIには、7~8糖と思われるシアリルオリゴ糖が1種ずつ検出された。CG II-IIIには5~6糖と思われるジシアリルオリゴ糖が2種検出された。

CG IIIは9つの画分に分画され、CG III-Iには7~8糖と思われるシアリルオリゴ糖が3種検出され、このうちの1種はTLCでDittmer試薬によるリン酸基の発色もみられたことからリン酸基結合型シアリルオリゴ糖であると推測された。CG III-IIには5~6糖と思われるシアリルオリゴ糖が5種検出された。CG III-IIIには6'-SLと3'-SLが検出され、6'-SLは3'-SLの5.5倍多く含有されていた。

CG IVは7つの画分に分画され、CG IV-Iには7~8糖のシアリルオリゴ糖3種CG IV-IIには5~6糖と思われるジシアリルオリゴ糖2種が確認された。CG IV-IIIには6'-SL及び3'-SLが検出され、6'-SLは3'-SLの約2倍多く含有されていた。CG IV-IVには5~6糖と思われるジシアリルオリゴ糖1種、リン酸基結合型シアリルオリゴ糖1種が検出された。

CG Vは6つの画分に分画され (Fig.3), CG V-IIIには6'-SL及び3'-SLが検出され (Fig.4), 6'-SLは3'-SL

の1.5倍多く含有されていた。CG V-VIにはTLCにおいてリン酸基の発色がみられたがシアル酸の発色のないスポットが確認されたことから、リン酸基結合型オリゴ糖が1種存在することが明らかとなった。

一方、MG IIは4つの画分に分画され、7~8糖のシアリルオリゴ糖が1種、ジシアロで5~6糖と思われるシアリルオリゴ糖が2種検出された。MG II-IIには7~8糖と思われるシアリルオリゴ糖が1種、MG II-IIIにはジシアロで5~6糖と思われるシアリルオリゴ糖が4種検出された。

MG IIIは4つの画分に分画され (Fig.5), MG III-Iには、3'-SLを主成分として6'-SL (Fig.6), 構造未知のシアリルオリゴ糖1種の計3種のシアリルオリゴ糖が検出された。MG III-IIには5~6糖と思われるシアリルオリゴ糖1種、MG III-IIIにはジシアロで5~6糖と思われるシアリルオリゴ糖1種が検出された。

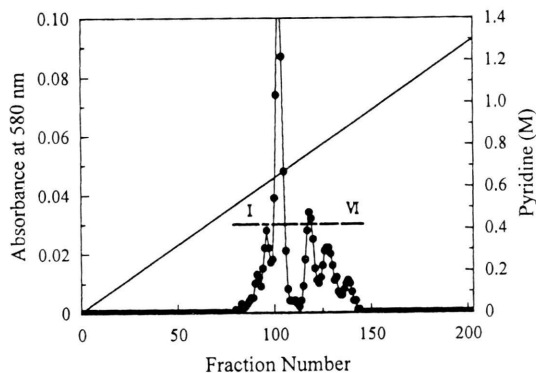


Fig.3 Elution profile of CG V fraction on DEAE-Sephacrose CL-6B. (●) sialic acid

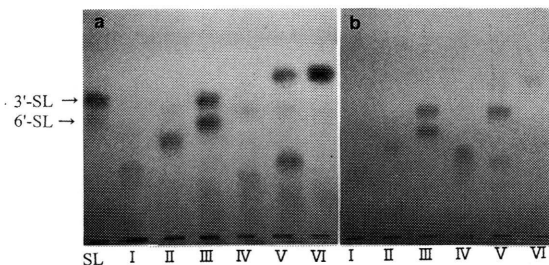


Fig.4 Thin layer chromatograms of CG V fractionated by DEAE-Sephacrose CL-6B. Developing solvent; EtOH: n-BuOH:Pyridine: W: AA(100: 10: 10: 30: 3, v/v/v/v/v) Visualized reagent: (a) orcinol-H₂SO₄ reagent. (b) resorcinol-HCl reagent.

MGIVは4つの画分に分画され、MGIV-Iは3'-SLを主成分として6'-SLと構造未知のシアリルオリゴ糖1種

が検出された。

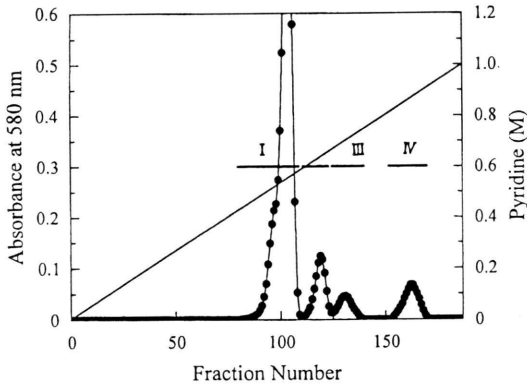


Fig.5 Elution profile of MG III fraction on DEAE-Sephrose CL-6B. (●) sialic acid

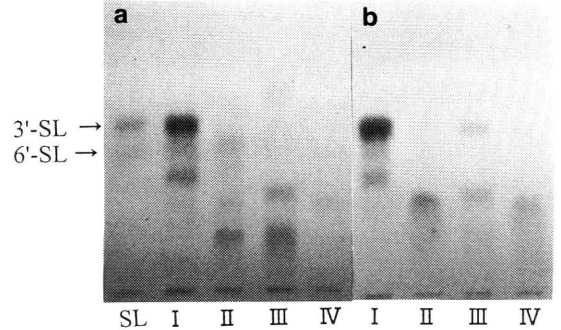


Fig.6 Thin layer chromatograms of MG III fractionated by DEAE-Sephrose CL-6B. Developing solvent; EtOH: n-BuOH:Pyridine: W: AA(100: 10: 10: 30: 3, v/v/v/v/v) Visualized reagent : (a) orcinol-H₂SO₄ reagent. (b) resorcinol-HCl reagent.

表1 ヒト初乳中に含有される酸性オリゴ糖の特徴

	各フラクションのオリゴ糖の特徴	分子種(計)
CG II - I	シアリル酸結合型(7-8糖)	9種
II	シアリル酸結合型(7-8糖)	
III	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)2種	
IV	シアリル酸結合型	
V	シアリル酸結合型	
VI	シアリル酸結合型	
VII	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)2種	
CG III - I	シアリル酸結合型(7-8糖)2種	20種
II	リン酸基及びシアリル酸結合型	
III	シアリル酸結合型(5-6糖)5種	
IV	3'-SL, 6'-SL	
V	シアリル酸結合型4種	
VI	シアリル酸結合型(5-6糖)1種	
VII	シアリル酸結合型	
VIII	シアリル酸結合型	
IX	シアリル酸結合型2種	
CG IV - I	シアリル酸結合型(7-8糖)2種	
II	シアリル酸(2分子)結合型	
III	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)2種	
IV	3'-SL, 6'-SL	
V	シアリル酸結合型3種	
VI	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)2種	
VII	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)リン酸基及びシアリル酸結合型未解析	
CG V - I	シアリル酸結合型	11種
II	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)	
III	3'-SL, 6'-SL	
IV	シアリル酸結合型	
V	シアリル酸結合型2種	
VI	未解析リン酸基及びシアリル酸結合型	

表2 ヒト常乳中に含有される酸性オリゴ糖の特徴

	各フラクション中のオリゴ糖の特徴	分子種(計)
MG II - I	シアリル酸結合型(7-8糖)1種	15種
II	シアリル酸結合型1種	
III	シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)2種	
IV	シアリル酸結合型(7-8糖)1種 シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖)4種 シアリル酸結合型4種 未解析2種	
MG III - I	3'-SL, 6'-SL シアリル酸結合型	11種
II	未解析 シアリル酸結合型(5-6糖)	
III	未解析 シアリル酸(2分子)結合型(5-6糖) シアリル酸結合型	
IV	未解析 シアリル酸結合型2種	
MG IV - I	3'-SL, 6'-SL シアリル酸結合型	8種
II	シアリル酸結合型	
III	シアリル酸結合型	
IV	未解析2種 シアリル酸結合型	

3. 二次元糖鎖マップによるヒト初乳及び常乳中の酸性オリゴ糖の解析

イオン交換クロマトグラフィーによって得られた各酸性オリゴ糖画分をピリジルアミノ(PA)誘導体としてHPLC分析を行い、PALPAK Type N column(イオ

ン交換型), PALPAK Type S column (順相型) の保持時間をそれぞれX軸, Y軸にプロットし二次元糖鎖マップを作成した (Fig.7). 二次元糖鎖マップ上でヒト初乳及び常乳中の酸性オリゴ糖の組成を比較してみると, 3'-SL, 6'-SLは初乳, 常乳共に検出された。また, ジシアロで5~6糖と思われるオリゴ糖は初乳, 常乳ともに多種検出された。しかし, ジシアロで7~8糖と思われるオリゴ糖は初乳に多く存在し, 常乳になるとその種類は減少していた。また, イオン強度が強く分子量の小さいオリゴ糖は検出されなかった。

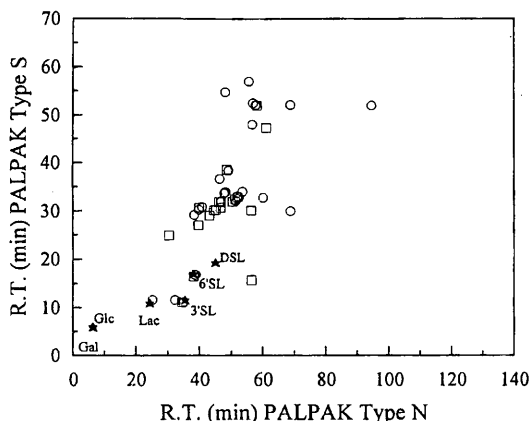


Fig.7 Two-dimensional sugar map of PA-standard sugars (★) and PA-derived acidic oligosaccharides isolated from human colostrum (○), mature milk (□).

考 察

ヒト乳中に含まれる中性オリゴ糖は主成分であるLac以外に, Fuc-Lac及びGal-Lacの存在が確認された。これらのオリゴ糖は初乳にその含量が高く, 常乳になると減少していくことが明らかになった。同様の方法でウシ乳について分析したところ, 初乳, 常乳ともにGal-Lacは検出されたが, Fuc-Lacは検出されなかった。哺乳類の中でも, ハリモグラやカモノハシのような単孔類の乳はLacよりもFuc-Lacが, タマワラビーのような有袋類の乳はLacよりもGal-Lacが優勢であることが報告されている^{12), 13)}。両動物種は妊娠期間が短い(有袋類のブラッシュテイルポッサム: 21日) 超未熟児状態で誕生し, 泌乳期間がとても長い(タマワラビー: 50

週)。このことは, オリゴ糖が未熟児栄養に重要な役割を果たしていることを示唆している。従って, これらの中性オリゴ糖の役割を解明することによって, ヒトの早産による未熟児用の育児用調製粉乳の開発に応用できる可能性が認められた。更に, フコシルオリゴ糖は大腸菌の熱安定性エンテロトキシンから乳児マウスを保護することが報告されている^{14), 15), 16)}。しかしこの効果に関与しているのは3'-Fuc-Lacや2'-Fuc-Lacのような主要な物質ではなく, 他のフコースが結合した微量物質であり¹⁵⁾, 本研究において確認されたようなフコシルラクトースの機能については十分明らかにされていない。Gal-Lacに関しては, 4',6'-Gal-Lacが乳児の腸管内のBifidobacterium属に対する増殖促進活性が認められている^{17), 18)}。そして, 4'-Gal-LacはLacにD-Galを転移させる酵素的手法により大量調製され育児用調製粉乳に添加され市販されている。

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, 井戸田らは出産後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)と報告している¹⁹⁾。本研究ではヒト初乳には6'-SLが3'-SLの約3倍多く存在し, 常乳では3'-SLが主成分になっていることがTLC及びHPLCにより確認できた。このことは, ウシ初乳中酸性オリゴ糖は3'-SLが6'-SLの約4.7倍含有されていることとは大きく異なっていた⁶⁾。更に, 超未熟状態で出生してくる有袋類のハリモグラ乳にシアリルラクトースが多量に含有されており, 更にそれがフコシルラクトースと並ぶ乳中糖質の主成分である¹²⁾。脳・眼・腎臓の発達及び体温調節の確立が胎内で行われる真獣類と比較して, 有袋類はそれらの発達が, 母親の乳を栄養源として行われていることからシアリルラクトース及びシアリルオリゴ糖の生理学的役割はとても興味深いところである。現在までにシアリルラクトースの生体調節機能としては, インフルエンザウイルス・大腸菌の細胞付着阻止作用, コレラトキシン・大腸菌のエンテロトキシン中和作用等のsoluble receptorとしての機能^{14), 20), 21)}が明らかとされつつある。又, 本研究では, 6'-SLはマウス由来神経芽腫瘍細胞Neuro2aの神経突起の細胞当たりの数及び長さの伸展に関与することが確認されている。それゆえに6'-SLは器官・組織, 特に神経系が未熟な生後間もない乳児に対して神経系発達に重要な機能を果たしていることが示唆される。

3'-SL,6'-SL以外に初乳中にはシアリルオリゴ糖が多種存在していたが、常乳ではその量及び分子種ともに減少していた。本研究において、5~6糖と考えられるオリゴ糖は初乳、常乳ともに多種存在していたが、それより高分子の7~8糖と予測されるオリゴ糖は初乳に多種存在し、常乳ではその種類、量ともに非常に少なくなることが明らかとなった。このような高分子のオリゴ糖はウシ乳中には極微量にしか存在していない。そのためこれらのオリゴ糖はヒト乳児に対して特別な生理作用を有していると思われるが、それに関する報告は未だなされていない。一方、ウシ乳に3~4糖のイオン強度が非常に強いオリゴ糖が多種存在している。これらは、リン酸基結合型シアリルオリゴ糖、硫酸基結合型シアリルオリゴ糖と推測されている。ヒト初乳中にはリン酸基結合型シアリルオリゴ糖が3種確認されたが、常乳では検出されなかった。また、シアル酸、リン酸基以外の酸性成分が結合したオリゴ糖が初乳、常乳ともに確認された。今回硫酸基の検出は行っていないが、これらのオリゴ糖は硫酸基結合型オリゴ糖と予想された。

本研究ではヒト初乳、常乳における酸性オリゴ糖組成の傾向が明らかにされたが、今回試料とした初乳、常乳は提供者が異なるために、個体間の差を考慮しなくてはならない。なぜならば、乳中フコシルオリゴ糖の生合成はフコシルトランスフェラーゼ（フコース転移酵素）の存在と深く関与しており、母親の血液型を決定するABO(+)タイプによってフコシルオリゴ糖分泌型と非分泌型とに分かれるためである²³⁾。今後、同一人物の乳中酸性オリゴ糖の経時的変化を追っていくこと、検体数を増やして検討を行うことにより、初乳と常乳の差異がより明確になると思われる。さらに、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検討していく必要があると思われる。

謝 辞

本研究の実験にご協力頂いた平成8年度栄養学科食品学第2研究室卒業生猿山千佳子さん、早川淳子さんに感謝致します。

Abstract

The difference of oligosaccharides composition between colostrum and mature milk from human and the characterization of oligosaccharides were analyzed by the two-dimensional sugar map method. As for neutral oligosaccharides, Fuc-Lac and Gal-Lac were contained with high concentration in colostrum, but in mature milk, the former had very low concentration and the latter didn't. Colostrum from human has many various kinds of oligosaccharides with the high molecular species (hexa-, hepta-saccharides etc.) and with a high contents. However, these oligosaccharides decreased in varieties and quantities of mature milk. On the other hand, the acidic oligosaccharides with a high molecular and ionic strength were detected in neither colostrum nor mature milk. 6'-sialyllactose (6'-SL), an acidic oligosaccharides, was main component in colostrum and this concentration was about three times as much as that of 3'-SL that was main component in an acidic oligosaccharides in mature milk. Three species of novel components, sialyl-oligosaccharides binding phosphorus, were found out in human colostrum.

参考文献

- 金子哲夫, 長岡利, 金丸義敬, 葛谷泰雄, 高瀬光徳, 島村誠一, 富田守: 牛乳成分の特性と健康, 31-104, (1993)
- N. Sharon: Complex Carbohydrates - Their chemistry, Biosynthesis, and Functions -, 87-94 (1986)
- 小島直也: 油化学, 40, 344-351 (1991)
- N. Kojima and S. Hakomori: *J. Biol. Chem.*, 264, 20159 (1989)
- 内貫正治: 現代化学, 248, 38-42 (1991)
- 有田政信, 川名広子: 東京家政大学研究紀要, 36, 17-24 (1996)
- J. Parkkinen and J. Finne: *Methods Enzymol.*, 138, 289-300 (1987)

- 8) K. Ohara, M. Sano, A. Kondo, and I. Kato :
J. Chromato., **586**, 35-41 (1991)
- 9) 滝 孝雄 : 新生化学実験講座 “脂質Ⅲ-糖脂質-”
135-151 (1990)
- 10) S. Hase, T. Ikenaka and Y. Matsushima :
Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 257-
263 (1978)
- 11) D. S. Newburg, P. F. Daniel, N. E. O' Neil
and R. H. McCluer : *Human Lactation* 2, 581-
588 (1986)
- 12) M. Messer, 浦島匡 : 化学と生物, **33**(12), 816-
824 (1995)
- 13) T. Urashima, T. Saito, Y. Tsuji, Y. Taneda,
T. Takasawa, M. Messer : *Biochim. Biophys.*
Acta, **1200**, 64-72 (1994)
- 14) C. Kunz and S. Rudolff : *Acta Paediatr.*, **82**,
903-12 (1993)
- 15) D. S. Newburg, L. K. Pickering, R. H. McCluer,
and T. G. Cleary : *J. Infect. Dis.*, **162**, 1075-
1080 (1990)
- 16) J. K. Crane, S. S. Azar, A. Stam and D. S.
Newburg : *J. Nutr.*, **124**(12), 2358-2364 (1994)
- 17) 浦島匡, 齋藤忠夫 : 化学と生物, **31**(2), 80-82
(1993)
- 18) O. Hosomi, A. Takeya : *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**
(1989)
- 19) 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)
- 20) A. S. Gambaryan, V. E. Piskarev, I. A.
Yamakov, A. M. Sakharov, A. B. Tuzikov,
N. V. Bovin, N. E. Nifant'ev, M. N. Matrosovich :
FEBS Letters **366**, 57-60 (1995)
- 21) T. Idota, H. Kawakami, Y. Murakami,
and M. Sugawara : *Biosci. Biotech. Biochem.*,
59(3), 417-419 (1995)
- 22) B. W. Petschow and R. D. Talbott : *Pediatr.*
Res., **29**(2), 208-213 (1991)
- 23) Renner : *Micronutrients in Milk and Milk
based Food Products*, 192-197 (1989)