

ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(XI)

Comparative Biochemistry of Milk Oligosaccharides (XI)

—ヒトミルクオリゴ糖のHPLCによる定量分析—

—Quantitative Analysis of Human Milk Oligosaccharides (HMO) by HPLC—

国立大学法人 東北大学大学院農学研究科 教授 農学博士 齋藤 忠夫
TADAO SAITO Dr. Agric.

Graduate School of Agricultural Science, TOHOKU University

国立大学法人 帯広畜産大学大学院畜産学研究科 教授 農学博士 浦島 匡
TADASU URASHIMA Dr. Agric.

Graduate School of Food Hygiene, OBIHIRO University of Agriculture and Veterinary Medicine

1. はじめに

哺乳動物の泌乳初期に分泌される初乳には、ラクトース(乳糖)以外に多種類のオリゴ糖が含まれており、これらをミルクオリゴ糖(MO)と呼んでいる。著者らのミルクオリゴ糖研究を紹介する本シリーズでは、ヒトを初めとした各種哺乳動物におけるミルクオリゴ糖の構造解析をトピック的に概説した¹⁸⁻²⁷⁾。ヒトミルクオリゴ糖にはすでに93種類の化学構造が報告されており、それらは基本骨格(コア)に基づいて13の系列に分類されている(図1)¹⁾。また最近、(財)野口研究所の天野純子博士により、ラクト-N-デカオースおよびラクト-N-ネオデカオースをコアとする新規な20種類のオリゴ糖の化学構造が報告された²⁾。1950年代から現在に至るまで、ミルクオリゴ糖の化学構造に関する研究が多く報告されているが、人乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖(HMO)の定量分析は未実施であった。近年、糖鎖の化学的標識化法が進展し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離技術とリンクして、代表的な中性ならびに酸性オリゴ糖の各種の泌乳時期における定量分析が実施されるようになった。今回は浦島らの研究グループによる中性および酸性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析について紹介する^{3), 4), 5)}。

2. 日本人女性における中性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析³⁾

泌乳開始後1~3日の12人の健康な日本人女性から提供された初乳において、表1に示したような10種類の代表的な中性ヒトミルクオリゴ糖を定量分析対象とした。各乳試

Gal (β1-4) Glc	Lactose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-tetraose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neotetraose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-hexaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-hexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-neohexaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-octaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neooctaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	iso-Lacto-N-octaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	para-Lacto-N-octaose
Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) \ Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-decaose
Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-3) GlcNAc (β1-3) / Gal (β1-4) Glc	Lacto-N-neodecaose

図1 ヒトミルクオリゴ糖における13系列のコア構造

料1mLに対し、内標準物質として1mgのイソマルトリオースおよびイソマルトペンタオースを添加した。最終的にHPLC上の各オリゴ糖と内標準オリゴ糖のピーク面積比から正確な定量分析を行うため、乳試料に予め内標準物質を添加しておくことがかぎである。ついで、4倍量のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 抽出により糖質画分を調製してから、Bio Gel P-2カラムによるゲルろ過によりオリゴ糖の分離を行い、図2に示したように2つのピークを回収した。各ピーク中のオリゴ糖は1-methyl-3-phenyl-5-pyrazolone (PMP)または2-

aminopyridine (PA)により化学的に標識した。PMP化はHondaらの方法⁶⁾に基づき、オリゴ糖画分に対して0.5M PMPのメタノール溶液と0.6M NaOH 溶液を添加し、70℃で30分間反応させた。反応液に0.1M 塩酸とクロロホルムを添加し、攪拌後、上層を取り出した。PA化はTakemotoらの方法⁷⁾により、オリゴ糖画分に対し酢酸にPAを溶解した溶液を添加し、90℃で1時間反応させた後、酢酸にホウ酸-ジメチルアミンを溶かした溶液を加えて80℃で50分間還元した。得られたPA誘導体は電気透析によって精製した。定量分析に供したオリゴ糖の標準物質(各50, 100, 200および400 μ g)は標準曲線および回収率のデータをえるため同様に標識化を行った。

表1 定量分析を行った中性ヒトミルクオリゴ糖

Peak	Oligosaccharide	Molecular Weight	Number of monosaccharide	Structure	
1	2'-fucosyllactose	2'-FL	488.44	3	Fucul-2Gal β 1-4Glc
	3-fucosyllactose	3-FL	488.44	3	Gal β 1-4[Fucul-3]Glc
	lactodifucotetraose	LDFT	634.57	4	Fucul-2Gal β 1-4[Fucul-3]Glc
2	lacto-N-Tetraose	LNT	707.64	4	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Neotetraose	LNnT	707.64	4	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Fucopentaose I	LNFP I	853.70	5	Fucul-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Fucopentaose II	LNFP II	853.70	5	Gal β 1-3Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-FucopentaoseIII	LNFP III	853.70	5	Gal β 1-4[Fucul-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Difucopentaose I	LNDFH I	999.91	6	Fucul-2Gal β 1-3[Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
	lacto-N-Difucopentaose II	LNDFH II	999.91	6	Gal β 1-3[Fucul-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4[Fucul-3]Glc

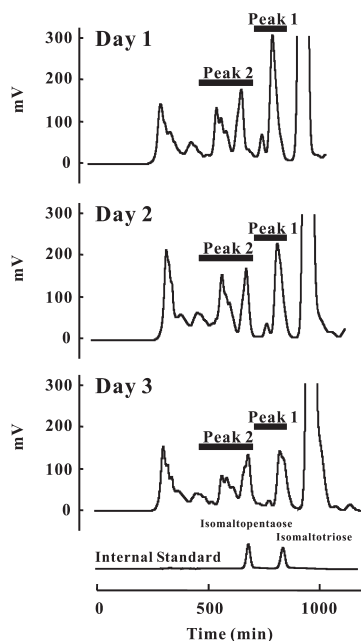


図2 泌乳開始1～3日の人乳から分離した糖質画分のゲルクロマトグラム Bio Gel P-2カラム(2.6×100cm)を使用した。溶出は蒸留水、流速は15mL/hに調整し、各画分は5mLずつ回収した。検出はSmart Chrom softwareを用いた示差屈折で行った。

標識化したオリゴ糖画分はDISMIC-13CP膜を通過した後、Inertsil ODS-3VカラムかODS-100Zカラムによる逆相

HPLCに供して分析した。ピーク1におけるPMP標識化オリゴ糖は1mL/minの流速で60分間16%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0)で溶出した。ピーク2におけるPMP標識化オリゴ糖は、10%および25%アセトニトリルを含む100mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.5) (各々buffer AおよびBとする)を用い、buffer Bの84–64%直線濃度勾配で70分間0.4mL/minの流速で溶出した。ピーク2のPA化標識オリゴ糖は、PMP化標識オリゴ糖の分析時と同じカラムを使用し、200mMクエン酸buffer (pH 5.0)を溶媒として60分間1mL/minの流速で溶出した。

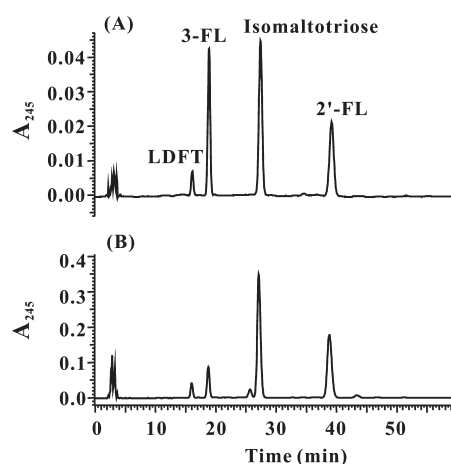


図3 PMP標識化したPeak 1画分のHPLC (A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。 (B) ゲル濾過によって回収したPeak 1画分のHPLC。 HPLCは、ODS-3V (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5 μ m)カラムを使用し、1mL/minの流速で60分間16%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0)で溶出した。

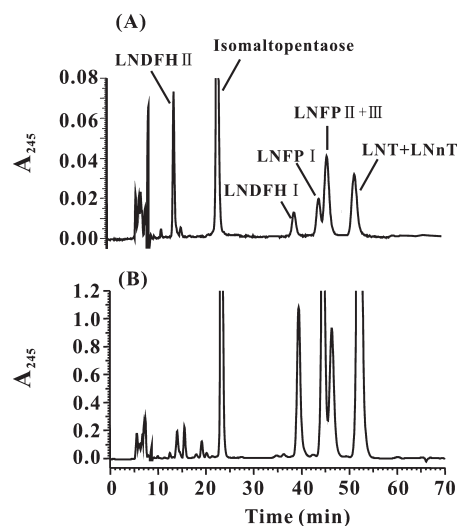


図4 PMP標識化したPeak 2画分のHPLC (A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。 (B) ゲル濾過によって回収したPeak 2画分のHPLC。 HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5 μ m)カラムを使用し、10%および25%アセトニトリルを含む100mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.5) (各々buffer AおよびBとする)を用い、buffer Bの84–64%直線濃度勾配で70分間0.4mL/minの流速で溶出した。

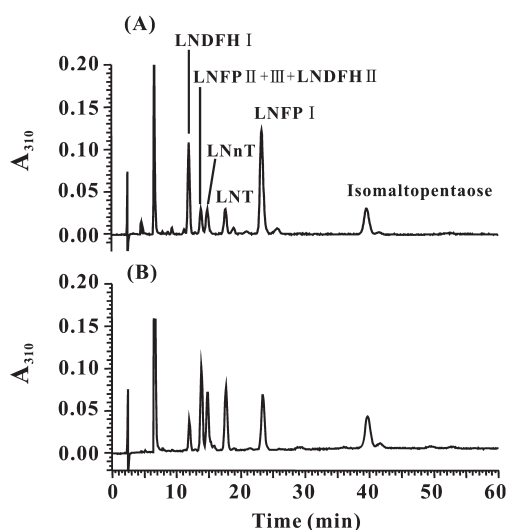


図5 PA標識したPeak 2画分のHPLC
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) ゲル濾過によって回収したPeak 2画分のHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm) カラムを使用し、200mM クエン酸buffer (pH 5.0) を溶媒として60分間1mL/minの流速で溶出した。

PMPまたはPA化標識したピーク1および2中のオリゴ糖のHPLCを図3～5に示した。内標準オリゴ糖とのピーク面積比の比較から、泌乳開始後1～3日までの初乳における各オリゴ糖の含量を表2に示したように求めた。この定量分析値に基づいて、これらの代表的なオリゴ糖の中でも2'-FL, LNFP I, LNTおよびLNDHF Iはとくに含有量の高いことが示された。初乳中におけるオリゴ糖の含有量は22～24g/Lと概算されているが、表2の定量値からこれら4種のオリゴ糖の合計値で全オリゴ糖 (130種類以上含まれる) の1/3～1/4を占めることが示唆された。

表2 泌乳開始1～3日の各ヒトミルクオリゴ糖濃度 (g/L)、括弧内は標準偏差

	Day of lactation (n=12)			P Value
	Day 1	Day 2	Day 3	
2'-FL	2.49 ± 1.22 ^a [4.51 - 0.86]	2.01 ± 1.07 ^b [4.06 - 0.60]	1.58 ± 0.73 ^c [2.76 - 0.38]	<0.0001
3-FL	0.26 ± 0.14 [0.50 - 0.05]	0.28 ± 0.26 [0.96 - 0.002]	0.20 ± 0.13 [0.38 - 0.01]	N.S.
LDFT	0.42 ± 0.42 ^a [1.54 - 0.01]	0.28 ± 0.30 ^{ab} [1.10 - 0.04]	0.19 ± 0.14 ^b [0.41 - 0.03]	0.0084
LNT	0.89 ± 0.43 ^b [1.46 - 0.21]	1.44 ± 0.70 ^a [2.09 - 0.38]	1.45 ± 0.73 ^a [3.01 - 0.41]	0.0014
LNnT	0.40 ± 0.09 ^b [0.56 - 0.29]	0.54 ± 0.14 ^a [0.86 - 0.34]	0.42 ± 0.15 ^{ab} [0.75 - 0.30]	0.0229
LNFP I	1.47 ± 1.01 [3.16 - 0.31]	2.08 ± 1.67 [6.42 - 0.66]	1.67 ± 1.03 [3.94 - 0.38]	N.S.
LNFP I + II	0.38 ± 0.24 [1.05 - 0.13]	0.45 ± 0.26 [1.12 - 0.20]	0.42 ± 0.33 [1.32 - 0.13]	N.S.
LNDHF I	1.27 ± 0.54 [2.31 - 0.31]	1.87 ± 1.55 [6.58 - 0.92]	1.41 ± 0.66 [2.94 - 0.78]	N.S.
LNDHF II	0.017 ± 0.018 [0.07 - 0.006]	0.020 ± 0.025 [0.098 - 0.004]	0.019 ± 0.028 [0.106 - 0.003]	N.S.

2'-FLには世界中で乳児に深刻な下痢を引き起こす *Campylobacter jejuni* による感染から乳児を守り、下痢を防止する働きが示唆されている⁸⁾。含有量は泌乳開始1日目から3日目まで有意に低下することが示されたが、このこと

は *Campylobacter jejuni* による新生児の感染に対し、泌乳開始直後の初乳がとくに重要であることを示唆している。

4種類の存在比の高いオリゴ糖のうち、2'-FLを除く3種類はいずれも分子内にGal (β1-3) GlcNAcを含む「タイプI型オリゴ糖」である。筆者らはこれまでに多くの動物種のミルクオリゴ糖の解析を行ったが、ヒトと類人猿以外の動物種ではタイプI型オリゴ糖は発見されず、Gal (β1-4) GlcNAcを含むタイプII型オリゴ糖とラクトース系列 (図1参照) のオリゴ糖しか発見されなかった。類人猿ではゴリラとテナガザルの乳ではタイプII型のオリゴ糖とラクトース系列のオリゴ糖しか発見されず、チンパンジー、ボノボ、オランウータンの乳ではラクトース系列オリゴ糖とともに、タイプI型オリゴ糖、タイプII型オリゴ糖が共存するものの、タイプII型オリゴ糖の方がタイプI型オリゴ糖よりも優先的であった⁹⁾。このことは、タイプI型オリゴ糖の優先性はあらゆる哺乳動物種の中でヒトだけの特徴であることを示している。この意義については別の機会に言及したい。

3. サモア人女性における中性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析⁴⁾

欧米人ドナーには20%くらいの割合で、2'-FLやLNFP Iなどの非還元末端に存在するFuc (α1-2) 残基を持つミルクオリゴ糖を含まない人たちがいる。この人々を非分泌型ドナー (体液に血液型物質を分泌しないという意味) といい、2'-FLやLNFP Iなどを含む人々を分泌型ドナーという。日本人女性のミルクオリゴ糖分析を行ったドナーはすべて分泌型ドナーであるが、ミルクオリゴ糖定量値の人種的な違いをみる目的から、サモア人女性乳についての定量分析を行った。

日本人女性のケースと同様の方法によって分画されたオリゴ糖を含む画分に対し、標識化法としてPA化またはPMP化ではなく、アントラニル酸 (AA) により標識化した¹⁰⁾。標識化試薬はメタノール-酢酸-ホウ酸溶液にAAとシアノホウ素化水素ナトリウムを溶解して調製した。オリゴ糖画分を蒸留水に溶解し、標識化試薬を加えて80℃で50分間反応させた。ついで冷却後、水を加え、クロロホルムを加えて攪拌してから、上層を取り出した。AA標識化されたオリゴ糖を含む画分は、ODS-100Zカラムを使用した逆相HPLCで5%アセトニトリルを含む150mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 4.5) か7.5%アセトニトリルを含む50 mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.0) で溶出した。

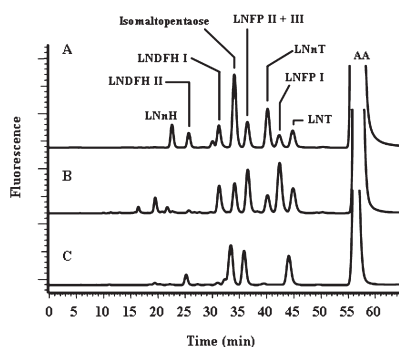


図6 AA標識化したヒトミルクオリゴ糖のHPLC (1)(4~6糖画分)
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのHPLC。
(C) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm)カラムを使用し、5%アセトニトリルを含む150mMクエン酸ナトリウムbuffer (pH 4.5)で溶出した。

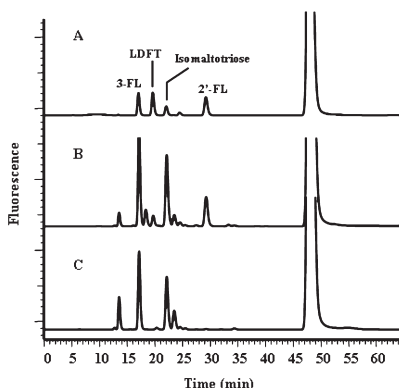


図7 AA標識化したヒトミルクオリゴ糖のHPLC (2)(3糖画分)
(A) 既知量の標準オリゴ糖のHPLC。
(B) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのHPLC。
(C) LNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC。
HPLCは、ODS-100Z (4.6×250mm, pore size 100Å, particle size 5μm)カラムを使用し、7.5%アセトニトリルを含む50mM酢酸アンモニウムbuffer (pH 4.0)で溶出した。

表3 産後5~10日とその後の各ヒトミルクオリゴ糖濃度 (g/L)

Oligosaccharide	Transitional Milk (g/L) 5-10 days post-partum (n=8)	Mature Milk (g/L) > 10 days post-partum (n=8)
LNnH	0.14 ± 0.11	0.02 ± 0.02
LNDFH II	0.96 ± 0.44	0.69 ± 0.78
LNDFH I	0.74 ± 0.68	1.31 ± 1.71
LNFP II + III	5.30 ± 1.41	2.77 ± 2.14
LNFP I	0.26 ± 0.58	0.35 ± 0.45
LNT	3.90 ± 1.86	1.31 ± 0.59
LNnT	0.46 ± 0.36	0.20 ± 0.29
LDFT	0.05 ± 0.06	0.14 ± 0.19
3-FL	1.67 ± 0.82	2.35 ± 1.39
2'-FL	0.22 ± 0.37	0.69 ± 0.81

図6、図7にHPLCのプロファイル、表3に各オリゴ糖の定量分析値を示した。図6、図7にはLNFP Iや2'-FLなどのオリゴ糖を含むドナーのパターンと含まないドナーのパターンを示した。それらのオリゴ糖を含まないドナーのHPLC

プロファイルは非常に単純である。表3には定量されたオリゴ糖の平均値を示したが、初乳、常乳とも日本人の初乳でえられた値と著しく異なっていることが理解されるであろう。すなわち、サモア人の母乳で最も優先的なオリゴ糖はLNFP II および III、ついでLNTであり、2'-FLやLNFP I は少ない。これはサモア人女性において非分泌型ドナーが優先的であることを意味する。サモア人の多くは非分泌型であり、少数の人はもともとサモア人に対し後に移住してきた人たちが混血して、少量の2'-FLやLNFP I を分泌するようになったとも考えられる。これははるか昔、東南アジア地域からサモアに移住してきた人々が、東南アジアの中でも非分泌型ドナーの限られた集団であった可能性を示唆している。最も優先的なピークには、タイプI型のLNFP II とタイプII型のLNFP III が含まれ、現段階までにこの2つのオリゴ糖の分離には成功していない。どちらがより優先的なオリゴ糖であるかわからないが、LNFP II のコアであるLNT (タイプI型)とLNFP III のコアであるLNnT (タイプII型)では、LNTの方がはるかに優先的である。これはLNFP IIの方がLNFP III よりも優先的であることを推定させ、サモア人女性の乳でもタイプI型オリゴ糖の方がタイプII型オリゴ糖よりも優先的であると考えの方が妥当であろう。

表4 定量分析した酸性ヒトミルクオリゴ糖

oligosaccharide		MW	Structure
3'-Sialyllactose	(3'-SL)	633.6	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc
6'-Sialyllactose	(6'-SL)	633.6	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc
3'-Sialyl-3-fucosyllactose	(3'S-3FL)	779.7	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc
Sialyllacto-N-tetraose a	(LSTa)	998.9	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-tetraose b	(LSTb)	998.9	Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-tetraose c	(LSTc)	998.9	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-fucopentaose I	(SLNFP I)	1145	Fuc α 1-2Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Sialyllacto-N-fucopentaose II	(SLNFP II)	1145	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Disialyl-lacto-N-tetraose	(DSLNT)	1290	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

4. 日本人女性における酸性ミルクオリゴ糖の定量分析⁵⁾

日本人女性において泌乳開始1~3日の初乳において、表4に示したような代表的な酸性オリゴ糖の定量分析を行った。乳試料に脱イオン水を添加し、同様にクロロホルム/メタノール (2:1, v/v)抽出を行って糖質画分を得た。得られた画分はBond Elut NH2 (1 g/6 mL)によるアニオン交換固相抽出カラムクロマトグラフィーに供して、酸性糖と中性オリゴ糖およびラクトースに分画した。すなわち脱イオン水に溶解した上の画分を同カラムにのせ、水で洗浄した後に吸着した酸性オリゴ糖を含む成分を、0.5Mピリジ

ン酢酸buffer (pH 5.0)で溶出した。溶出液に内標準キシロース溶液(500 μ g/ml)を加えてから凍結乾燥し、ついで中性オリゴ糖の分析と同様Hondaらの方法によってPMPによる標識化を行った。PMP標識化した酸性オリゴ糖画分はDISMIC-13CP膜を通過してから100Vカラムによる逆相HPLCに供した。溶出は10%および25%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH 7.0) (各々buffer CおよびDとする)で、65%から95.7%までのbuffer Dの直線濃度勾配で115分間、0.2mL/minの流速で行った。各PMP化標識した標準オリゴ糖の内標準物質に対するピーク面積の割合は、各種濃度で予め求めた。各オリゴ糖の定量は、内標準物質に対するピーク面積比から求めた。

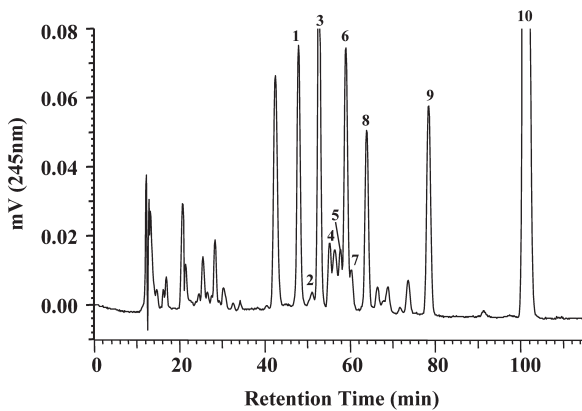


図8 PMP標識化した酸性ヒトミルクオリゴ糖のHPLC
ピーク 1: ジシアリルラクト-N-テトラオース (DSLNT); 2: シアリルラクト-N-フコペンタオース I (SLNFP I); 3: 6'-シアリルラクトース (6'-SL); 4: シアリルラクト-N-テトラオース b (LSTb); 5: 3'シアリル-3-フコシルラクトース (3'-3FL)+シアリルラクト-N-フコペンタオース II (SLNFP II); 6: シアリルラクト-N-テトラオース c (LSTc); 7: シアリルラクト-N-テトラオース a (LSTa); 8: 3'-シアリルラクトース (3'-SL); 9: ラクトース; 10: キシロース (内標準物質)。
HPLCは、100Vカラムを使用し、10%および25%アセトニトリルを含む100mMリン酸buffer (pH7.0) (各々buffer CおよびDとする)で、65%から95.7%までのbufferDの直線濃度勾配で115分間、0.2mL/minの流速で溶出した。

表5 泌乳開始1~3日の酸性ヒトミルクオリゴ糖濃度 (mg/L)

Oligosaccharide	Day of lactation (n=20, Means $\pm$ SD, mg/L)				P
	Day 1	Day 2	Day 3	Means	
3'-SL	362.32 $\pm$ 102.66 ^a	269.33 $\pm$ 70.07 ^b	258.36 $\pm$ 80.44 ^b	296.67 $\pm$ 96.29	< 0.0001
6'-SL	341.83 $\pm$ 119.51 ^b	371.44 $\pm$ 114.68 ^{ab}	396.29 $\pm$ 85.73 ^a	369.86 $\pm$ 108.19	0.0071
LSTa	106.97 $\pm$ 85.24 ^b	154.53 $\pm$ 117.53 ^a	162.44 $\pm$ 111.45 ^a	141.13 $\pm$ 106.76	< 0.0001
LSTb	68.42 $\pm$ 22.24	63.97 $\pm$ 24.78	61.53 $\pm$ 27.21	64.64 $\pm$ 24.57	N.S.
LSTc	659.06 $\pm$ 297.4	706.75 $\pm$ 260.69	693.18 $\pm$ 242.7	686.32 $\pm$ 264.1	N.S.
SLNFP I	75.92 $\pm$ 54.82	79.81 $\pm$ 36.71	78.27 $\pm$ 65.37	78.00 $\pm$ 52.72	N.S.
DSLNT	479.91 $\pm$ 126.33	447.41 $\pm$ 109.72	459.05 $\pm$ 150.56	462.12 $\pm$ 128.45	N.S.
3'-3FL+SLNFP II	148.38 $\pm$ 43.97	156.24 $\pm$ 63.84	165.41 $\pm$ 43.76	156.67 $\pm$ 51.00	N.S.

ヒト初乳から抽出した酸性オリゴ糖のHPLCは図8に、ならびに泌乳開始1~3日間の定量分析値は表5に示した。酸性オリゴ糖の中で最も優先的なのは、LSTcであり、ついでDSLNT, 6'-SL, 3'-SL, LSTaの順であった。各酸性オリゴ糖の含有量は、2'-FL, LNFPI, LNDFHI,

LNTなどの主要中性オリゴ糖よりも低かった。上の結果、人乳では6'-SLは3'-SLよりも優先的であったが、泌乳開始1日目ではその含有量はおおよそ等しいことが注目される。ウシ初乳などにおいては、3'-SLの方が6'-SLよりも優先的である。現代人は出産時の痛みを和らげるため陣痛緩和剤を処置されることの影響で、泌乳の開始が産後2~3日後に遅れることが多い。その間に新生児に人工調合乳を与えることが多いが、上のデータはウシ初乳などより分離した3'-SL主体のシアリルオリゴ糖を人工調合乳に添加することの意義を示していると考えられる。調合乳の原料となるウシの常乳においては、シアリルオリゴ糖の含有量は極めて低い。

表6 中性ヒトミルクオリゴ糖濃度の文献値 (g/L)

Oligosaccharide	Concentration (g/L)					
	Kunz et al ⁽¹⁾	Chaturvedi et al ⁽²⁾	Thurl et al ⁽³⁾	Coppa et al ⁽⁴⁾ (Day 4)	Coppa et al ⁽⁴⁾ (Day 60)	Asakuma et al ⁽⁵⁾ (Day 2)
2'-FL	0.45 $\pm$ 0.43	2.43 $\pm$ 0.26	1.84	3.93 $\pm$ 1.11	1.84 $\pm$ 0.39	2.01 $\pm$ 1.07
3'-FL	0.07 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.10	0.46	0.34 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.26
LDFT		0.43 $\pm$ 0.04	0.17			0.28 $\pm$ 0.30
LNT	1.09 $\pm$ 0.47	0.55 $\pm$ 0.08	0.86	0.84 $\pm$ 0.29	1.56 $\pm$ 0.57	1.44 $\pm$ 0.70
LNnT	Tr	0.17 $\pm$ 0.03	0.11	2.04 $\pm$ 0.55	0.95 $\pm$ 0.83	0.54 $\pm$ 0.14
LNFPI	1.26 $\pm$ 1.11	1.14 $\pm$ 0.18	0.67	1.36 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.61	2.08 $\pm$ 1.67
LNFP II			0.20	0.29 $\pm$ 0.22	0.29 $\pm$ 0.16	
LNFP III			0.28			
LNDFHI		0.50 $\pm$ 0.06	0.58	0.79 $\pm$ 0.25	1.18 $\pm$ 0.22	1.87 $\pm$ 1.55
LNDFH II	0.16 $\pm$ 0.11	0.09 $\pm$ 0.01	0.25			0.020 $\pm$ 0.025
LNH			0.13	0.07 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.02	

表7 酸性ヒトミルクオリゴ糖濃度の文献値 (g/L)

Oligosaccharide	Concentration (g/L)				
	Kunz et al ⁽¹⁾	Martin-Sosa et al ⁽⁶⁾	Bao et al ⁽⁷⁾ (Day 3 to 5)	Bao et al ⁽⁷⁾ (Day 9 to 21)	Asakuma et al ⁽⁵⁾ (Day 1 to 3)
3'-Neu5AcL	0.300 - 0.500	0.100 - 0.300	0.097 $\pm$ 0.038	0.076 $\pm$ 0.014	0.297 $\pm$ 0.096
6'-Neu5AcL	0.100 - 0.300	0.200 - 0.300	0.335 $\pm$ 0.033	0.396 $\pm$ 0.054	0.370 $\pm$ 0.108
LSTa	0.030 - 0.200	1.700 - 3.800	0.026 $\pm$ 0.011	-	0.141 $\pm$ 0.107
LSTb	-	-	0.131 $\pm$ 0.064	0.074 $\pm$ 0.026	0.065 $\pm$ 0.025
LSTc	0.100 - 0.600	1.400 - 3.000	0.232 $\pm$ 0.058	0.148 $\pm$ 0.060	0.686 $\pm$ 0.264
SLNFP I					0.078 $\pm$ 0.053
SLNFP II			-	0.025 $\pm$ 0.018	
DSLNT	0.200 - 0.600	0.700 - 1.500	1.274 $\pm$ 0.503	0.795 $\pm$ 0.234	0.462 $\pm$ 0.128

5. オリゴ糖定量分析値の方法論による違い

表6および表7には、中性および酸性ヒトミルクオリゴ糖の定量分析値について、文献的な違いを示した。Chaturvedi⁽¹²⁾はメキシコ人女性の乳から中性オリゴ糖画分をO-ベンゾイル誘導体化後、Raininn Microsorb C-8カラムを用いアセトニトリル/イオン交換水を溶出液とするHPLCによって各オリゴ糖の定量分析を行っている。Coppa⁽¹⁴⁾はイタリア人女性のオリゴ糖画分を標識化しないで高pHアニオン交換カラムによる分離方法を使用して定量分析した。上の両者とも乳から抽出した糖質画分から、ラクトースとオリゴ糖の分離を行っていない。

Bao⁽¹⁷⁾は45%のメタノールを添加した100mM SDSを

含む200mMリン酸buffer (pH 7.05)をrunning bufferとするキャピラリー電気泳動法によって、アメリカ人女性の乳について12の酸性オリゴ糖を分離し、定量分析を行った。他の文献値と比べ、筆者らの定量値に比較的近いが、DSLNTの濃度が異なっている。

これらの文献における各ミルクオリゴ糖の定量分析値の違いは、定量方法による違いか、人種による違いか、泌乳期による違いかは明らかではないが、正確な分析方法を確立するために、同一試料を使用した分析方法の比較検討を行うことが今後の検討課題と考えられる。

また、著者らのこれまでの本シリーズにおけるミルクオリゴ糖研究¹⁸⁻²⁷⁾および関連研究²⁸⁻³⁸⁾の紹介も是非参照して頂き、ミルクオリゴ糖の多様性の生物学的意義などについてご興味を持って頂けたら幸いである。

引用文献

- 1) Urashima, T., Kitaoka, M., Asakuma, S. and Messer, M. *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 3, Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. Third Edition. McSweeney, P.L.H. and Fox, P.F (Eds.), Springer, New York (2009).
- 2) Amano, J., Osanai, M., Orita, T., Sugahara, D. and Osumi, K. *Glycobiology* **19**, 601-614 (2009).
- 3) Asakuma, S., Urashima, T., Akahori, M., Obayashi, H., Nakamura, T., Kimura, K., Watanabe, Y., Arai, I. and Sanai, Y. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 488-494 (2008).
- 4) Leo, E., Asakuma, S., Nakamura, T., Fukuda, K., Senda, A. and Urashima, T. *J. Chromatogr. A*. **1216**, 1520-1523 (2009).
- 5) Asakuma, S., Akahori, M., Kimura, K., Watanabe, Y., Nakamura, T., Tsunemi, M., Arai, I., Sanai, Y. and Urashima, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1447-1451 (2007).
- 6) Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K. and Nakamura, J. *Anal. Biochem.* **180**, 351-357 (1989).
- 7) Takemoto, H., Hase, S. and Ikenaka, T. *Anal. Biochem.* **145**, 245-250 (1985).
- 8) Ruiz-Palacios, G., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. and Newburg, D.S. *J. Biol. Chem.* **278**, 14112-14120 (2003).
- 9) Urashima, T., Odaka, G., Asakuma, S., Uemura, Y., Goto, K., Senda, A., Saito, T., Fukuda, K., Messer, M. and Oftedal, O.T. *Glycobiology* **19**, 499-508 (2009).
- 10) Anumula, K.R. and Dhume, S.T. *Glycobiology* **8**, 685-694 (1998).
- 11) Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W and Braun, D. *Br. J. Nutr.* **82**, 391-399 (1999).
- 12) Chaturvedi, P., Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickerling, L.K. and Newburg, D.S. *Glycobiology* **11**, 365-372 (2001).
- 13) Thurl, S., Muller-Werner, B. and Sawatzki, G. *Anal. Biochem.* **235**, 202-206 (1996).
- 14) Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A. and Gabrielli, O. *Acta Paediatr. Suppl.* **430**, 89-94 (1994).
- 15) Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. and Strobel, S. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 699-722 (2000).
- 16) Martin-Sosa, M.J., Martin, L.A., Garcia-Pardo and Hueso, P. *J. Dairy Sci.* **86**, 52-59 (2003).
- 17) Bao, Y., Zhu, L. and Newburg, D.S. *Anal. Biochem.* **370**, 206-214 (2007).
- 18) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **154**, 13-21 (1994).
- 19) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **165**, 15-20 (1997).
- 20) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **167**, 3-9 (1998).
- 21) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **173**, 2-8 (1999).
- 22) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **175**, 3-8 (2000).
- 23) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **176**, 18-21 (2000).
- 24) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **177**, 11-16 (2000).
- 25) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **183**, 20-24 (2002).
- 26) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **184**, 2-6 (2002).
- 27) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. **201**, 2-5 (2006).
- 28) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *化学と生物*, **31**, 80-82 (1993).
- 29) Messer, M., 浦島 匡, *化学と生物*, **33**, 816-824 (1995).
- 30) 浦島 匡, 中村 正, 齋藤忠夫, *Milk Science*, **46**, 211-220 (1997).
- 31) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **37**, 401-403 (1999).
- 32) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *バイオサイエンスとインダストリー*, **57**, 619-620 (1999).
- 33) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *畜産の研究*, **53**, 1155-1160 (1999).
- 34) 齋藤忠夫, *Milk Science*, **48**, 199-205 (1999).
- 35) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *シープジャパン*, **33**, 11-13 (2000).
- 36) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **38**, 447-451 (2000).
- 37) 齋藤忠夫, *乳業技術 (創立50周年記念号)*, **50**, 38-57 (2000).
- 38) 浦島 匡, 齋藤忠夫, 中村 正, 荒井威吉, *Milk Science*, **49**, 195-202 (2000).