

# ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(XII)

Comparative Biochemistry of Milk Oligosaccharides (XII)

—ラクト-N-ビオースによるビフィズスフローラ形成—

—Construction of Bifidobacterium flora by lacto-N-biose—

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

TADA0 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

著者らは、このミルクオリゴ糖シリーズの初回に、ヒトミルクオリゴ糖(HMO)の基本骨格(コア)構造に基づく分類とその化学構造上の特徴などについて概説した<sup>1)</sup>。最近、天野らによりラクト-N-デカオースおよびラクト-N-ネオデカオースを基本骨格(コア)とする新規な20種類のオリゴ糖が加わり、新しく13系列からなるHMOのコア構造を提案されていることは前回紹介した<sup>2)</sup>。最近、日本人の研究者によりHMOの人乳における存在意義について、ビフィズス菌との関連性で魅力的な学説が提出された。また、本稿の著者の一人である浦島によっても、ヒトに近縁である霊長類のミルクオリゴ糖の構造化学研究より、ヒトの進化とビフィズス菌の共生についての学説(共生進化説)も提出された。本稿では、以上の学説などを紹介することで、さらにミルクオリゴ糖の哺乳動物における存在意義と重要性について考察することにする。

## 2. HMOとビフィズスフローラの形成

ヒトでは、ウシの場合よりもはるかに複雑な化学構造のミルクオリゴ糖を初乳期だけでなく常乳期にも分泌する。人乳には多量の糖質が含まれており、その常乳中での含量は乳糖(ラクトース)の約7g/dlに加えて、HMOは1.2–1.4g/dlにも達する。初乳ではさらに高いHMOが含まれ、2.2–2.4g/dlにも達する。HMOの種類は豊富であり、現在

までに115種類の化学構造が報告されており、いまだに新規のオリゴ糖の報告が続いている。人乳HMOでは、それぞれの基本骨格のオリゴ糖に、フコース(Fuc)やN-アセチルノイラミン酸(NeuAc)などが結合してさらに複雑な化学構造を示すことが知られている。これらのHMOの生体での役割には、

- ・ プレバイオティクスとしての作用(小腸で消化されずに大腸に到達し、乳酸桿菌やビフィズス菌の特異的な糖源・C源・エネルギー源・炭素源となる)
- ・ 感染防御因子としての作用(可溶性の細菌レセプターアナログとして *Campylobacter jejuni* などの病原性細菌やノロウイルスなどが腸管上皮に付着するのを阻止する)などの役割が推定されている。最近、食品総合研究所の北岡本光博士らの研究グループにより、HMO側からの研究でなく、腸内でこれらを資化するビフィズス菌側からのアプローチにより、HMOの存在意義の一端が解明された。

母乳栄養児では、生後一週間以内に腸内細菌叢(フローラ)が *Bifidobacterium* (ビフィズス菌) により最優勢になることが知られている(図1)。このように、腸内細菌全体の95~99.9%がビフィズス菌に占有されるフローラの状態を「ビフィズスフローラ」と呼んでいる<sup>3,4)</sup>。一方、牛乳を原料とする育児用調製粉乳(粉ミルク)では、ラクチュロースやガラクトオリゴ糖などの有用オリゴ糖が添加されている場合でも、10%はエンテロバクテリアが占め、ビフィズス菌による占有率は70–90%に止まり、母乳栄養児には及ばない。このビフィズス菌占有率の差異は、人乳に含まれている

HMOに由来するものと考えられている。人乳には多種類のHMOが含まれているために、それらの内のどれかの分子がビフィズスフローラの形成に重要な働きをしていると推定されていたが、その詳細は不明であった。

母乳栄養児における腸内フローラのビフィズス菌にどのような菌種がいるだろうか。森永乳業(株)は、4ヶ月齢の母乳のみを飲んでいる乳児糞便より、腸内フローラ解析を培養法により実施した。その結果、*Bifidobacterium (B.)breve*が77%、*B.pseudocatenulatum*が17%、*B.bifidum*が3%、*B.longum*が2%およびその他が1%を占めていた。すなわち、乳児の腸内フローラは完全にビフィズスフローラになっており、その約8割は*B.breve*に偏っていることが判った。この結果は、乳児糞便の「培養法」による菌数定量の結果であり、非培養法(遺伝子法)を用いればまた違った結果が出るだろう。培養法でコロニーが得られない菌は難培養性菌(uncultured bacterium)と呼ばれているが、そのような菌がヒト腸管にも沢山存在することが知られている。

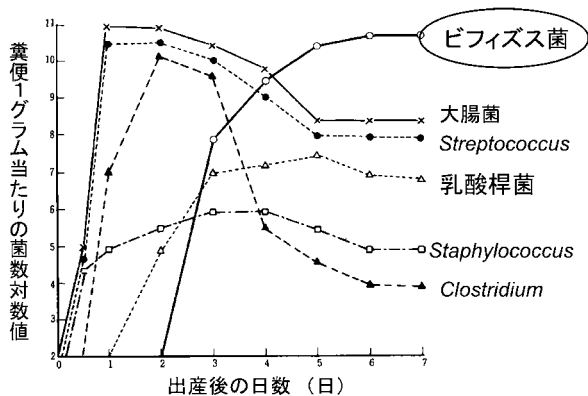


図1 ヒト新生児の生後7日までの腸内細菌叢の推移

### 3. ビフィズス菌におけるLNBの資化経路の発見

1999年、Derensy-Dronらにより、*B.bifidum*の菌体内酵素としてラクト-N-ビオースホスホリラーゼ(LNBP; EC 2.4.1.211)の存在が、染色体DNA(ゲノム)中に推定された<sup>5)</sup>。この酵素は、ラクト-N-ビオース(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc)とガラクト-N-ビオース(Gal $\beta$ 1-3GalNAc)の両基質を加水分解する加リン酸分解酵素である。本酵素の最大の特徴は、他の加リン酸分解酵素と異なり、ガラクトシド結合に作用する唯一の酵素であり、ムチン代謝に関連してビフィズス菌が腸管粘膜のムチン糖鎖を分解する酵素と推定されていた。しかしながら、本酵素はその後精製されることはなく、完全な遺伝子情報

報は全く不明であった。

2005年、食品総合研究所の北岡らは、*B.bifidum* JCM1254をグルコース糖源で培養後、菌体破砕液から各種クロマトグラフィーを駆使してLNBPと思われる酵素を精製した<sup>6)</sup>。本酵素の分子量は約86 kDaであり、N-末端配列と内部の合計2ヶ所のアミノ酸配列のBlast searchを行った。その結果、ゲノム既読のビフィズス菌である*B.longum* NCC2705株のBL1641遺伝子のコードする機能未知タンパク質と高い相同性を示した。そこで、基準株*B.longum* JCM1217から相当遺伝子BL1641のクローニングを行い、酵素を大腸菌中に大量発現させた。得られた組み替え酵素は、活性測定よりLNBPであることが初めて確認された。本酵素は、全く新しい酵素ファミリー(EC 2.4.1.211)に属することが判明し、*Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*などの他の主要な腸内細菌ゲノム中には本酵素をコードする遺伝子は見出されず、腸内細菌ではビフィズス菌にのみ特異的な酵素と考えられた。これは、腸内でビフィズス菌の優位性を説明できる重要な出発情報となった。

*B.longum* NCC2705株において本酵素をコードする遺伝子上流および下流域の遺伝子解析を進めた結果、図2に示したような一連の遺伝子クラスターが明らかとなり、また各遺伝子がコードする各酵素の役割が明らかとなった<sup>7,8)</sup>。

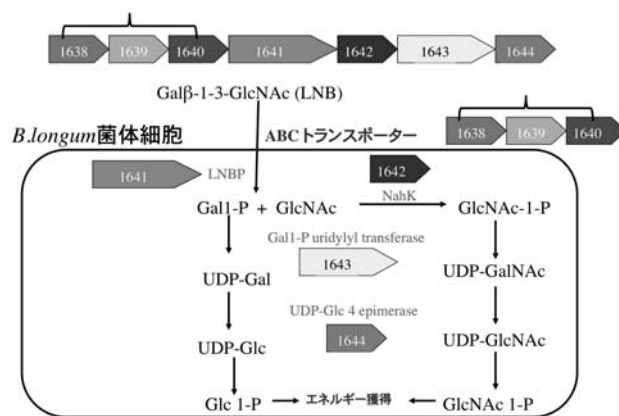


図2 *B.longum* NCC2705におけるLNB資化性の遺伝子クラスター<sup>7,8)</sup>

すなわち、初めの3つの遺伝子1638, 1639, 1640がコードするのは糖の取込みに関するABCトランスポーターであった。本タンパク質は、ラクト-N-ビオースを認識して細胞内に取り込む重要な役割を持ち、他の腸内細菌よりも糖源確保の観点で大きく優位に立てる。ついで、取り込まれたラクト-N-ビオースは遺伝子1641がコードするLNBP

により加リン酸分解を受け、Gal-1-PとGlcNAcに分かれる。直接Gal-1-Pが得られることは、通常のβ-ガラクトシダーゼと比較してリン酸基を転移させる際のATPを一分子節約できるので、他の腸内細菌よりもさらに優位に立てる。その他でも遺伝子1643のコードするGal-1-P uridylyl transferaseはUDP-GalとUDP-GalNAcを同時に生合成でき、また遺伝子1644のコードするUDP-Glc 4 epimeraseはUDP-GlcとUDP-GlcNAcを同時にエピメリ化でき、その後のGlc-1-PとGlcNAc-1-Pは解糖系でエネルギーを獲得できる。以上のように、この菌株ではいかに他の腸内細菌と比較して優位にラクト-N-ビオースを資化利用できるかが良く理解できる。

#### 4. ビフィズス菌とラクト-N-ビオースの関係

ビフィズス菌はラクト-N-ビオースを特異的に菌体内に取り込み、資化利用できることが判った。実際にHMOの化学構造を検討すると、ラクト-N-ビオース (Galβ1-

3GlcNAc)に代表される(1→3)結合の「I型構造」と、N-アセチルラクトサミン(Galβ1-4GlcNAc)に代表される(1→4結合)の「II型構造」に2分される。図3では、HMOの基本骨格中でこのI型構造のラクト-N-ビオース部分を下線で示した。ビフィズス菌の有する特徴的なLNBPは、HMOの約50%以上を占めるI型オリゴ糖を利用できる優位性を持つことが理解される。

しかし、実際には人乳中には遊離状態で2糖のラクト-N-ビオースが存在している訳ではなく、HMOの分子構造の中に構成単位として組み込まれている。したがって、この2糖単位をHMOから酵素的加水分解で取り出さなくては、ビフィズス菌は優位性を他の腸内細菌に対して発揮できない。例えば、人乳中に多く含まれているHMOの一つに、ラクト-N-フコペンタオースI(5糖)があり、化学構造は  $Fuc\alpha 1-2Gal\beta 1-3GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc$  である。この5糖には確かに下線部のラクト-N-ビオースが構成単位として含まれているが、この2糖単位を得るためには非還元末端側のFucのα結合を加水分解するα-

##### 1 ラクトース系列

基本MO: Galβ1-4Glc (直鎖2糖)

##### 2 ラクト-N-テトラオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (直鎖4糖)

##### 3 ラクト-N-ネオテトラオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (直鎖2糖)

##### 4 ラクト-N-ヘキサオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc (分岐6糖)

##### 5 ラクト-N-ネオヘキサオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc (分岐6糖)

##### 6 パララクト-N-ヘキサオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (直鎖6糖)

##### 7 パララクト-N-ネオヘキサオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (直鎖6糖)

##### 8 ラクト-N-オクタオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc (分岐8糖)

##### 9 ラクト-N-ネオオクタオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-3[Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc (分岐8糖)

##### 10 イソラクト-N-オクタオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3[Galβ1-3GlcNAcβ1-4Galβ1-6GlcNAcβ1-6]Galβ1-4Glc (分岐8糖)

##### 11 パララクト-N-オクタオース系列

基本MO: Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (直鎖8糖)

##### 12 ラクト-N-デカオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-6[Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4GlcNAcβ1-6-  
[Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc (分岐10糖)

##### 13 ラクト-N-ネオデカオース系列

基本MO: Galβ1-4GlcNAcβ1-6[Galβ1-4GlcNAcβ1-3]Galβ1-4GlcNAcβ1-6-  
[Galβ1-3GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc (分岐10糖)

Glc: D-グルコース  
Gal: D-ガラクトース  
GlcNAc: N-アセチルグルコサミン  
下線部の2糖: ラクト-N-ビオース

図3 人乳中のヒトミルクオリゴ糖(HMO)の化学構造による分類

コシダーゼが必要である。また、同時に2糖の還元末端側を内部から加水分解するラクト-N-ビオシダーゼが必要である。その後のクローニングと大腸菌発現実験により、 $\alpha$ -フコシダーゼ<sup>9)</sup>およびラクト-N-ビオシダーゼ<sup>10)</sup>の存在が *B. bifidum* JCM1254株において確認された。

しかしながら、ビフィズス菌の持つフコシダーゼの活性は余り強くないことが指摘されており、実際に腸内でのHMOの資化利用には、他の腸内菌のフコシダーゼなどで切り出されたオリゴ糖を間接利用している可能性もあり、今後の研究課題として残されている。初期にラクト-N-ビオースの特異的資化性で優位にたったビフィズス菌は、その後は人乳中に7%と多量に含まれるラクトースを糖源として増殖しているのかもしれない。

森永乳業(株)の肖(清水)博士らと北岡博士らの共同研究により、ラクト-N-ビオースを資化するビフィズス菌側の特徴について報告がなされている(表1)<sup>11)</sup>。すなわち、各種のビフィズス菌株に対して、ラクト-N-ビオースを資化するかどうかを検討し、また同時にこの2糖の分解利用に関するGLNBP遺伝子を保持しているかどうかを試験した。その結果、*B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*の4菌種がラクト-N-ビオースを資化し、かつGLNBP遺伝子も保有していることが判った。その他のビフィズス菌である*B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*などでは本2糖を資化することができず、またGLNBP遺伝子も保有していないことが判った。この研究では、乳児糞便から単離したビフィズス菌はラクト-N-ビオースを良く利用し、成人や他の動物由来のビフィズス菌はこの2糖を分解利用出来ないことが判明し、母乳栄養児のHMOによるビフィズスフローラの形成を強く支

持している。

北岡博士のラクト-N-ビオース説は、母乳栄養児のビフィズスフローラ形成を説明するには、極めて有力な学説と考えられる。しかしながら、ビフィズス菌はHMO中のラクト-N-ビオース含有オリゴ糖から、どの程度積極的にこの2糖単位を切り出して利用しているかは全く不明である。とくに、ビフィズス菌のフコシダーゼ活性や2糖単位を切り出すラクト-N-ビオシダーゼの実際の腸管内フローラでの発現と酵素活性の強さなどはまだ明らかにされていない。また、ラクト-N-ビオースを実際に摂取した乳児腸管における、腸内フローラの非培養法による解析やメタゲノム解析が将来望まれている。

2008年、カリフォルニア大学デービス校のMills教授らの研究グループは、*B. longum* subsp. *infantis*の菌株において、大きな分子量のHMOをまず菌体に取り込み、菌体内において非還元末端から逐次酵素で加水分解利用する新しい代謝経路を報告した<sup>12)</sup>。北岡らの代謝経路とは全く別の経路を利用している、取り込み利用方法の報告である。彼らは、本菌株のゲノム中には高分子量オリゴ糖を特異的に取り込むトランスポーター遺伝子と共に、 $\beta$ -ヘキシサミニダーゼ、シアリダーゼ、フコシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどの一連の糖鎖分解酵素から成る遺伝子クラスターを発見し、7糖以下のオリゴ糖の代謝利用を明快に説明できるとしている。従って、*B. longum* subsp. *infantis*では、高分子量のHMOを他の腸内細菌よりも取り込み段階から有効利用できることが説明でき、この学説からも母乳栄養児の早期ビフィズスフローラ形成を十分説明可能と考えられる。一方、ビフィズス菌の中でも*B. longum* subsp. *longum*では、他の乳酸菌と比較して6糖や7糖のフルクトオリゴ糖を優先的に $\beta$ -フルクトフラノシダーゼによりフルクトースを切り出した後に、それを酢酸に資化利用し、腸管出血性O-157などの大腸菌を撃退できることが知られている。これは、離乳後に同菌株が食品中のフルクトオリゴ糖を利用する機構を示していると考えられる。

表1 ビフィズス菌の各菌種によるLNBの資化性とGLNBP遺伝子の有無<sup>11)</sup>

ビフィズス菌種名	主な分離源	供試菌数	LNB資化	GLNBP遺伝子有無
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	成人、乳児	6	6	6
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	乳児	21	21	21
<i>B. breve</i>	成人、乳児	9	9	9
<i>B. bifidum</i>	成人、乳児	6	6	6
<i>B. pseudocatenulatum</i>	乳児、動物	61	32	0
<i>B. adolescentis</i>	成人	51	0	0
<i>B. catenulatum</i>	成人	13	0	0
<i>B. angulatum</i>	成人	3	0	0
<i>B. dentium</i>	口腔	16	0	0
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	動物	4	3	3
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	動物	7	0	0
<i>B. pseudolongum</i>	動物	5	4	4
<i>B. thermophilum</i>	動物	5	0	0

## 5. ラクト-N-ビオースと特定保健用食品(トクホ)

平成3年(1991年)、当時の厚生省により特定保健用食品(トクホ)の制度が開始された。平成23年2月の段階では、合計960品目以上の商品が、許認可され市販されている。トクホの市場は7,000億円市場と拡大しているが、その

約50%を占めるのが、「おなかの調子を整える食品」であり、発酵乳(ヨーグルト)、オリゴ糖および食物繊維である。トクホに使用されている整腸作用が期待されるオリゴ糖には、乳果オリゴ糖(ラクトスクロース)、ガラクトオリゴ糖およびラクチュロースなどが知られている。これらの3種類のオリゴ糖は、いずれも牛乳に多量に含まれている比較的安価な乳糖(ラクトース)を出発材料としている。ラクト-N-ビオースも将来的に大量合成できれば、そのビフィズス因子としての有用な作用や安全性を確認することが可能となるため、本2糖を大量合成するという試みも北岡らの研究グループにより既に開始されている<sup>13)</sup>。

西本と北岡は4種類の酵素であるSP, GalT, GalE, GLNBPを用いて、糖基質としてのスクロースとUDP-GlcおよびGlcNAcに対して反応させることで、高い収率でラクト-N-ビオースを得ることに成功した。反応の内容は図4に示した。7L規模の培養液で反応させた調製実験では、反応収率87%という高い収率を得ている。ただし、反応酵素は全て大腸菌による組み換え体を用いる実験室レベルの試みであるので、実際の食品への利用にはさらに工夫が必要とされている。しかし、北岡らの試みは、将来的に必ず実現するだろうと考えている。また、現在のトクホに認可されているオリゴ糖では、乳果オリゴ糖もラクチュロースも天然界には存在しない人工オリゴ糖であり、ガラクトオリゴ糖もHMOの中では存在比は低いものである。従って、HMOの約50%以上に構造単位として含まれるラクト-N-ビオースの安全な大量調製法が確立すれば、これらの添加した育児用調製粉乳では人乳に匹敵するビフィズスフローラを実現させることが可能ではないかと、大いに期待されている。

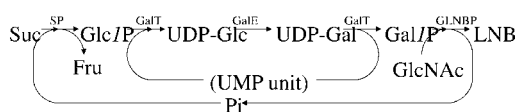
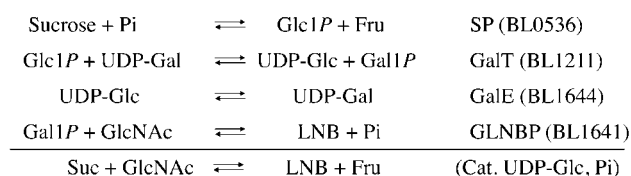


図4 4酵素の同時反応によるLNB生産法<sup>13)</sup>

## 6. ヒトとビフィズス菌の共生進化説

ヒトは二足歩行と脳の発達により胎盤が小さくなり、その結果、妊娠期間が短縮され、未熟な新生児を出産するようになった。しかし、未熟な新生児は細菌やウイルスなどによる感染に極めて弱いので、母乳中に乳児を感染から守る成分の合成と分泌が必要であったと考えられる。浦島らは、ボノボ、ゴリラ、オラウータンおよびテナガザルなどの類人猿や旧世界ザルおよび新世界ザルの乳や初乳中のミルクオリゴ糖の種類と化学構造に関する検討を行った<sup>12, 13)</sup>。その結果、ラクト-N-ビオースを含むタイプI型オリゴ糖は、チンパンジー、ボノボ、オラウータンには存在するものの、タイプII型オリゴ糖の方が優先的であった。従って、乳中でのタイプI型オリゴ糖の優先性は、人乳にのみ特徴的であることが判明した。この研究成果は極めて重要であり、タイプI型オリゴ糖はヒト乳児の腸内にビフィズス菌を住み着かせることに極めて有利に働いたと推定される。

また、Albrechtらの研究<sup>14)</sup>では、母乳栄養児の糞便中のオリゴ糖を解析した結果では、タイプI型のラクト-N-テトラオースが母乳レベルよりも著しく含有量が低かったという事実や、ラクト-N-ネオヘキサオースからラクト-N-ビオースが切り出された結果、タイプII型オリゴ糖のみが残ったオリゴ糖像が確認されるなど、タイプI型HMOが優先的に腸内ビフィズス菌に利用されている可能性が示唆されている。人乳中のHMOの約50%以上はラクト-N-ビオースを構造単位として含むタイプI型のオリゴ糖であり、これらのプレバイオティクスとしての働きにより、乳児が感染から守られるようになったヒトとビフィズス菌の共生関係を彷彿させる学説である。

## 7. おわりに

ミツバチの腸管にもビフィズス菌の存在が報告されている。母乳栄養児におけるビフィズスフローラとHMOの関係は、北岡博士のラクト-N-ビオース仮説により大分理解が進んできた。しかし、この仮説だけでは説明できないことも確かなようである。この仮説以外にも、ビフィズス菌の乳児腸管や成人腸管における存在や優位性を説明するMills学説も存在し、どちらも重要であるように考えられる。いずれにしても、HMOの存在意義に関するより詳細な実験を計画するには、多量のオリゴ糖が試験材料として必

要であり、現時点ではあまりにも高価なためにそれらの実験を実施することが不可能である。北岡博士らの遺伝子工学を駆使した試みにより、将来的に各種のHMOが自由に酵素合成できるようになれば、さらに神秘的な乳児フローラ解析が飛躍的に進展するものと期待されている。

また、著者らがこれまで本誌にて発表したミルクオリゴ糖研究<sup>1,2,17-25</sup>、および関連研究<sup>26-37</sup>の紹介も是非参照して頂き、MOの多様性の生物学的意義と将来的な高度利用性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) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No.154, 13-21 (1994)
- 2) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 215, 3-8 (2010)
- 3) Rotimi, VO. and Duerden, B.I., *J. Med. Microbiol.*, **14**, 51-58 (1981)
- 4) Benno, Y. and Mitsuoka, T., *Bifidobacter. Microflora*, **5**, 13-25 (1986)
- 5) Derensy-Dron, D., Krzewinski, F., Brassart, C. et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 3-10 (1999)
- 6) Kitaoka, M., Tian, J. and Nishimoto, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3158-3162 (2005)
- 7) Nishimoto and M., Kitaoka, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6444-6449 (2007)
- 8) Kitaoka, M., Tian, J. and Nishimoto, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3158-3162 (2005)
- 9) Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T. et al., *J. Bacteriol.*, **186**, 4885-4893 (2004)
- 10) Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3996-4004 (2008)
- 11) Xiao, J.Z., Takahashi, S., Nishimoto, M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 54-59 (2010)
- 12) Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18964-18969 (2008)
- 13) Nishimoto, M. and Kitaoka, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2101-2104 (2007)
- 14) Urashima, T., Odaka, G., Asakuma, S. et al., *Glycobiol.*, **19**, 499-508 (2009)
- 15) Goto, K., Fukuda, K., Senda, A. et al., *Glycoconj. J.*, **27**, 703-715 (2010)
- 16) Albrecht, S., Schols, H.A., van den Heuvel EGMM et al., *Electrophoresis*, **31**, 1264-1273 (2010)
- 17) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 165, 15-20 (1997)
- 18) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 167, 3-9 (1998)
- 19) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 173, 2-8 (1999)
- 20) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 175, 3-8 (2000)
- 21) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 176, 18-21 (2000)
- 22) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 177, 11-16 (2000)
- 23) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 183, 20-24 (2002).
- 24) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 184, 2-6 (2002)
- 25) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 201, 2-5 (2006)
- 26) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *化学と生物*, **31**, 80-82 (1993)
- 27) Messer, M., 浦島 匡, *化学と生物*, **33**, 816-824 (1995)
- 28) 浦島 匡, 中村 正, 齋藤忠夫, *Milk Science*, **46**, 211-220 (1997)
- 29) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **37**, 401-403 (1999)
- 30) 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)
- 31) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *畜産の研究*, **53**, 1155-1160 (1999)
- 32) 齋藤忠夫, *Milk Science*, **48**, 199-205 (1999)
- 33) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *シープジャパン*, **33**, 11-13 (2000)
- 34) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **38**, 447-451 (2000)
- 35) 齋藤忠夫, *乳業技術(創立50周年記念号)*, **50**, 38-57 (2000)
- 36) 浦島 匡, 齋藤忠夫, 中村 正, 荒井威吉, *Milk Science*, **49**, 195-202 (2000)
- 37) 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)