

人乳中のシアリルラクトース含量の泌乳期変化

井戸田 正, 松岡 康浩, 中 埜 拓

川 上 浩, 中 島 一 郎

雪印乳業株式会社技術研究所

Changes in the Sialyllactose Content of Human Milk during Lactation

Tadashi IDOTA, Yasuhiro MATSUOKA, Taku NAKANO,

Hiroshi KAWAKAMI and Ichiro NAKAJIMA

Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Kawagoe 350-11

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 47, 363~367 (1994)

The contents of 3'-sialyllactose and 6'-sialyllactose in human milk were determined by high-performance liquid chromatography in 2,279 specimens of human milk collected between 3 and 482 days postpartum from 2,434 mothers living in various districts of Japan in the winter and summer of 1989. The content of 3'-sialyllactose remained at between 10 and 17 mg/100 ml during lactation, whereas that of 6'-sialyllactose decreased from 77.8 mg/100 ml to 12.8 mg/100 ml in summer milk, and from 75.9 mg/100 ml to 9.6 mg/100 ml in winter milk. The 6'-sialyllactose content at the end of lactation was about 14-17% of that in colostrum. The total amount of 3'-sialyllactose and 6'-sialyllactose decreased from 85-90 mg/100 ml (3-15 days postpartum) to 25 mg/100 ml (241-482 days postpartum). The ratio of NeuAc in total sialyllactose to that in whole milk increased from 28.6% (3-5 days postpartum) to 46.0% (121-240 days postpartum). The ratio of NeuAc in sialyllactose to that in the 12% TCA-soluble fraction increased from 39.2% (6-10 days postpartum) to 63.3% (121-240 days postpartum). The data presented here indicate that sialyllactose is the most abundant NeuAc-containing oligosaccharide in human milk and an important source of sialic acid for infants.

Key Words human milk, 3'-sialyllactose content, 6'-sialyllactose content, lactation.

(Received June 6, 1994)

乳児にとって最適な栄養組成物である母乳を科学的に分析して成分を把握することは、乳児栄養学上きわめて重要であるのみならず、母乳代替品である乳児用調製粉乳(育児用粉乳)を開発する上でも基本となる。

わが国の育児用粉乳は、人乳の成分、組成および機能を目標として、タンパク質、脂質、糖質などの成分が改良されてきているが、糖質の改良はほかの成分に比べて遅れている。現在までに行われた人乳糖組成への近似化は、乳糖の増量のほかには乳児腸管内でのビフィズフローラの形成と乳児の便性の改善を目的とした6'-ガラクトシルラクトースの配合¹⁾がみられるのみである。この理由は、人乳中の糖質、とくに、オリゴ糖の成分、組成、機能が明らかでなかった²⁾ことと人乳オリゴ糖の工業的規模での調製が困難であったことにある。

人乳にはオリゴ糖が0.3~2.4 g/100 ml含まれてお

り³⁾⁻⁶⁾、現在までに3~22個の単糖から構成される約130種類のオリゴ糖が報告されている³⁾⁷⁾。これら人乳に含まれるオリゴ糖の生物学的意義は、まだ十分に明らかにされてはいないが、従来から知られているビフィズス活性のほか、最近では、細菌やトキシンの上皮細胞への結合を阻害する効果が報告されている。すなわち、ある種類の人乳オリゴ糖は、大腸菌エンテロトキシンの腸管上皮細胞レセプターへの結合と、*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*の呼吸器、消化管および尿管上皮細胞レセプターへの付着を拮抗的に阻止する⁸⁾⁹⁾⁻¹²⁾。

シアリルラクトース(SL)は、古くから人乳に含まれることが知られているオリゴ糖であるが、人乳中には3'-SLおよび6'-SLが存在する⁶⁾。人乳のSLは、生体内でのシアル酸の合成能が未熟¹³⁾で、また、中枢神経系の器官形成と機能発達が急速な新生児¹⁴⁾にとっての重要なシアル酸の供給源と考えられている³⁾。このほか、ビフィ

ズス活性¹⁵⁾, コレラトキシン¹⁶⁾の中和作用¹⁶⁾という感染防御機能も示唆されている。そのため、最近では、SLを牛乳から調製する技術が確立され²⁾, SLを配合した育児用粉乳も開発されている。

しかし、人乳中のSL含量に関する報告⁶⁾¹⁷⁾は少なく、泌乳期などを考慮した系統的な分析も行われていない。そのため、われわれは、育児用粉乳の母乳近似化のための指標を得る一環として、人乳中のSL含量を測定した。また、シアル酸の給源としてのSLの意義を把握するため、総シアル酸およびオリゴ糖に含まれるシアル酸に対するSL型シアル酸の割合も併せて検討した。検体は、あらかじめ設定した採取基準を満たした人乳のみを用いた。

実験方法

1. 対象および試料

前報¹⁸⁾に示すように、1989年1月～3月(冬季乳)と7月～9月(夏季乳)の2期に分けて北海道から沖縄に至る全国46地区に在住する年齢17～41歳の授乳婦2,434名から2,727検体の人乳を得た。このうち、①母親は健康で過度の偏食、ビタミン剤の服用がない、②正常分娩である、③母乳哺育である、④乳児の体重が出生から搾乳時まで乳幼児身体発育値の3～97パーセントイル内にある、⑤搾乳時刻は午前9時から午後6時とする、⑥手動式搾乳器を用いて搾乳する、⑦哺乳開始約2分後からの中間乳である(分娩後3～5日の検体は全量採取した)という基準をすべて満たした2,279検体を対象とした。なお、人乳の採取に際しては、事前に目的を説明し理解を得た。

泌乳期別の混合試料は、分娩後日数によって3～5日、6～10日、11～15日、16～30日、31～60日、61～120日、121～240日、241～482日の8期に分けて冬季乳、夏季乳ごとに等量混合して調製した。

2. SL含量の測定

人乳1.5 mlを37°Cで5分間加温し、4°C、10,000×g、30分間遠心分離した後、クリーム層を除去し脱脂乳を得た。この脱脂乳1 mlにエタノールを4 ml加え、十分攪拌した後、4°Cで30分間静置した。さらに、4°C、3,000×g、30分間遠心分離して得た上清をロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固して試料とした。純水で試料を再溶解し、5 mlに定容した後、クロマトディスク(ポアサイズ0.45 μm, クラボウ(特製))で濾過した。測定はBerghらの方法¹⁹⁾を一部変更してHPLCで行った。カラムはUnisil Q NH₂ 4.6×250 mm (GLサイエンス(特製)), 移動相はアセトニトリルおよび15 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 5.2)の混液(70:30), 流速は1.5 ml/min, 検出は196 nmで実施した。なお、標準物質にはヒト初乳由来の3'-SLおよび6'-SL(Bio Carb製)を用いた。

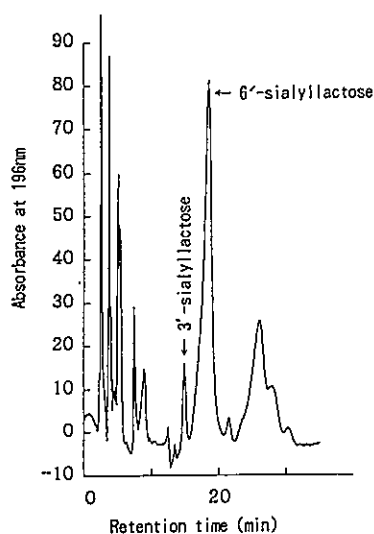


Fig. 1. HPLC profile of 80% ethanol soluble fraction from human skimmed milk.

Column, Unisil Q NH₂ 4.6×250 mm; mobile phase, 70:30 (v/v) acetonitrile-15 mM potassium phosphate (pH 5.2); flow-rate, 1.5 ml/min.

実験結果

HPLCで人乳SLを分析した際のクロマトグラムの1例をFig. 1に示す。また、夏季および冬季試料の3'-SLおよび6'-SL含量の泌乳期変化をTable 1に示す。

3'-SL含量は、夏季乳、冬季乳ともに全泌乳期を通じて10～17 mg/100 mlの範囲内で推移した。一方、6'-SL含量は、分娩後6～10日の夏季乳で77.8 mg/100 ml, 冬季乳で75.9 mg/100 mlと最高値を示した後、泌乳期を経るとともに減少し、分娩後241～482日では夏季乳で12.8 mg/100 ml, 冬季乳で9.6 mg/100 mlと初乳の約14～17%になった。また、分娩後241～482日の6'-SL含量は、3'-SL含量より低値を示した。なお、3'-SL含量および6'-SL含量には季節間で一定の傾向を認めなかった。

総SL含量の泌乳期変化を夏季および冬季試料の平均値でFig. 2に示す。

初乳および移行乳の総SL含量は、85～90 mg/100 mlであったが、泌乳期を経るとともに減少し分娩後241～482日では約25 mg/100 mlを示した。

総シアル酸中および12%TCA可溶性画分中のシアル酸²⁰⁾に占めるSL型シアル酸の割合を夏季および冬季試料の平均値でTable 2に示した。

総シアル酸あたりのSL型シアル酸の割合は、分娩後3～5日の28.6%から分娩後121～240日の46.0%まで増加した。12%TCA可溶性画分中のシアル酸あたりの

Table 1. Contents of sialyllactose in human milk at various days after delivery.

| Days after delivery | 3'-sialyllactose (mg/100 ml) | | 6'-sialyllactose (mg/100 ml) | |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | Summer milk* ¹ | Winter milk* ² | Summer milk* ¹ | Winter milk* ² |
| 3~5 | 17.1 | 14.4 | 73.8 | 70.6 |
| 6~10 | 13.1 | 13.2 | 77.8 | 75.9 |
| 11~15 | 12.9 | 12.3 | 73.5 | 72.1 |
| 16~30 | 13.9 | 15.4 | 56.6 | 65.5 |
| 31~60 | 12.9 | 12.3 | 46.4 | 45.7 |
| 61~120 | 12.7 | 13.5 | 24.8 | 25.8 |
| 121~240 | 10.2 | 11.7 | 25.0 | 14.3 |
| 241~482 | 15.0 | 13.0 | 12.8 | 9.6 |

*¹ Human milk was collected in summer. *² Human milk was collected in winter.

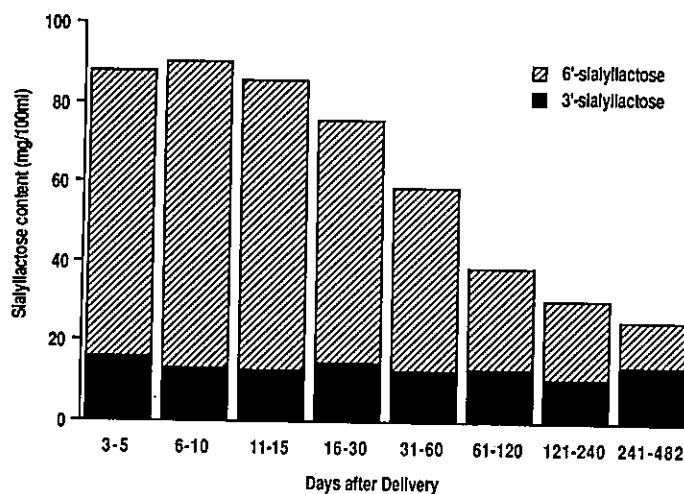


Fig. 2. Changes in sialyllactose content in human milk after delivery.

SL型シアル酸の割合は、分娩後6~10日で39.2%と最低値を示した後、分娩後121~240日の63.3%まで増加した。

考 察

人乳のSL含量については、すでに1956年Kuhn and Brossmer¹⁷⁾によって、ヒトの初乳に55~70 mg/100 ml、成乳に50~60 mg/100 ml含まれることが報告されている。われわれの分娩後3~5日の初乳および分娩後1~2カ月の成乳のSL含量は、おのおの約88 mg/100 mlおよび約60 mg/100 mlであり、彼らの報告値¹⁷⁾に比べ、初乳では高値を示し、成乳ではほぼ同じ値を示した。しかし、われわれの得た分娩後16~482日の成乳におけるSL含量は、25~76 mg/100 mlの範囲内にあり、Kuhn and Brossmerの50~60 mg/100 ml¹⁷⁾に比べて大きな変動を示した。また、最近、Kunz and Rudloff⁹⁾は、人乳中に3'-SLが10~30 mg/100 mlと6'-SLが30~50 mg/100 ml含まれると報告しており、人乳のSL含量は40~80 mg/100 mlとなる。われわれの結果でもほぼ同じ

値を示した。

人乳のシアル酸は、オリゴ糖、糖タンパク質および糖脂質の構成糖として存在する²¹⁾。また、シアル酸を含有する人乳オリゴ糖としては、3'-SL、6'-SLのほか、シアリルラクト-N-テトラオース、ジシアリルラクト-N-テトラオースなどが知られている⁹⁾。これらの形態で人乳中に含まれているシアル酸は、生体内でのシアル酸の合成能が未熟¹³⁾で、中枢神経系の器官形成と機能発達が急速な乳児¹⁴⁾にとって重要な供給源となっていると考えられる⁹⁾が、SLがどの程度寄与しているかは不明である。人乳中のSLの意義を知るためには、総シアル酸およびオリゴ糖に含まれるシアル酸あたりのSL型シアル酸の割合を把握する必要があると考えられる。清沢²²⁾は、総シアル酸の約50%がSL、シアリルフコシルラクトースなどのオリゴ糖として存在すると推察している。しかし、人乳中の総シアル酸あたりのSL型シアル酸の割合については報告が見当たらない。われわれの結果では、分娩後3~5日の28.6%から分娩後121~240日の46.0%の範囲内にあり、SLはシアル酸の供給源として重要な役

Table 2. Ratios of NeuAc contents of sialyl-lactose to total NeuAc content in human milk and NeuAc content in 12% TCA-soluble fraction at various days after delivery.

| Days after delivery | Ratio to total NeuAc*1 (%) | Ratio to NeuAc in 12% TCA sup.*1 (%) |
|---------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 3~5 | 28.6 | 39.7 |
| 6~10 | 29.8 | 39.2 |
| 11~15 | 32.1 | 42.6 |
| 16~30 | 37.4 | 48.9 |
| 31~60 | 39.5 | 52.2 |
| 61~120 | 43.1 | 58.4 |
| 121~240 | 46.0 | 63.3 |
| 241~482 | 39.7 | 53.8 |

*1 Total NeuAc content in human milk and NeuAc content in the supernatant from defatted milk treated with 12% TCA are from our previous report.²⁰⁾

割を有していると考えられた。また、オリゴ糖に含まれるシアル酸あたりのSL型シアル酸の割合は、Kunz and Rudloffの報告⁶⁾から算出すると約40~60%と推定される。今回の結果でも初乳および移行乳で約40%、成乳で約50~60%を占めており、SLはシアル酸を含有する人乳オリゴ糖のなかで最も多く含まれる成分と考えられた。

人乳の3'-SLおよび6'-SL含量については、Kunz and Rudloff⁶⁾によって、おのおの10~30 mg/100 ml, 30~50 mg/100 ml含まれると報告されている。われわれの結果でも成乳の3'-SL含量は、約10~15 mg/100 mlであり、ほぼ同値を示した。また、分娩後1~2カ月の成乳の6'-SL含量も約46 mg/100 mlとほぼ同じ値を示した。しかし、分娩後16~482日の全成乳期を通じてみると、約10~60 mg/100 mlの範囲内にあり、彼らの報告値⁶⁾に比べ大きな変動を示した。

このSLを経口摂取した場合の生体での利用性について、Wittら²³⁾は、新生ラットを対象として、Nöhle and Schauer²⁴⁾は、20日齢の離乳期ラットを対象として、ラジオアイソトープでラベルしたSLを投与し検討している。投与6時間後の体内保持量をWittら²³⁾は、24.5%、Nöhle and Schauer²⁴⁾は、1.5%と報告している。このように、Nöhle and Schauer²⁴⁾の結果が著しく低値を示したのは、彼らが外因性シアル酸の生理的要求が低い20日齢の離乳期ラットを用いたためと考えられる。一方、Morganらのグループ^{25)~27)}やCarlson and House²⁸⁾は、14日齢の授乳期ラットにシアル酸を経口もしくは腹腔内投与すると、大脳と小脳のガングリオシドや糖タン

パク質に含まれるシアル酸量が増加し、学習能も上昇することを報告している。

このほか、3'-SLおよび6'-SLは、新生児髄膜炎や敗血症の原因菌の一つであるS-fimbriaeを持つ大腸菌さらにはインフルエンザウイルスA、Bのレセプターである⁹⁾¹¹⁾¹²⁾ことから、これら細菌とウイルスの感染から乳児を守る作用をしていると考えられている。

このように、人乳に多量に含まれるSLは、乳児にとって重要な栄養学的、生理学的機能を果たしていると考えられるが、未だ不明な点も多く、さらに検討すべき課題と考える。

要 約

全国46地区で採取した2,279検体の人乳を対象として、3'-SLおよび6'-SL含量を泌乳期および季節別に測定した。3'-SL含量は、全泌乳期を通じて10~17 mg/100 mlとほぼ一定値を示した。一方、6'-SL含量は、分娩後6~10日の夏季乳で77.8 mg/100 ml、冬季乳で75.9 mg/100 mlと最高値を示した後、泌乳期を経るとともに減少し、分娩後241~482日では夏季乳で12.8 mg/100 ml、冬季乳で9.6 mg/100 mlと初乳の約14~17%になった。総SL含量は、初乳および移行乳で約85~90 mg/100 mlを示した後、泌乳期を経るとともに減少し、分娩後241~482日では約25 mg/100 mlであった。また、乳中総シアル酸あたりのSL型シアル酸の割合は、分娩後3~5日で最低値28.6%を示した後、分娩後121~240日の46.0%まで増加した。12%TCA可溶性画分中のシアル酸あたりの割合は、分娩後6~10日に最低値39.2%を示した後、分娩後121~240日の63.3%まで増加した。SLは、人乳中に最も多く含まれるシアル酸含有オリゴ糖であり、乳児にとってシアル酸の重要な供給源と考えられた。

文 献

- 1) 三橋重之, 吉浜 誠, 八尋政利, 西川 勲, 出家栄記, 阿彦健吉, 光岡知足: 腸内フローラと栄養(光岡知足編), 45 (1983), 学会出版センター(東京)
- 2) Hurrell, R.F., Berrocal, R., Neeser, J.-R., Schwizer, T.F., Hilpert, H., Traitler, H., Colarow, L. and Lindstrand, K.: *Micronutrients in Milk and Milk-based Food Products* (Renner, E., ed.), 259 (1989), Elsevier Applied Science (London)
- 3) Harzer, G. and Hascheke, F.: *Micronutrients in Milk and Milk-based Food Products* (Renner, E., ed.), 192 (1989), Elsevier Applied Science (London)
- 4) 斎藤健輔: 乳児栄養学(高井俊夫編), 44 (1968), 朝倉書店(東京)
- 5) Coppa, G.V., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A. and Giorgi, P.L.: *Pediatrics*, 91, 637 (1993)
- 6) Kunz, C. and Rudloff, S.: *Acta Paediatr.*, 82, 903 (1993)

- 7) Newburg, D.S., Daniel, P.F., O'Neil, N.E. and McCluer, R.H. : Human Lactation 2 (Hamosh, M. and Goldman, A.S., eds.), 581 (1986), Plenum Press (New York)
- 8) Cleary, T.G., Chambers, J.P. and Pickering, L.K. : *J. Infect. Dis.*, **148**, 1114 (1983)
- 9) Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergard, T. and Savanborg-Edén, C. : *J. Infect. Dis.*, **153**, 232 (1986)
- 10) Cravito, A., Tello, A., Villafán, H., Ruiz, J., del Vedovo, S. and Neeser, J.-R. : *J. Infect. Dis.*, **163**, 1247 (1991)
- 11) Parkkinen, J., Finne, J., Achtman, M., Väisänen, V. and Korhonen, T.K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 456 (1983)
- 12) Korhonen, T.K., Väisänen, V., Rhen, M., Pere, A., Parkkinen, J. and Finne, J. : *J. Bacteriol.*, **159**, 762 (1983)
- 13) Kikuchi, K., Kikuchi, H. and Tsuiki, S. : *Biochim. Biophys. Acta*, **252**, 357 (1971)
- 14) Vanie, M.T., Holm, M., Öhman, R. and Svennerholm, L. : *J. Neurochem.*, **18**, 581 (1971)
- 15) Idota, T., Kawakami, H. and Nakajima, I. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 印刷中 (1994)
- 16) 菅原牧裕, 高橋伸彰, 村上雄二, 石山由美子, 井戸田正 : 農化, **63**, 796 (1989)
- 17) Kuhn, R. and Brossmer, R. : *Chem. Ber.*, **89**, 2013 (1956)
- 18) 井戸田正, 桜井稔夫, 石山由美子, 村上雄二, 窪田潤一, 伊井直記, 坂本隆男, 土岐良一, 下田幸三, 浅居良輝 : 日本小児栄養消化器病学会雑誌, **5**, 145 (1991)
- 19) Bergh, M.L.E., Koppen, P. and Van Den Einden, D. H. : *Carbohydr. Res.*, **94**, 225 (1981)
- 20) 井戸田正, 松岡康弘, 菅原牧裕, 村上雄二, 伊井直記, 土岐良一, 浅井良輝, 中島一郎 : 栄食誌, **47**, 357 (1994)
- 21) Carlson, S.E. : *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 720 (1985)
- 22) 清沢 功 : 酪農科学・食品の研究, **27**, A175 (1978)
- 23) Witt, W., von Nicolai, H. and Zilliken, F. : *Nutr. Metab.*, **23**, 51 (1979)
- 24) Nöhle, U. and Schauer, R. : *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 1457 (1984)
- 25) Morgan, B.L.G. and Winick, M. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **161**, 534 (1979)
- 26) Morgan, B.L.G. and Winick, M. : *J. Nutr.*, **110**, 416 (1980)
- 27) Morgan, B.L.G. and Winick, M. : *Br. J. Nutr.*, **46**, 231 (1981)
- 28) Carlson, S.E. and House, S.G. : *J. Nutr.*, **116**, 881 (1986)

(1994年6月6日受理)