

最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第六報)

—人乳ガングリオシドの泌乳期別濃度変化と脂肪酸組成に関する研究—

雪印乳業株式会社 技術研究所

川上 浩・出家 栄記・村上 雄二・井戸田 正

Key Words: 人乳ガングリオシド, G_{M3} , G_{D3} , 泌乳期別濃度変化, 脂肪酸組成

要 旨

人乳ガングリオシド (G_{M3} および G_{D3})の泌乳期別濃度変化と、セラミド部分に含まれる脂肪酸組成を調べた。泌乳期を経るに従って G_{M3} は増加(2.0→13.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$)し、 G_{D3} は減少(8.1→2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)した。初乳では G_{D3} が主要なガングリオシドであったが、泌乳期11~15日目まで二つの濃度がほぼ等しくなり、成熟乳では G_{M3} の方が多かった。総ガングリオシド濃度は、泌乳期30日目まで10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後で一定であったが、泌乳期後半になると徐々に増加した。 G_{M3} と G_{D3} の脂肪酸組成はどちらも、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸、およびリグノセリン酸などの長鎖飽和脂肪酸と、エイコサジエン酸およびセラコレイン酸などの長鎖不飽和脂肪酸が多かった。こうした特徴的な濃度変化や脂肪酸組成が、乳児の生理学上どのような意味をもつのかを明らかにすることで、人乳ガングリオシドの生理的意義を知ることができると考えられた。

緒 言

人乳成分を明らかにすることは、乳児栄養学上重要であるばかりでなく、乳児用調製粉乳(育粉)を開発する指標を得るためにも欠かすことができない。我々は、1989年から全国規模の母乳調査を開始し、現在までに一般成分(蛋白質、脂肪、糖質、灰分)、ミネラル成分、脂肪酸組成、蛋白質組成、およびアミノ酸組成などを報告してきた^{1)~3)}。今回はこの調査の一環として、人乳中のシアル酸関連物質の一つであるガングリオシドを分析し、特徴的な濃度変化と脂肪酸組成を明らかにしたので報告する。

人乳ガングリオシドの生理的意義については、現在までに以下のような報告がある。すなわち、乳中では陰性の電荷をもつシアル酸の作用で、脂肪球被膜の安定性に寄与したり⁴⁾、被膜の形成過程で重要な役割をもつ⁵⁾とされている。また、乳児の消化管内ではガングリオシドをはじめとするシアルルクトースや κ -カゼインなどのシアル酸関連物質が細菌毒素、ウイルスおよび細菌などと、腸管粘膜上皮細胞との結合を拮抗的に阻害することによって感染防御効果を発揮することが報告されている^{6)~10)}。

人乳成分には生理作用の明らかでないものも多いが、その成分の泌乳期別濃度変化を調べることにより、存在意義を知る手掛かりが得られる可能性もある。人乳ガングリオシドの泌乳期変化については高見沢¹¹⁾の報告があり、 G_{M3} (NeuAc α 2→

別刷請求先: 〒350-11 川越市南台1-1-2
雪印乳業株式会社 技術研究所
川上 浩

3Gal β 1 \rightarrow 4Glc1 \rightarrow 1'Cer) が泌乳期とともに増加し、G_{D3} (NeuAc α 2 \rightarrow 8NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc1 \rightarrow 1'Cer) が減少すると言われている。しかしながら、定量の指標となる標準物質として、G_{M3}やG_{D3}ではなく牛の脳から分離したG_{M1} (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [NeuAc α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc1 \rightarrow 1'Cer) を用いているため、測定結果はガングリオシドに結合しているシアル酸のモル数で表されている。ガングリオシドは、セラミドの部分に含まれる脂肪酸の種類によって分子量が異なるため、一定の分子量をあてはめて含量を計算することができないが、我々は牛乳から分離したG_{M3}とG_{D3}を標準物質として、人乳に含まれるG_{M3}とG_{D3}を定量した。また、人乳ガングリオシドの脂肪酸組成については報告例がなく、その生理作用を明らかにする上でも重要であると考えたので分析した。

方 法

1. 人乳試料の採取

全国各地に在住する年齢17歳から41歳までの授乳婦2,434名から、2,727検体の人乳を採取した。このうち、母子の健康状態、乳児の体重、搾乳時刻、搾乳方法などの点で、あらかじめ設定した基準¹⁾に合致した2,279検体を分析の対象にした。1989年1～3月に集めた乳を冬季乳、同年7～9月の乳を夏季乳とし、次に示すような泌乳期に分けた。すなわち、分娩後日数を3～5日、6～10日、11～15日、16～30日、31～60日、61～120日、121～240日、および241～482日の8期間に分け、それぞれの期間にあてはまる複数の試料を等量ずつ混合して、各泌乳期毎の混合乳を調製した。

2. ガングリオシド濃度の測定

牛乳ガングリオシドG_{M3}およびG_{D3}は、和光純薬工業株式会社から純度99%の試薬を購入した。また、分析に用いたすべての試薬は、和光純薬工業株式会社の特級試薬を用いた。ガングリオシド濃度の測定は、以下のように行った。すなわち、人乳9mlにメタノール(99.5%) 24mlを添加して十分攪拌した後、クロロホルム12mlをさらに添加して攪拌し、超音波発生装置付きの水槽中で10分間超音波処理して脂質成分を抽出した。2,000×g

で15分間遠心分離して上清を回収した後、残った沈殿にクロロホルム：メタノールを1：2の割合で混合した溶媒(C/M(1/2) 溶媒) 40mlを添加し、再び超音波処理を10分間行った。この操作を合計3回繰り返して総脂質画分に相当する上清123mlを回収した。

クロロホルム：メタノール：水を4：8：3の割合で混合した溶媒(C/M/H(4/8/3) 溶媒)で平衡化したDEAE Sephadex A-25 (Pharmacia) 10mlを充填したカラム(15mm×100mm)に回収した上清を通した後、C/M/H(4/8/3) 溶媒40mlとメタノール40mlでカラムを洗浄し、中性脂質を除去した。樹脂に吸着している酸性脂質を0.2M酢酸ナトリウムを含むメタノール100mlで溶出し、この溶出液に50%水酸化ナトリウム溶液6mlを添加した後、37°Cで2時間攪拌してりん脂質をアルカリ分解した。酢酸でpHを7.0に調整した後、減圧下で濃縮して溶媒および水を蒸発させた。超純水100mlを添加して乾固物を溶解した後、4°Cで2晩過剰量の脱イオン水に対して透析した。この時、分子量1,000の透析膜 Spectra/Por 6 (SPECTRUM)を用いた。透析内液を減圧下で濃縮した後、クロロホルム：メタノールを85：15の割合で混合した溶媒(C/M(85/15) 溶媒) 20mlに溶解した濃縮物を、同溶媒で平衡化したシリカゲル Iatrobeds 6RS 8060 (IATRON) 4mlを充填したカラム(15mm×60mm)に通した。同溶媒20mlでカラムを洗浄した後、C/M(1/2) 溶媒20mlとC/M(1/9) 溶媒20mlでガングリオシド画分を溶出した。

ガングリオシド画分を減圧下で濃縮乾固した後、C/M(1/1) 溶媒0.5mlに溶かし、このうちの2 μ lをシリカゲルの薄層 HPTLC-Fertinplatten Kieselgel 60 (Merk) 上にスポットし、クロロホルム：メタノール：0.2%塩化カルシウム溶液を55：45：10の割合で混合した溶媒中で展開した。レゾルシノール塩酸試薬を噴霧した後、100°Cのホットプレート上で薄層板を加熱し、シアル酸含有成分のスポットを発色させた。この薄層クロマトグラムをクロマトスキャナーCS-930(島津製作所)を用いて580nmで分析した。G_{M3}およ

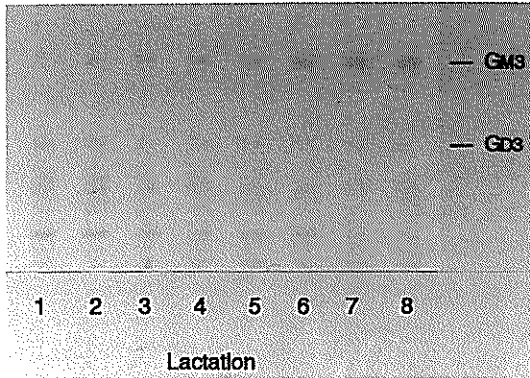


図1 人乳gangliosidの薄層クロマトグラム
 1: 泌乳期3~5日目; 2: 6~10日目;
 3: 11~15日目; 4: 16~30日目;
 5: 31~60日目; 6: 61~120日目;
 7: 121~240日目; 8: 241~482日目

びGD₃の1mg/ml溶液をC/M(1/1)溶媒で調製し、それぞれ0.2, 0.3, 0.5, および1.0μgを試料と同じ薄層板にスポットして検量線を作成した。

3. 人乳gangliosidの分画

定量に用いた人乳gangliosid画分を、C/M(85/15)溶媒に溶解し、同溶媒で平衡化したシリカゲル Iatrobeads 6RS 8060 (20ml)を充填したカラム(15mm×150mm)に通した。同溶媒60mlとC/M(20/80)溶媒60mlによるリニアグラジエントでクロマトグラフィーを行い、フラクションコレクターで2mlずつ分取した。溶媒の流速は0.8ml/minであった。全画分を2)項で示した薄層クロマトグラフィーに供し、GM₃とGD₃が単一分取されているフラクションをそれぞれ集めて回収した。

4. gangliosidの脂肪酸組成の分析

人乳から分離したgangliosid 1mgを、8.6%濃塩酸と82%メタノールを含む水溶液1mlに溶解し、70°Cで18時間加熱することによって、gangliosidから脂肪酸を遊離させた。室温まで冷却した後、ヘキサン2mlを添加し、十分混合して脂肪酸を抽出した。さらに、ピリジン:無水酢酸を1:1の割合で混合した溶媒に溶かし、80°Cで30分間加熱して脂肪酸をアセチル化した。ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析は、J&W社のFused silica DB-wax (30m×0.25mm)カラムを用いて行った。定性の標準となる脂肪酸は、Matreya社の試薬を用いた。

結 果

1. 泌乳期別gangliosid濃度

夏季乳から分離したgangliosid画分の薄層クロマトグラムを図1に示す。泌乳期を経るに従ってGM₃が増加し、GD₃は減少することが明らかとなった。GD₃の下に検出された数本のバンドは、抽出溶媒に混入したシアルルクトースなどのシアル酸を含むオリゴ糖であることを、標準シアルルクトースを用いて別途確認した(データ省略)。

GM₃とGD₃濃度の測定結果を表1に示す。夏季乳および冬季乳いずれにおいても、泌乳期を経るに従ってGM₃は増加(冬:1.7→13.4μg/ml;夏:2.3→14.4μg/ml)し、GD₃は減少(冬:7.2→2.0μg/ml;夏9.0→2.2μg/ml)した。夏季乳のgangliosid濃度は、冬季乳に比べて若干高い値をとる傾向がみられたが、有意な差ではなかった。

冬季乳と夏季乳の測定値を平均し、gangliosid

表1 泌乳期別および季節別の人乳gangliosid濃度

| Lactation | GM ₃ (μg/ml) | | GD ₃ (μg/ml) | |
|-----------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | Winter milk | Summer milk | Winter milk | Summer milk |
| Day 3-5 | 1.7±0.3 | 2.3±0.3 | 7.2±1.2 | 9.0±0.5 |
| 6-10 | 3.2±0.4 | 3.5±0.3 | 6.6±0.6 | 6.6±0.6 |
| 11-15 | 4.7±0.4 | 5.2±0.6 | 5.5±0.6 | 5.2±0.2 |
| 16-30 | 5.4±0.6 | 5.7±0.7 | 4.7±0.6 | 4.7±0.4 |
| 31-60 | 7.8±0.6 | 8.7±0.5 | 4.1±0.2 | 4.4±0.4 |
| 61-120 | 9.9±0.8 | 10.5±1.0 | 3.1±0.5 | 3.5±0.4 |
| 121-240 | 11.6±0.8 | 11.7±0.6 | 2.2±0.4 | 3.1±0.6 |
| 241-482 | 13.4±0.9 | 14.4±1.3 | 2.0±0.3 | 2.2±0.3 |

*Values represent means ±SD of three determinations.

シド濃度の泌乳期変化をグラフに示す(図2)。初乳ではG_{D3}が主要なガングリオシドであったが、泌乳期16日前後でG_{M3}とG_{D3}の濃度がほぼ等しくなり、その後の成熟乳ではG_{M3}が多くなることが分かった。

総ガングリオシド濃度(G_{M3}+G_{D3})の変化を図3に示す。泌乳期30日目までは10μg/ml前後で一定であったが、その後、泌乳期後半になると、総ガングリオシド濃度は徐々に増加した。

2. 脂肪酸組成

G_{M3}とG_{D3}の脂肪酸組成を表2に示す。どちらもほぼ同様の脂肪酸組成を示し、パルミチン酸(C

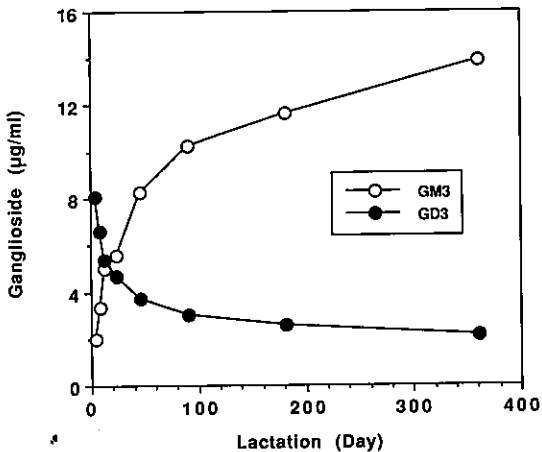


図2 人乳ガングリオシドの泌乳期別濃度変化

16:0), ステアリン酸(C18:0), アラキシン酸(C20:0), ベヘン酸(C22:0), およびリグノセリン酸(C24:0)などの長鎖飽和脂肪酸と、エイコサジエン酸(C20:2)およびセラコレイン酸(C24:1)などの長鎖不飽和脂肪酸が多かった。しかしながら、同定できない脂肪酸がG_{M3}で46.43%, G_{D3}で32.57%存在した。

考 察

人乳ガングリオシド濃度の泌乳期変化を調べた結果、G_{M3}は泌乳期を経るに従って増加し(2.0→13.9μg/ml), G_{D3}は減少する(8.1→2.1μg/ml)ことが確かめられた。高見沢ら¹¹⁾は、人乳ガングリオシドの泌乳期変化をすでに報告しているが、定量のための標準物質にG_{M1}を用いているため、測定結果をシアル酸のモル数で表示している。G_{M3}およびG_{D3}の分子量は、結合している脂肪酸によって異なるので特定できないが、それぞれ1,270(NeuAc:310;Gal:180;Glc:180;セラミド:600)および1,580(NeuAc:310;NeuAc:310;Gal:180;Glc:180;セラミド:600)と仮定して彼らの値を変換すると、G_{M3}は0.7~13.8μg/ml, G_{D3}は0.6~13.0μg/mlであった。彼らは個乳を分析しているため、混合乳を用いた今回の測定と一概に比較することはできないが、分析結果に大きな違いはなかった。

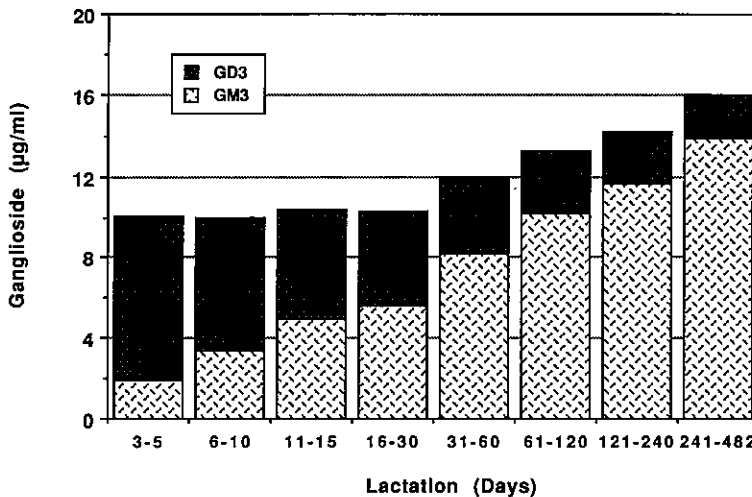


図3 総ガングリオシド濃度の泌乳期別濃度変化

表2 人乳ガングリオシドの脂肪酸組成

| Fatty acid | GM3 | GD3 |
|-------------------|------------|------------|
| C 8:0 | 0.37 | 0.38 |
| C10:0 | 0.05 | 0 |
| C12:0 | 0.31 | 0.36 |
| C13:0 | 0.24 | 0.92 |
| C14:0 | 1.75 | 1.65 |
| C15:0 | 0.63 | 0.60 |
| C16:0 | 7.00 | 6.86 |
| C16:1 n9 | 1.27 | 1.17 |
| C16:1 n7 | 0 | 0.56 |
| C17:0 | 0.36 | 0.34 |
| C18:0 | 6.13 | 5.24 |
| C18:1 n9 | 3.06 | 4.81 |
| C18:1 n7 | 0 | 0.23 |
| C18:2 n6 | 1.71 | 1.82 |
| C18:3 n6 | 0 | 0 |
| C18:3 n3 | 0 | 0 |
| C20:0 | 3.35 | 6.19 |
| C20:2 | 9.07 | 5.17 |
| C20:3 n6 | 0 | 0 |
| C20:4 n6 | 0 | 0 |
| C20:5 n3 | 0 | 0 |
| C21:0 | 0.25 | 0.26 |
| C22:0 | 6.33 | 8.35 |
| C22:6 n3 | 0 | 0 |
| C23:0 | 1.29 | 2.04 |
| C24:0 | 6.63 | 11.90 |
| C24:1 n9 | 4.19 | 8.65 |
| C25:0 | 0 | 0.31 |
| Unknown and Trace | 46.43 | 32.57 |
| (~ C14) | (8.73) | (5.49) |
| (C14 ~ C15) | (1.91) | (1.29) |
| (C15 ~ C16) | (3.88) | (4.85) |
| (C16 ~ C17) | (2.96) | (0) |
| (C17 ~ C18) | (2.56) | (2.47) |
| (C18 ~ C25) | (20.32) | (15.66) |
| (C25 ~) | (5.65) | (2.43) |
| Total | 100.00 (%) | 100.00 (%) |

人乳に含まれるほとんどの成分は初乳で濃度が高く、泌乳期を経るに従って減少する。特に、分泌型 IgA などの生理活性成分にはその傾向が強い。したがって、G_{D3}が初乳に多いということは、G_{M3}よりもG_{D3}の方に生理的意義があるとも考えられるが、成熟乳でG_{M3}が著しく増加することは、

この時期の乳児にとってG_{M3}が特異的な生理作用をもつ可能性も考えられる。一方、G_{D3}は増殖の盛んな細胞の細胞膜に多く存在するのに対して、G_{M3}は分化の進んだ細胞に多いことが知られている^{12)~14)}。乳中の脂肪を安定化させている脂肪球被膜は、乳腺細胞の細胞膜に由来することから¹⁵⁾、乳

中のガングリオシド組成が、乳腺細胞の増殖・分化状態を反映している可能性は高い。したがって、ガングリオシドの存在意義が乳腺細胞に限定されたものであり、単に乳腺細胞膜の一構成成分として乳中に移行しているだけなのか、それとも乳児に摂取された後に何らかの生理的意義をもつのかを今後詳細に調べる必要がある。現在までガングリオシドに関する研究は、細胞間の情報伝達¹⁶⁾¹⁷⁾、増殖と分化^{12)~14)}、免疫応答¹⁸⁾、細菌毒素・ウイルス・細菌などの接着¹⁹⁾、およびホルモンやリンホカインの受容体に対する機能²⁰⁾²¹⁾などの観点から進められてきた。乳児に関する研究としては、人乳ガングリオシドのエンテロトキシンやコレラトキシンの中和作用^{9)~10)}が明らかにされていることから、乳児の消化管内で感染防御因子として作用している可能性が高い。また、ラット胎児の脳的主要なガングリオシドがG_{D3}であるという報告²²⁾や、ラット乳児の腸管細胞の主要なガングリオシドがG_{M3}とG_{D3}であるという報告²³⁾からも、乳児における人乳ガングリオシドの生理的意義が示唆される。

人乳ガングリオシドの脂肪酸組成を分析した結果、G_{M3}とG_{D3}で大きな違いのないことが明らかとなった。乳中ガングリオシドの脂肪酸組成に関する報告は非常に少ないが、牛乳G_{M3}の脂肪酸には、パルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸(C18:0)およびオレイン酸(C18:1)が多く、G_{D3}の脂肪酸にはベヘン酸(C22:0)、トリコサン酸(C23:0)およびリグノセリン酸(C24:0)が多いことが報告されている¹⁰⁾。このようにG_{M3}とG_{D3}の脂肪酸組成が異なることは、両者に全く異なる生合成経路が存在する可能性を示唆する。しかしながら、現在までに明らかにされているガングリオシドの生合成経路では、 $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合に特異的なシアリルトランスフェラーゼの作用で、G_{M3}にシアリ酸1分子が結合してG_{D3}が生成すると考えられている²⁴⁾。したがって、G_{M3}とG_{D3}のセラミド(スフィンゴシン塩基+脂肪酸)部分は変化しないはずである。今回の結果では、G_{M3}とG_{D3}の脂肪酸組成に大きな違いがみられなかったことから、人乳のG_{D3}は現在明らかにされている

生合成経路でG_{M3}から合成されたものであると考えられた。また、泌乳期を経るに従ってG_{D3}が減少するということは、乳腺細胞におけるガングリオシドの生合成が、泌乳期後半になるとG_{D3}まで進んでいないことが示唆された。今後、このような人乳ガングリオシドの泌乳期別濃度変化や脂肪酸組成が、乳児の生理学上どのような意味をもつのかを明らかにすることによって、ガングリオシドの生理的意義を知ることができると考える。

結 論

人乳ガングリオシドの特徴的な泌乳期別濃度変化と脂肪酸組成が明らかになった。初乳の主要なガングリオシドはG_{D3}であるが、泌乳期16日目でG_{M3}とG_{D3}の濃度がほぼ等しくなり、成熟乳ではG_{M3}濃度の方が高かった。総ガングリオシド濃度は、泌乳期30日目まで10 μ g/ml前後で一定であったが、泌乳期後半になると徐々に増加した。G_{M3}とG_{D3}の脂肪酸組成はどちらもほぼ同様であり、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸、およびリグノセリン酸などの長鎖飽和脂肪酸と、エイコサジエン酸およびセラコレイン酸などの長鎖不飽和脂肪酸が多かった。今後、人乳G_{M3}とG_{D3}の泌乳期変化や脂肪酸組成が、乳児の生理学上どのような意味をもつのかを明らかにすることが、ガングリオシドの生理的意義を知るための重要な研究課題である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、母乳の提供にご協力を賜りました全国各地の病産院の先生、看護婦、栄養士の方々、およびお母様方に厚く御礼申し上げます。

尚、本稿の一部は、平成4年10月に開催された第19回日本小児栄養消化器病学会で発表した。

文 献

- 1) 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: 最近の日本人乳組成に関する全国調査(第一報)一般成分およびミネラル成分について。日本小児栄養消化器病学会雑誌 1991; 5: 145-158.
- 2) 井戸田正, 桜井稔夫, 菅原牧裕, 松岡康浩, 石山由美子, 村上雄二, 森口宏康, 竹内政弘, 下田幸三, 浅居良輝: 最近の日本人乳組成に関する全国調査(第二報)脂肪酸組成およびコレステロール, リン脂質含量

- について, 日本小児栄養消化器病学会雑誌 1991; 5: 159-173.
- 3) 井戸田正, 桜井稔夫, 菅原牧裕, 石山由美子, 村上雄二, 前田忠男, 矢野正幸, 下田幸三, 浅居良輝: 最近の日本人乳組成に関する全国調査(第三報) 総アミノ酸組成および遊離アミノ酸組成について, 日本小児栄養消化器病学会雑誌 1991; 5: 209-219.
 - 4) Huang R T C: Isolation and characterization of the gangliosides of butter milk. *Biochim Biophys Acta* 1973; 306: 82-84.
 - 5) Valivullah H M, Keenan T W: Intracellular precursors of milk lipid globules: fusion and fusogens. *J Cell Biol* 1986; 103: 527a.
 - 6) Løegred A, Kolstø Otnæss A-B, Fuglesang J: Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatr Res* 1986; 20: 416-421.
 - 7) Kolstø Otnæss A-B, Svennerholm A-M: Non-immunoglobulin fraction of human milk protects rabbits against enterotoxin-induced intestinal fluid secretion. *Infect Immun* 1982; 35: 738-740.
 - 8) Kolstø Otnæss A-B, Løegred A, Ertesvag K: Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun* 1983; 40: 563-569.
 - 9) Kawasaki Y, Isoda H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T, Ahiko K: Inhibition by lactoferrin and α -casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Biosci Biotech Biochem* 1992; 56: 195-198.
 - 10) 足立 達: 液状牛乳および発酵乳における糖質の生理機能. 山内邦男他編. 牛乳成分の特性と健康. 東京: 光生館, 1993: 139-170.
 - 11) 高見沢康太郎: 人乳・牛乳およびヤギ乳のガングリオンシド組成の特徴と細菌毒素に対する結合特性. *Jpn J Dairy Food Sci* 1988; 37: A259-A273.
 - 12) Willinger M, Schachner M: G_{M1} ganglioside as a maker for neuronal differentiation in mouse cerebellum. *Develop Biol* 1980; 74: 101-117.
 - 13) 辻 宗一: 生理活性糖脂質: 糖脂質機能の新たな見直し. *実験医学* 1988; 6: 21-27.
 - 14) 斎藤正樹: 脂質の生命科学: 細胞の分化と糖脂質の役割. *油化学* 1988; 37: 906-922.
 - 15) Keenan T W: Composition and synthesis of gangliosides in mammary gland and milk of the bovine. *Biochim Biophys Acta* 1974; 337: 255-270.
 - 16) Walsh F S, Triban C, Corazza R, Fiori M G: Differential effects of acetyl-L-carnitine, L-carnitine and gangliosides on nerve Na^+ , K^+ -ATPase impairment in experimental diabetes. *Diab Nutr Metab* 1992; 5: 31-36.
 - 17) 小島直也, 箱守仙一郎: 糖鎖情報の意義: 糖鎖を介する細胞間相互作用. *細胞工学* 1990; 9: 177-185.
 - 18) Dyatlovitskaya E V, Koroleva A B, Suskova V S, Rozynov B V, Bergelson L D: Influence of ganglioside G_{M3} and its breakdown products on lymphoblastic transformation and T-suppressor activity. *Eur J Biochem* 1991; 199: 643-646.
 - 19) Fukuta S, Magnani J L, Twiddy E M, Holmes R K, Ginsburg V: Comparison of the carbohydrate-binding specificities of Cholera toxin and *E. coli* heat-labile enterotoxins LTH-I, LT-IIa and LT-IIb. *Infect Immun* 1988; 56: 1748-1753.
 - 20) Hanai N, Nores G A, MacLeod C, Tores-Mendez C-R, Hakomori S: Ganglioside-mediated modulation of cell growth. *J Biol Chem* 1988; 263: 10915-10921.
 - 21) Hattori M, Horiuchi R: Biphasic effects of exogenous ganglioside G_{M3} on follicle-stimulating hormone-dependent expression of luteinizing hormone receptor in cultured granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 88: 47-54.
 - 22) Irwin L N, Michael D B, Irwin C C: Ganglioside patterns of fetal rat and mouse brain. *J Neurochem* 1980; 34: 1527-1530.
 - 23) Bouhours D, Bouhours J-F, Dorier A: G_{M3} and G_{D3} are the major gangliosides of rat fetal intestine. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713: 280-284.
 - 24) 滝 孝雄: 細胞分化と G_{D3} ガングリオシド. *医学のあゆみ* 1986; 137: 1006-1007.

Changes in the concentration of gangliosides in human milk during lactation and their fatty acid compositions

Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

Hiroshi KAWAKAMI, Eiki DEYA, Yuzi MURAKAMI, Tadashi IDOTA

Concentrations and fatty acid compositions of monosialoganglioside 3 (G_{M3}) and disialoganglioside 3 (G_{D3}) in human milk were analyzed. Over 2,700 specimens of human milk were collected from 2,434 mothers at 3-482 days postpartum living at various districts in Japan in the winter and summer of 1989. Ganglioside concentration was determined by thin layer chromatography after extraction of polar lipids in human milk. In the thin layer chromatography, silica gel plates were developed with chloroform/methanol/water containing 0.02% calcium chloride (55:45:10), sprayed with resorcinol-copper sulfuric acid-hydrochloric acid reagent to visualize glycolipids containing

sialic acids, and heated at 100°C for color development.

G_{M3} concentration increased from 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 13.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and G_{D3} concentration decreased from 8.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ during lactation. Although G_{D3} was predominant in colostrum, human milk after 16 days postpartum contained G_{M3} as the major ganglioside. The total amount of gangliosides was kept constant at approximately 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the early period of lactation (3-30 days postpartum), but gradually increased after 31 days postpartum and reached 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 241-482 days postpartum.

Moreover, fatty acid compositions of G_{M3} and G_{D3} were analyzed by gas chromatography after release of fatty acids from ganglioside. In both gangliosides, the major fatty acids were long chain saturated fatty acids such as palmitic acid (C16 : 0), stearic acid (C18 : 0), arachidic acid (C20 : 0), behenic acid (C22 : 0) and lignoceric acid (C24 : 0), and long chain unsaturated fatty acids such as eicosadienoic acid (C20 : 2) and selacholeic acid (C24 : 1). However, G_{M3} and G_{D3} contained unknown fatty acids of 46.43% and 32.57%, respectively.

Milk gangliosides are considered to be responsible for the protection of infants from enterotoxin-induced diarrhea. The physiological role of G_{M3} and G_{D3} in infants might be revealed by evaluating the selective changes in ganglioside concentration during lactation and their fatty acid compositions.
