

最近の日本人乳組成に関する全国調査 (第四報) ——純蛋白質, カゼイン, 乳清蛋白質, 非蛋白態窒素含量 およびその含有比について——

*1雪印乳業株式会社 技術研究所
*2雪印乳業株式会社 分析センター

井戸田 正*1・桜井 稔夫*1・菅原 牧裕*1・高橋 伸彰*1
石山由美子*1・村上 雄二*1・中埜 拓*1
矢野 正幸*2・浅居 良輝*2・中島 一郎*1

Key Words : 日本人の乳, 純蛋白質含量, カゼイン, 乳清蛋白質, 非蛋白態窒素

要 旨

最近の日本人乳の純蛋白質, カゼイン, 乳清蛋白質, 非蛋白態窒素含量およびその含有比を泌乳期別, 季節別に測定した。全国46地区の授乳婦2,434名より入手した人乳2,727検体のうち, 母子の健康, 乳児の発育など種々設定した属性に合致した2,279検体を対象とした。塩酸で pH4.6に調整して得たカゼイン画分には α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリンが混入していた。そこで, この混入蛋白質を別途測定しカゼイン, 乳清蛋白質, 非蛋白態窒素含量を補正した。分娩後16日以降の各成分の含有比は約26:53:21であった。分娩後15日までの初乳, 移行乳では, 酸添加によるカゼインのカード形成が不十分なため SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動法により測定した。分娩後3~5日の初乳ではカゼインは17.0%と低く, 乳清蛋白質は63.4%と高値を示した。また, わが国の最近の人乳中粗蛋白質含量の増加は, 乳清蛋白質の増加によるものと考えられた。

はじめに

乳児にとって最適の栄養食品である母乳を科学的に分析し, 人乳組成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 (以下, 調製粉乳と略す) を研究するうえでも基本となる。

乳汁に含まれる窒素成分は, 蛋白質であるカゼ

インおよび乳清蛋白質のほか非蛋白態窒素化合物の3つの成分に大きく分けられる。人乳は, 非蛋白態窒素化合物が窒素成分のうち約13~40%と多く^{1)~3)}, さらには, カゼインが少なく乳清蛋白質が多い点で牛乳とは大きく異なっている⁴⁾。

これら乳汁の窒素成分は, 消化, 吸収など栄養学的意義のほか, 感染防御, 生体調節作用など生理的機能についても明らかにされつつある⁵⁾⁶⁾。

たとえば, 人乳蛋白質は, 乳児にとって牛乳蛋白質に比べ栄養価が高いが, これは人乳では牛乳に比べ乳清蛋白質が多く含まれるためであり⁷⁾,

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
井戸田 正

そのため、現在のわが国の調製粉乳では、乳清蛋白質を増量し、カゼインを減量することで人乳組成に近づけられている。

しかし、その目標である人乳のカゼインと乳清蛋白質の含有比については、測定法の問題から、各々20~45%、30~60%と種々の値が報告されており未だ確定していない^{9)~10)}。

一方で、最近のわが国人乳の粗蛋白質含量(総窒素含量に係数6.38を掛けて求めた値であり、純蛋白質含量ではない)は、食生活、食習慣の変化に伴い増加しているが、この粗蛋白質含量の増加が、どの窒素成分の変化に起因しているかについては不明である。

こうした背景を踏まえ、著者らは調製粉乳の基準としての最近のわが国人乳のカゼイン、乳清蛋白質、非蛋白態窒素含量および純蛋白質含量を明らかにする目的で、全国各地より得た人乳2,279検体を対象として泌乳期、季節別に分析を行ったので報告する。

対象・方法

対象：全国各地に在住する年齢17歳~41歳までの授乳婦2,434名より、2,727検体の人乳を得、このうち母子の健康、児の発育、搾乳時刻、搾乳方法など種々設定した属性に合致した2,279検体を対象とした。試料は、これら検体を泌乳期別および季節別にそれぞれ混合し作成した¹¹⁾。

分析方法：

1) 非蛋白態窒素：試料5mlに24%トリクロロ酢酸を等量加えて攪拌し、5分間静置した。濾過(東洋濾紙No5C)した上清の窒素含量をマイクロケルダール法にて測定した。

2) 純蛋白質：総窒素から非蛋白態窒素を差し引き係数6.38を掛けて求めた。

3) カゼイン：試料5mlを4°C下、2,000×g、10分間遠心分離し脱脂乳を得た。脱脂乳に、1N HClを加えpH4.6に調整し、60分間静置後、35,000×gで20分間遠心分離した。上清を分離後、沈澱にホウ酸緩衝液(pH8.5)4mlを加え完全に溶解した。再度、この操作を繰り返した後、10mlに定容し、マイクロケルダール法にて窒素を測定し、

この値を粗カゼイン窒素とした。

真のカゼイン窒素は、粗カゼイン窒素から粗カゼイン画分に混入しているラクトフェリンの窒素(アミノ酸シーケンスおよび糖含量¹²⁾¹³⁾から算出した窒素含有率0.1672を掛け算出した)および α -ラクトアルブミンの窒素(アミノ酸シーケンス¹⁴⁾から算出した窒素含有率0.1602を掛け算出した)を差し引いて求めた。

4) 乳清蛋白質：3)項の遠心分離にて得た上清を100mlに定容後、マイクロケルダール法にて窒素を測定し、この値を粗乳清窒素とした。粗乳清蛋白質窒素は、この粗乳清窒素から非蛋白態窒素を差し引いて求めた。また、真の乳清蛋白質窒素は粗乳清蛋白質窒素に粗カゼインに混入していた α -ラクトアルブミンの窒素およびラクトフェリンの窒素を加算して求めた。

5) α -ラクトアルブミン：粗カゼインに混入する α -ラクトアルブミン含量は、全乳および粗乳清中の α -ラクトアルブミン含量の差から求めた。定量は、試料を55%アセトニトリルにて20~50倍希釈した後、ゲル濾過カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。分析条件は、TSK-GEL G3000PWXL(ϕ 7.6mm×300mm)

(東ソー)を2本直列につなげて用い、溶媒組成0.1%TFA：アセトニトリル=45：55、溶出流量0.3ml/min、検出波長210nmとし、HP1050, LC100 SYSTEM (HEWLETT PACKARD)でデータを処理した。また、標品には市販のヒト α -ラクトアルブミン(純度96%：Sigma)を用いた。

6) ラクトフェリン：粗カゼインに混入するラクトフェリン含量は、全乳および粗乳清中のラクトフェリン含量の差から求めた。定量は、試料をゼラチン・ペロナール緩衝液(GVB²⁺)で40,000~120,000倍に希釈した後、補体結合反応を用いて定量した¹⁵⁾。すなわち、予め56°C、30分間加温し非働化した抗ヒトラクトフェリン血清(カッペル)をGVB²⁺で200倍に希釈後、-5°C下にて、希釈試料300 μ lに同量加えた。さらに、予めGVB²⁺で2CH₅₀/mlに調製したモルモット補体液(Miles)を300 μ lを加え混合した。その後、4°C、18時間静置し補体を消費させた後、15分間室温に

表1 粗蛋白質、非蛋白態窒素および純蛋白質含量の泌乳期変化

泌乳期 日	粗蛋白質 ^{*1}	非蛋白態窒素		粗蛋白質 ^{*2}
	g/100ml	mg/100ml ^{*3}	% ^{*4}	g/100ml
3~5	2.12	65.05	19.57	1.71
6~10	1.94	64.27	21.19	1.53
11~15	1.66	58.00	22.36	1.28
16~30	1.50	52.51	22.41	1.16
31~60	1.35	46.24	21.94	1.05
61~120	1.18	40.75	22.13	0.92
121~210	1.11	36.84	21.17	0.88
211~482	1.12	34.48	19.65	0.90

^{*1} 前報¹⁾の値を用いた。

^{*2} (総窒素-非蛋白態窒素)×6.38

^{*3} 窒素として示した。

^{*4} 総窒素に対する非蛋白態窒素の含有比

放置し、1.7%感作ヒツジ赤血球 (CF キット, デンカ生研) を300 μ l 加え混合し、37°C, 90分間保持し溶血反応を行った。反応液を750 \times g, 10分間遠心分離して得た上清の吸光度を蒸留水をブランクとし、HITACHI 220A Spectrophotometer (日立製作所) を用いて540nmで測定した。

なお、標品には市販のヒトラクトフェリン (Jackson Immunoresearch Laboratories) を用い、また、ゼラチン・ペロナル緩衝液 (GVB²⁺) は5倍濃度ペロナル緩衝液40mlに2%ゼラチン50ml, 0.03M CaCl₂·2H₂O#1.0ml, 0.1M MgCl₂·2H₂O#1.0ml, Tween 80 (関東化学) 0.10gを加え、蒸留水にて200mlに調製して用いた。

7) SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動: Laemmli の方法¹⁰⁾に準じて行った。ゲルは、アクリルアミド8~16%の濃度勾配を有するSDS-PAGE mini 8-16% (テフコ) を用いた。50 μ l の試料に200 μ l のサンプルバッファー (0.0625M トリス-塩酸 (pH6.8), 2%SDS, 10%グリセロール, 5%2-メルカプトエタノール, 0.001%BPB) を加え、沸騰水中で5分間加熱後、

10 μ l をゲルにアプライした。泳動は、0.1%SDSを含むトリス-グリシン緩衝液 (0.025M トリス, 0.192M グリシン, pH8.4) を用いて行った。その後、0.25%クマシブリリアントブルーを含む酢酸:エタノール:水=2:9:9にて染色し、メタノール:酢酸:水=2:3:35にて脱色後、クロマトスキャナー (島津製作所, Shimadzu TLC Scanner CS-930型) を用い波長595nmの吸収にて蛋白質成分の構成比を求めた。

結 果

1. 非蛋白態窒素および純蛋白質含量の泌乳期変化

各泌乳期の試料100ml当たりの非蛋白態窒素含量、純蛋白質含量および総窒素に対する非蛋白態窒素の含有比を夏季および冬季の平均値で表1に示した。

非蛋白態窒素含量は、分娩後3~5日で65.05mg/100mlと最高値を示した後、泌乳期が進むとともに減少し、分娩後211~482日の34.48mg/100mlまで減少した。

一方、総窒素に対する非蛋白態窒素の含有比は、全泌乳期を通じ19.57~22.41%にあり、ほぼ一定値を示した。

データは示さないが、分娩後30日までの冬季乳で非蛋白態窒素含量が、高値傾向を、分娩後15日までの冬季乳で総窒素に対する非蛋白態窒素の含有比が、高値傾向を示した。

純蛋白質含量は、粗蛋白質含量の泌乳期変化と同様、分娩後3~5日で最高値1.71g/100mlを示した後、泌乳期が進むとともに減少し、分娩後121~210日で最低値0.88g/100mlを示した。

2. カゼイン、乳清蛋白質の泌乳期変化

1) 粗カゼイン、粗乳清蛋白質含量および窒素含有比

分娩後15日までの初乳および移行乳は、塩酸を加えpH4.6に調整してもカードの形成が弱く、遠心分離によってもカゼインの沈澱を明確に分離できなかった。そこで、分娩後16日以降の試料を対象に、粗カゼインおよび粗乳清蛋白質含量を測定した。

表2 粗カゼイン,粗乳清蛋白質の窒素含量,含有比および粗カゼインに混入したラクトフェリン, α -ラクトアルブミンの窒素含量の泌乳期変化

泌乳期	粗カゼイン		ラクトフェリン ^{*1}	α -ラクトアルブミン ^{*2}	粗乳清蛋白質	
	g/100ml	% ^{*3}	mg/100ml	mg/100ml	mg/100ml	% ^{*3}
16~30	94.83	40.46	3.10	35.33	86.99	37.14
31~60	86.99	41.26	2.76	32.04	77.59	36.81
61~120	76.81	41.71	2.26	25.07	66.62	36.17
121~210	72.10	41.71	2.09	23.71	65.05	37.36
211~482	71.32	40.63	3.18	22.11	69.75	39.73

*1 粗カゼイン沈澱画分に混入するラクトフェリンの窒素量 (ラクトフェリン×0.1672²¹⁾²¹⁾)

*2 粗カゼイン沈澱画分に混入する α -ラクトアルブミンの窒素量 (α -ラクトアルブミン×0.1602²⁴⁾)

*3 総窒素に対する含有比

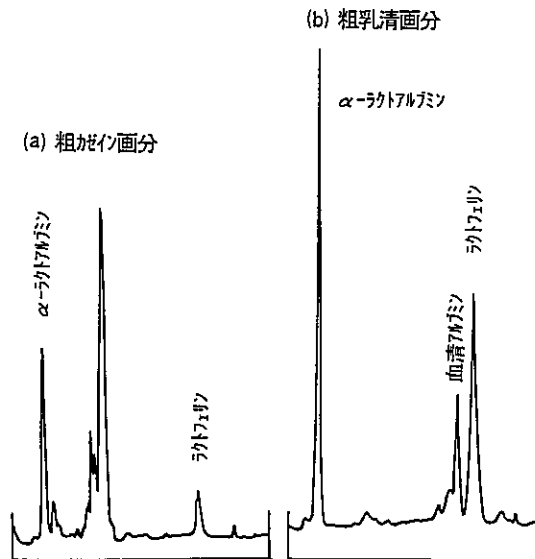


図1 粗カゼインおよび粗乳清画分の電気泳動図
分画は1N HClにてpH4.6に調整後,遠心分離して行い,電気泳動はSDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い行った。

夏季および冬季試料の結果を平均値で表2に示した。

粗カゼインの窒素含量は,分娩後16~30日で94.83mg/100mlを示した後,分娩後211~482日の

71.32mg/100mlまで減少した。また,夏季乳に比べ冬季乳で高値傾向を示した。一方,粗乳清蛋白質の窒素含量は,分娩後16~30日で86.99mg/100mlを示した後,分娩後121~210日の65.05mg/100mlまで減少し,その後,分娩後211~482日で69.76mg/100mlと増加した。しかし,季節間には一定の関係を認めなかった。総窒素に対する粗カゼイン,粗乳清蛋白質および非蛋白態窒素の含有比は,各泌乳期ともにほぼ一定値を示し,約41:37:22であった。

2) 粗カゼイン画分に混入する α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリン含量

試料をpH4.6に調整して得た粗カゼインおよび粗乳清画分のSDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動図を図1に示した。

粗カゼイン画分には α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリンのピークが明瞭に存在していた。

粗カゼイン画分に混入しているラクトフェリンは分娩後16~30日の18.5mg/100ml(窒素として3.10mg/100ml)から分娩後121~210日の12.5mg/100ml(窒素として2.09mg/100ml)まで減少後,分

表3 カゼイン、乳清蛋白質、非蛋白態窒素含量およびその含有比の泌乳期変化

泌乳期 (日)	成分	カゼイン		乳清蛋白質		非蛋白態窒素	
	単位	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季
16~30	含有比 (%)	25.1	23.1	52.3	54.7	22.6	22.2
	含量 (g/100ml)	0.384	0.337	0.800	0.799	0.346	0.324
31~60	含有比 (%)	24.4	25.1	53.0	53.6	22.6	21.3
	含量 (g/100ml)	0.332	0.334	0.721	0.713	0.307	0.283
61~120	含有比 (%)	25.4	28.3	52.6	49.5	22.0	22.2
	含量 (g/100ml)	0.297	0.334	0.615	0.584	0.257	0.262
121~240	含有比 (%)	24.5	28.8	54.3	50.2	21.2	21.0
	含量 (g/100ml)	0.267	0.325	0.592	0.567	0.231	0.237
241~482	含有比 (%)	25.6	26.8	54.6	53.7	19.8	19.5
	含量 (g/100ml)	0.289	0.297	0.617	0.596	0.224	0.216

含量は、窒素×6.38にて示した。

表4 SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動によるカゼイン測定値のばらつき

泌乳期	季節	n	平均 (%)	標準偏差	変動係数
6~10日	夏季	5	35.54	1.494	4.20
	冬季	5	34.06	2.381	6.99
61~120日	夏季	5	32.38	6.162	19.08
	冬季	5	34.74	4.390	12.64

カゼイン含量(%)は、クロマトスキャナーによる分画比から求めた。

娩後211~482日で19.0mg/100ml(窒素として3.18mg/100ml)と増加した(表2)。

また、粗カゼイン画分に混入している α -ラクトアルブミンは、分娩後16~30日の220.5mg/100ml(窒素として35.33mg/100ml)から、分娩後211~482日の138.0mg/100ml(窒素として22.11mg/100ml)まで泌乳期とともに減少した。

3) カゼイン、乳清蛋白質の窒素含有比

粗カゼイン画分に混入した α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリンを補正して求めたカゼイ

ン、乳清蛋白質、非蛋白態窒素の含量およびその含有比を泌乳期別、季節別に表3に示した。

冬季乳のカゼインの含有比は泌乳期が進むとともにやや増加する傾向を示したが、カゼインおよび乳清蛋白質、非蛋白態窒素の含有比は、各泌乳期を通じてほぼ一定の約26:53:21を示した。

また、分娩後31~60日以降、カゼインが冬季で、乳清蛋白質が夏季で高値を示した。

3. SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動により求めたカゼイン、乳清蛋白質の含有比

分娩後15日までの初乳および移行乳は、塩酸を加えてpH4.6に調整してもカゼインのカード形成が弱く測定できないため、SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動により測定した。

夏季および冬季の分娩後6~10日の移行乳および分娩後61日~120日の成乳を対象として繰り返し5回測定した測定値のバラツキを表4に示した。移行乳の変動係数は、約4~7%と成乳の1/2~1/3であった。

表5 SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動による人乳中カゼイン・乳清蛋白質・非蛋白態窒素の泌乳期変化 (%)

泌乳期 (日)	カゼイン	乳清蛋白質	非蛋白態窒素
3~5	17.0	63.4	19.6
6~10	27.5	51.3	21.2
11~15	24.2	53.4	22.4
16~30	26.3	51.3	22.4
31~60	26.6	51.5	21.9
61~120	26.2	51.7	22.1
121~210	27.2	51.6	21.2
211~482	25.7	54.6	19.7

カゼインおよび乳清蛋白質(%)は、総窒素から非蛋白態窒素を差し引いた後、クロマトスキャナーによる分画比を掛けて求めた。

本法によって求めたカゼイン、乳清蛋白質および非蛋白態窒素の含有比を表5に示した。

全泌乳期を通じカゼイン、乳清蛋白質の泌乳期変化を見ると、分娩後3~5日の初乳においては、カゼインは17.0%と低値を、乳清蛋白質は、63.4%と高値を示したが、分娩後6~10日以降ほぼ一定値を維持した。

また、分娩後16日以降の各泌乳期の試料を対象として本法により求めたカゼインおよび乳清蛋白質の含有比は、塩酸によりpH4.6に調整して得た値と良く一致した。

考 察

蛋白質は、乳児の体を形づくる筋肉、骨格、皮膚、毛髪や生命現象の重要な担い手である酵素、抗体、ホルモンの構成成分であるため、成長の極めて盛んな乳児期には、質、量ともに適切な蛋白質の摂取が必要である。

この点でも、母乳は、乳児にとっての理想的な栄養源であると考えられており、乳児の蛋白質必要量も、必須アミノ酸必要量および必須脂肪酸必要量と同様に、母乳に含まれる粗蛋白質含量(人乳中総窒素に係数6.25または6.38を掛けたもので

あり純蛋白質ではない)を基礎として設定されている¹⁷⁾。

しかしながら、人乳には、純蛋白質であるカゼインおよび乳清蛋白質のほか、非蛋白態窒素化合物が窒素として約13~40%と多量に含まれている¹⁷⁾ことから、上述のように、粗蛋白質含量を純蛋白質として代用することは、人乳の純蛋白質含量を過剰に評価することになると指摘されている。また、母乳栄養児の糞便中には、IgA、ラクトフェリンが残存していることも報告されており¹⁸⁾¹⁹⁾、Hambraeusら⁶⁾²⁰⁾、Räihä²¹⁾は乳児の蛋白質必要量を、また、Harzerら²²⁾は、蛋白質必要量のほかアミノ酸必要量についても再検討すべきと指摘している。

人乳中の純蛋白質含量は、ケルダール法によって求めた総窒素から非蛋白態窒素を差し引き係数6.25または6.38を掛けて求めたり⁸⁾、アミノ酸分析²³⁾、Lowry法、BioRad法、BCA法のような比色²⁴⁾などにより求められているが、これらの値は、互いに異なることが指摘されている²⁴⁾。

このうち、総窒素から非蛋白態窒素を差し引き求める方法は、アミノ酸分析から求めた値とも良く一致し、さらには、測定も簡便である²³⁾。そこで、著者らもこの方法で、純蛋白質含量および非蛋白態窒素含量を測定した。

人乳の非蛋白態窒素および純蛋白質含量については、すでに、1949年Macyにより報告されている²⁵⁾。それによれば、泌乳6~10日の移行乳での非蛋白態窒素含量、純蛋白質含量および総窒素に対する非蛋白態窒素の含有比は、47.9mg/100ml, 1.28g/100ml, 19%と、泌乳15日~15カ月の成乳では、32.4mg/100ml, 0.85g/100ml, 20%と報告されている。

また、わが国においても、1960年中頃には斎藤ら⁸⁾、長沢ら²⁶⁾によって報告されている。斎藤らは、分娩後30~75日の成乳で48.5mg/100ml, 0.88g/100ml, 26.1%、分娩後76~120日の成乳で42.1mg/100ml, 0.85g/100ml, 24.1%、分娩後121日~1年の成乳で42.1mg/100ml, 0.78g/100ml, 25.7%と報告し、長沢らもほぼ同様の結果を報告している。

このうち斎藤らの報告は、全国調査値であるこ

とから、著者らの結果と比較した。著者らの結果は、非蛋白態窒素含量では、各泌乳期ともに斎藤らの結果とほぼ同じ値を示したが、純蛋白質含量は、斎藤らの値に比べ9~20%高値を示した。

一方で、最近、わが国では成熟児の人乳を対象としたこれら成分に関する研究は行われておらず、未熟児を分娩した母親の人乳を対象とした報告²⁷⁾²⁸⁾を見るのみである。そのため、著者らの結果を最近の人乳値と比較検討することはできない。

すでに、著者らは、最近のわが国人乳の粗蛋白質含量(総窒素)が、わが国の社会経済状態の向上による食生活の変化、すなわち、外食、加工食品の利用などにより、過去30年の間に約14%増加していることを報告している¹⁾。

母親の社会経済状態、栄養状態による人乳中窒素成分への影響は、高蛋白質食によって粗蛋白質、純蛋白質および非蛋白態窒素が増加するという報告²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾と、変化しないとする報告³²⁾があり一定していない。また、最近、Donovanらは、食事の摂取によって、人乳中粗蛋白質含量は変化しないが、非蛋白態窒素含量は増加することを報告している³³⁾。しかし、著者らの結果では、わが国の人乳は過去30年の間に粗蛋白質(総窒素)含量とともに、純蛋白質含量も増加していることから、人乳の窒素成分は母親の社会経済状態、栄養状態により影響されるものと考えられた。

カゼインは、乳汁を酸でpH4.6に調整したときに沈澱する蛋白質であり、乳清蛋白質はその上清中に溶解している種々の蛋白質の総称である。

しかし、人乳、特に初乳の場合、牛乳とは異なり酸添加によってカゼインの沈澱は生じにくい。そのため、人乳カゼインの定量に際してはカゼインのカード形成を容易にするために、人乳を透析または希釈した後pHを調整したり、pHを調整した後に遠心分離したりする方法が検討されている³⁴⁾。このような操作を行ってもカゼインの沈澱画分には乳清蛋白質である α -ラクトアルブミン、ラクトフェリンなどが共沈する³⁵⁾ため、さらには、電気泳動法³⁶⁾³⁷⁾を用いたり、純蛋白質から乳清蛋白質である α -ラクトアルブミン、免疫グロブリン、ラクトフェリン、リゾチーム、血清アルブミ

ンを差し引いて間接的に求めたり³⁸⁾、カゼインおよび乳清蛋白質のアミノ酸組成から推定すること²²⁾も行われている。

Lönnerdal & Forsum⁹⁾は、pH4.6 酸沈殿法、超遠心分離法(105,000×g, 30分, 20°C)および純蛋白質から乳清蛋白質を差し引きカゼインを推定する間接法を用いて、カゼインおよび乳清蛋白質含量を比較している。その結果、粗蛋白質に対するカゼインの含有比は、酸沈殿法では24.3%、超遠心分離法では19.6%、また、間接法では23%であり、方法により異なることを報告している。そのため、人乳のカゼインおよび乳清蛋白質含量を比較検討する場合には、その測定法に留意すべきことが指摘されている⁵⁾。

また、最近、Kunzら³⁹⁾は、60mmol/lのCa²⁺イオンの存在下で、pH4.3に調整後、1時間4°Cで189,000×gの超遠心分離を行うことにより、カゼイン画分への乳清蛋白質の混入を著しく減らすことが出来ると報告している。

著者らも、この方法を試みたが、カゼイン画分には α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリンの混入が認められた。そのため、著者らは、成乳に関しては、塩酸でpH4.6に調整して得た粗カゼインから、粗カゼインに混入する α -ラクトアルブミンおよびラクトフェリンを別途測定し補正することで、カゼインおよび乳清蛋白質含量を求めた。また、初乳に関しては、SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動法を用い測定した。

わが国人乳の純蛋白質含量の増加が、どの蛋白質成分の変化に基づくものかを検討するため、著者らの結果を、斎藤らの全国調査値⁸⁾と比較した。

斎藤らの値は、その測定法によれば、粗カゼインおよび粗乳清蛋白質含量である。その粗カゼインおよび粗乳清蛋白質含量(100g当たりで報告しており、比重を用い換算した)は、分娩後30~75日で各々0.53g/100ml, 0.35g/100ml, 分娩後76~120日で0.50g/100ml, 0.36g/100ml, 分娩後121日~1年で0.45g/100ml, 0.33g/100mlと報告しており、粗カゼイン含量は、著者らの結果とほぼ同値を示した。しかし、粗乳清蛋白質含量は、著者らの結果で高値を示した。

このことから、最近のわが国人乳の粗蛋白質含量の増加は、純蛋白質のうちの乳清蛋白質含量が増加したことによるものと考えられるが、最近、Ronayne de Ferrer & Sambucetti⁴⁰⁾も、蛋白質摂取量の少ない母親の人乳では、カゼインに対する乳清蛋白質の含有比が小さくなることを報告している。

このようなわが国での人乳中乳清蛋白質含量の増加は、人乳の総アミノ酸組成の時代による変化からも推測された。すなわち、人乳のカゼインおよび乳清蛋白質のアミノ酸組成の特徴は、カゼインではプロリンおよびメチオニンが多く、乳清蛋白質ではシスチンおよびグリシンが多いことにある⁷⁾。著者らが、同じ試料に対して測定した総アミノ酸組成の結果を、30年前に行われた斎藤らの値と比較すると、プロリンおよびメチオニンは減少しているが、シスチンおよびグリシンは増加しており⁴¹⁾、この結果は、乳清蛋白質の増加現象と良く一致した。

わが国における、このような人乳中乳清蛋白質含量の増加が、乳清蛋白質のうちのどの蛋白質の変化に起因しているのか、また、その変化が乳児にとってどのような意義を持っているかについては、今後さらに検討すべき課題と考える。

結 論

母乳は乳児にとって理想的な栄養源であるが、母乳の蛋白質も乳児にとって、質、量ともに最適なものである。

そのため、わが国の最近の調製粉乳は、その窒素成分に関しても、人乳組成に近づけるべく乳清蛋白質および非蛋白態窒素の増量とカゼインの減量が行われてきている。

しかし、わが国人乳の窒素成分の組成に関する報告は少なく、全国規模での調査は、ここ30年間行われていない。

一方で、この30年の間にわが国人乳の粗蛋白質(総窒素)含量は増加しており、当然のことながら人乳の蛋白質組成も変化していると考えられる。そのため、最近の人乳の蛋白質組成を求めため検討した。

初乳および成乳のカゼイン、乳清蛋白質、非蛋白態窒素の含有比は17:63:20および26:53:21であり、初乳ではカゼインの含有比が低く、乳清蛋白質の含有比が高かった。

また、30年の間の粗蛋白質(総窒素)含量の増加は、乳清蛋白質の増加に基づくものと考えられた。

この最近のわが国人乳の乳清蛋白質含量の増加の意義は、今後さらに検討すべき課題と考える。

稿を終えるに当たり、母乳の提供に種々ご援助、ご協力頂きました全国各地の病産院の先生、看護婦、栄養士の皆様およびお母様方に感謝致します。

また、本論文の要旨は平成3年11月、第18回日本小児栄養消化器病学会にて発表した。

文 献

- 1) Harzer G, Haschke F: Nonprotein nitrogen (NPN). In: Renner E, editor, *Micronutrients in milk and milk-based food products*. London: Elsevier Science Publishers, 1989: 154-166.
- 2) Gross SJ: Effect of gestational age on the composition of breast milk. In: Grand RJ, Sutphen JL, Dietz WH, editors, *Pediatric nutrition Theory and practice*. Boston: Butterworth, 1987: 265-278.
- 3) Renner E: Milk protein. In: *Milk and dairy products in human nutrition*. München: W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, 1983: 99-102.
- 4) Blanc B: Biochemical aspects of human milk. Comparison with bovine milk. *Wld Rev Nutr Diet* 1981; 36: 1-89.
- 5) Lönnerdal B: Whey proteins in human milk. In: Atkison SA, Lönnerdal B, editors, *Protein and non-protein nitrogen in human milk*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989: 29-42.
- 6) Hambraeus L: Part I Human milk: Nutritional aspects. In: Brunser O, Carrazza FR, Gracey M, Nichols BL, Senterre J, editors, *Clinical nutrition of the young child*. New York: Raven Press, 1991: 290-301.
- 7) 西川 勲, 村田信子, 割石正信, 出家栄記, 川西悟生, 古市栄一: 牛乳と人乳のたん白質栄養評価およびシスチン, 牛乳乳清たん白質の牛乳たん白質への補足効果について. *栄養と食糧* 1975; 28: 9-16.
- 8) 斎藤健輔, 古市栄一, 近藤 敏, 川西悟生, 西川 勲, 中里鴻志, 野口洋介, 土肥 達, 野口絢子, 新郷珠美子: 日本人の人乳に関する研究. *雪印乳業技術研究所報告* 1965; 69: 51-75.
- 9) Lönnerdal B, Forsum E: Casein content of human milk. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 113-120.
- 10) Woodhouse LR, Lönnerdal B: Quantitation of the

- major whey proteins in human milk, and development of a technique to isolate minor whey proteins. *Nutr Res* 1988 ; 8 : 853-864.
- 11) 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, 阪本隆男, 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)一般組成およびミネラル成分について, *日児栄消誌* 1991 ; 5 : 145-158.
 - 12) Rey MW, Woloshuk SL, deBoer HA, Pieper FR : Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin, *Nucleic Acids Research* 1990 ; 18 : 5288.
 - 13) Bezkorovainy A : Human milk and colostrum proteins, A review. *J Dairy Sci* 1977 ; 60 : 1023-1037.
 - 14) Findlay JBC, Brew K : The complete amino-acid sequence of human α -lactalbumin, *Eur J Biochem* 1972 ; 27 : 65-86.
 - 15) 中村 弘, 杉浦 勉: 補体結合反応, 日本生化学会編. 免疫生化学研究法. 東京: 東京化学同人, 1986 : 50-57.
 - 16) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4. *Nature* 1970 ; 227 : 680-684.
 - 17) 井上五郎訳, 必須アミノ酸研究委員会編. エネルギー・蛋白質の必要量 FAO/WHO/UNU 合同特別専門委員会報告. 東京: 医歯薬出版, 1989.
 - 18) Davidson LA, Donovan SM, Lönnnerdal B, Atkinson SA : Excretion of human milk proteins by term and preterm infants. In : Atkinson SA, Lönnnerdal B, editors. Protein and non-protein nitrogen in human milk. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1989 : 161-172.
 - 19) 新飯田裕一, 高柳直己, 寺嶋秀幸, 堀野清孝: ELISAによる母乳および新生児糞便中ラクトフェリンの測定と意義. *日児誌* 1988 ; 92 : 1496-1501.
 - 20) Hambraeus L, Fransson G-B, Lönnnerdal B : Nutritional availability of breast milk protein, *Lancet* 1984 ; 2 : 167-168.
 - 21) Råihä NCR : Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants, *Pediatrics* 1985 ; 75 : (suppl) 136-141.
 - 22) Harzer G, Haug M, Bindels JG : Biochemistry of human milk in early lactation, *Z Ernährungswiss* 1986 ; 25 : 77-90.
 - 23) Lönnnerdal B, Forsum E, Hambraeus L : The protein content of human milk. I. A transversal study of Swedish normal material, *Nutr Rep Int* 1976 ; 13 : 125-134.
 - 24) Donovan SM, Lönnnerdal B : Development of a human milk protein standards, *Acta Paediatr Scand* 1989 ; 78 : 171-179.
 - 25) Macy IG : Composition of human colostrum and milk, *Am J Dis Child* 1949 ; 78 : 589-603.
 - 26) 長沢太郎, 岡木信造, 清沢 功, 寺本容子: 人乳ならびに牛乳の結合糖質に関する研究. 栄養と食糧 1964 ; 17 : 217-222.
 - 27) 守田哲朗, 小林嘉一郎, 河野幸治, 萩原温久: 低出生体重児を産んだ母親からの母乳のタンパク質およびアミノ酸組成. 必須アミノ酸研究 1988 ; 46-48.
 - 28) 川口 茂, 林 智晴, 縄田 淳, 木田雅尋, 竹内敏雄, 真砂野仁, 梅田 陽, 奥山和男: 早産児を出産した母親の乳汁蛋白質に関する研究. *新生児誌* 1989 ; 25 : 784-789.
 - 29) 内藤宗生: 最近の母乳組成. *日児誌* 1980 ; 84 : 1464-1477.
 - 30) Prentice AM, Roberts SB, Prentice A, Paul AA, Watkin son M, Watkinson AA, Whitehead RG : Dietary supplementation of lactating gambiaian women. I. Effect on breast-milk volume and quality, *Hum Nutr : Clin Nutr* 1983 ; 37C : 53-64.
 - 31) Forsum E, Lönnnerdal B : Effect of protein intake on protein and nitrogen composition of breast milk, *Am J Clin Nutr* 1980 ; 33 : 1809-1813.
 - 32) Sanchez-Pozo A, Morales JL, Izquierdo A, Martinez-Valverde A, Gil A : Protein composition of human milk in relation to mother's weight and socioeconomic status, *Hum Nutr : Clin Nutr* 1986 ; 41C : 115-125.
 - 33) Donovan SM, Ereman RR, Dewey KG, Lönnnerdal B : Postprandial changes in the content and composition of nonprotein nitrogen in human milk, *Am J Clin Nutr* 1991 ; 54 : 1017-1023.
 - 34) Toyoda M, Yamauchi K : Comparison of different methods for preparation of human milk casein, *Agr Biol Chem* 1973 ; 37 : 2197-2199.
 - 35) Nagasawa T, Kiyosawa I, Takase M : Lactoferrin and serum albumin of human casein in colostrum and milk, *J Dairy Sci* 1974 ; 57 : 1159-1163.
 - 36) Kunz C, Lönnnerdal B : Human-milk proteins : analysis of casin subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods, *Am J Clin Nutr* 1990 ; 51 : 37-46.
 - 37) Sanchez-Pozo A, Lopez J, Pita ML, Izquierdo A, Guerrero E, Sanchez-Medina F, Martinez Valverde A, Gil A : Changes in the protein fractions of human milk during lactation, *Ann Nutr Metab* 1986 ; 30 : 15-20.
 - 38) Hambraeus L, Lönnnerdal B, Forsum E, Gebre-Medhin M : Nitrogen and protein components of human milk, *Acta Paediatr Scand* 1978 ; 67 : 561-565.
 - 39) Kunz C, Lönnnerdal B : Human milk proteins : separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography, *Am J Clin Nutr* 1989 ; 49 : 464-470.
 - 40) Ronayne de Ferrer PA, Sambucetti ME : Casein to

wey protein ratio in rat and human milks : Effects of maternal protein intake. J Dairy Sci 1993 ; 76 : 1645-1653.

41) 井戸田正 : 最近の日本人乳組成に関する研究. 橋本武夫編. 新生児と母乳. 大阪 : メディカ出版, 1992 : 62-66.

The latest survey for the composition of human milk obtained from Japanese mothers.
Part IV. The contents of true protein, casein, wey protein and non-protein nitrogen.

Technical Research Institute, *Food Research Laboratory, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

Tadashi IDOTA, Toshio SAKURAI, Makihiro SUGAWARA, Nobuaki TAKAHASHI, Yumiko ISHIYAMA, Yuzi MURAKAMI, Taku NAKANO, Masayuki YANO*, Yoshiteru ASAI*, Ichiro NAKAJIMA

The latest survey for the contents of true protein, casein, wey protein, and non-protein nitrogen in Japanese mother's milk was performed. In the winter and summer of 1989, milk specimens were randomly collected from 2,434 mothers at different periods of lactation (3-482 days postpartum) living at various districts in Japan. Out of them, 2,279 milk specimens were used for analysis. The influences of lactational stage and seasonal changes upon true protein, casein, wey protein, and non-protein nitrogen contents in composite specimens were investigated. Casein separated from skimmed milks by adjusting pH to 4.6 with hydrochloric acid contained α -lactalbumin and lactoferrin, of which quantities were determined by HPLC and complement fixation test, respectively. The contamination was taken into account when the contents of casein, wey protein, and non-protein nitrogen were determined. Casein : wey protein : non-protein nitrogen ratio was approximately 26 : 53 : 21 at 16-482 days postpartum. The method of pH-adjustment failed to separate casein from milks obtained from the mothers at 3-15 days postpartum. The contents of casein and wey protein in these samples were determined by SDS-polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Casein : wey protein : non-protein nitrogen ratio was approximately 17 : 63 : 20 at 3-5 days postpartum. In early stages of lactation, the ratio of casein was low. The content of true protein was significantly higher than that in the previous results reported by Saito et al (1965) . The difference in true protein content seems to be due to the increase in wey protein.