

人乳の結合性シアル酸含量について

誌名	玉川大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University
ISSN	0082156X
著者	石川, 紀子 本間, 理恵 松山, 惇
巻/号	27号
掲載ページ	p. 15-21
発行年月	1987年12月

人乳の結合性シアル酸含量について

石川紀子・本間理恵・松山 惇・清澤 功・長澤太郎

Contents of Sialic Acid Bound to the Protein, Lipid
and Carbohydrate in Human Milk

Noriko Ishikawa, Michie Honma, Jun Matshuyama
Isao Kiyosaya and Taro Nagasawa

緒 言

シアル酸 (sialic acid) は、ノイラミン酸の N-アシル誘導体の総称であり、生体の組織、体液、分泌液などに広く分布しているが、遊離の状態ではほとんど存在しない。その大部分は、ムコ多糖、ムコタンパク質、ムコ脂質などの構成成分として存在することが知られている (清澤 1978, 木幡 1986, 奥山 1968)。

乳汁中に含まれるシアル酸はすべて N-アセチルノイラミン酸として存在する (奥山 1968) が、人乳には、牛乳よりかなり豊富に含まれている。

たとえば、長澤ら (1964) の報告によると、人乳と牛乳のシアル酸含量は、乳汁 100 ml 当たり、初乳では、それぞれ 157.06 mg と 37.26 mg、常乳では 50.36 mg と 29.77 mg であり、人乳は牛乳の 2～3 倍のシアル酸を含有している。これらのシアル酸は κ -カゼインなどの糖タンパク質やシアリラクトースなどのオリゴ糖として存在することが明らかである (清澤 1978, 山本 1978)。また、最近、シアル酸を構成成分とし、脳組織の糖脂質として重要なガングリオシドが人乳中に存在することが明らかにされている。

これらのシアル酸が母乳のみを栄養源としている乳児の発育に、どのような栄養生理的意義があるかを明らかにすることは、きわめて重要なことである。しかし、このような観点に立ってタンパク質、脂質および糖質と結合するシアル酸が、人乳中にどの程度存在するかを量的に示した報告はない。

このため、本研究では人乳中のシアル酸がタンパク質、脂質および糖質とどの程度結合しているかを明らかにするとともに、泌乳期との関係について若干の知見を得たので以下に報告する。

実験材料および方法

1. 試料の採取

供試人乳の内、初乳は町田市民病院、常乳は一般家庭の健康な婦人より採取した。採取後直ちに約 5°C に冷蔵し、24 時間以内に約 -20°C で凍結保存し、使用時に流水解凍した。なお、初乳、常乳それぞれ 10 試料づつをシアル酸の定量に供した。

2. 標準物質

N-アセチルノイラミン酸の市販特級品(和光純薬)を用いた。

3. 各結合性シアル酸の定量

各結合性シアル酸定量のための試験液は、次のとおり調製した。

(1) 全シアル酸試験液

試験管(16.5×10 cm)に人乳 3.0 ml を採り、0.4 N 硫酸 1.0 ml を添加、混和した。ついで、溶液は 80°C、1 時間加熱した後、冷却し、25 ml 定容とした。この溶液 5.0 ml を 0.1 N 塩酸であらかじめ活性化した Dowex 50 W-×12(H⁺) 型カラム(0.7×5 cm)に通し、定量上妨害となる陽イオン物質を除去した。溶出液は、さらに、0.1 N 酢酸であらかじめ活性化した Dowex 1-×8(Cl⁻) 型カラム(0.7×6 cm)に直接通し、シアル酸を吸着させた。カラムは蒸留水で洗浄した後、0.3 N 酢酸 10 ml でシアル酸を溶出した。溶出液は、蒸留水で 25 ml 定容とし、全シアル酸試験液とした。

(2) 全タンパク質結合性シアル酸試験液

人乳 10 ml を 0°C、4,000 r.p.m.、20 分間、遠心分離し、脱脂した。この脱脂乳に 20% トリクロロ酢酸 10 ml を加え、室温で 1 時間放置した後、20°C、17,000 r.p.m.、20 分間、遠心分離した。上澄液を除去した後、沈殿物は pH 8.0 の生理食塩水 10 ml に溶解し、その 3.0 ml について全シアル酸試験液と同様に加水分解した。この加水分解液を全タンパク質結合性シアル酸試験液とした。

(3) カゼイン結合性シアル酸試験液

人乳 20 ml を 0°C、4,000 r.p.m.、20 分間、遠心分離し、脱脂した。この脱脂乳に 1 N 塩酸を加え、pH 4.6 に調節し、冷蔵庫(約 5°C)で、一昼夜放置した。ついで室温で 1 時間放置した後、20°C、17,000 r.p.m.、20 分間、遠心分離した。上澄液を除去した後、沈殿物は pH 8.0 の生理食塩水 10 ml に溶解し、その 3.0 ml について全シアル酸試験液と同様に加水分解した。この加水分解液をカゼイン結合性シアル酸試験液とした。

(4) 脂質結合性シアル酸試験液

脂質の抽出は、次のとおり行なった。すなわち人乳 10 ml にメタノール-クロロホルム(1:2)混合溶媒 60 ml を加え、振とう混和し、5°C で 4 時間、放置した後、東洋濾紙 No. 6 で濾過した。濾液に 0.88% 塩化カリウム水溶液を、全濾液の 1/4 容加え、静置し、濾液が透明になったら、下層を分離除去した。脂質抽出液は、40°C 以下でロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固した後、0.1 N 硫酸 4.0 ml を加え全シアル酸試験液と同様に加水分解した。この加水分解液を脂質結合性シアル酸試験液とした。

これらの試験液を用いてシアル酸の定量は Warren 法(Warren 1959)により次のとおり行な

った。

各試験液 0.2ml を共栓試験管 (1.5×10cm) に採り, 0.2Mメタ過ヨウ素酸ナトリウム-9Mリン酸 0.1ml を加え, 室温で 20 分間, 酸化した. ついで 10% 亜ヒ酸ナトリウム (0.5M 硫酸ナトリウム-0.1N 硫酸中) 溶液 1.0ml を加え, 褪色するまで混和し, さらに 0.6% チオバルビツール酸 (0.5M 硫酸ナトリウム) 溶液 3.0ml を加え, 15 分間, 加熱した. 冷却後, ブタノール-塩酸 (19:1) 溶液 4.3ml を加え, 栓をして振とう混和した後, 20°C, 3,000 r.p.m., 5 分間, 遠心分離し, 上層を島津 UV190 型分光光度計を用いて 549nm で比色定量した.

なお, 乳清タンパク質結合性シアル酸含量は, 全タンパク質結合性シアル酸含量からカゼイン結合性シアル酸含量を差し引いて求めた. また, 糖質結合性シアル酸含量は, 全シアル酸含量から全タンパク質および脂質結合性シアル酸含量を差し引いた値である.

結果および考察

人乳中の全シアル酸および各結合性シアル酸含量は, Table 1 および 2 のとおりであった.

Table 1. The contents of total and bound sialic acid of whole protein, lipid and carbohydrate in human colostrum. (mg/100 ml)

Lactation (days)	Total sialic acid	Whole protein	Casein	Whey protein	Lipid	Carbo-hydrate
1 (n=1)	98.5	11.83	2.41	9.42	0.158	86.5
2 (n=1)	118.5	14.03	2.14	11.89	0.123	104.3
3 (n=1)	116.2	15.08	3.63	11.45	0.092	101.0
4 (n=5)	104.0	12.18	1.79	10.39	0.120	91.7
5 (n=2)	92.8	12.08	3.25	8.83	0.092	80.7
Average	103.9	12.60	2.36	10.24	0.116	91.2
S.D.	5.43	0.52	0.50	0.51	0.01	5.0

Table 2. The contents of total and bound sialic acid of whole protein, lipid and carbohydrate in mature milk. (mg/100 ml)

Lactation (days)	Total sialic acid	Whole protein	Casein	Whey protein	Lipid	Carbo-hydrate
40	31.9	5.21	1.85	3.36	0.236	26.5
42	30.5	5.08	2.01	3.07	0.144	25.3
60	34.6	4.51	2.27	2.24	0.206	29.9
62	35.1	4.51	1.72	2.79	0.171	30.4
70	24.2	4.41	2.78	1.63	0.276	19.5
72	22.8	4.03	2.60	1.43	0.118	18.7
80	28.7	3.40	2.26	1.14	0.210	25.1
82	20.1	3.37	2.55	0.82	0.228	16.5
90	20.9	3.66	2.27	1.39	0.354	17.9
92	22.3	3.75	2.01	1.74	0.258	18.3
Average	27.2	4.91	2.23	1.96	0.220	22.8
S.D.	1.77	0.21	0.11	0.27	0.02	1.65

人乳の全シアル酸含量の平均値は、乳汁 100ml 当たり、初乳では 103.9mg, 常乳では 27.2mg であった。これらの値は、長澤ら (1964) の結果 (100ml 当たり、初乳 157.06mg, 常乳 50.36mg) より低かったが、これは、試験液の調製や条件に若干の相違がみられるので、さらに検討を要する点である。また、各結合性シアル酸については、初乳および常乳において全タンパク質結合性シアル酸は 12.60mg および 4.91mg, 脂質結合性シアル酸は 0.116mg および 0.220mg, 糖質結合性シアル酸は 91.2mg および 22.8mg であった。これらから明らかなとおり、初乳、常乳ともに糖質結合性シアル酸が最も多った。

泌乳日数の経過によるシアル酸含量の変化について、全シアル酸含量は、初乳では非常に高く、泌乳日数の増加とともに、顕著に減少した。常乳では、2ないし3カ月になるとやや下降傾向を示したが、ほぼ一定した値となった。そのほかの結合性シアル酸について同様の傾向を示したものは、糖質結合性シアル酸、全タンパク質結合性シアル酸および乳清タンパク質結合性シアル酸であった。しかし、脂質結合性シアル酸は、これらとは異なり、若干の増加傾向を示し、また、カゼイン結合性シアル酸は、ほとんど変化が、みられなかった。全シアル酸含量が、初乳より常乳が 1/4 程度で、少ないにもかかわらず、脂質結合性シアル酸が初乳よりも常乳の方が多く、カゼイ

Table 3. Percentages of bound sialic acid of whole protein, lipid and carbohydrate to total sialic acid in human colostrum. (%)

Lactation (days)	Whole protein	Casein	Whey protein	Lipid	Carbo-hydrate
1 (n=1)	12.0	2.4	9.6	0.2	87.8
2 (n=1)	11.8	1.8	10.0	0.1	88.1
3 (n=1)	13.0	3.1	9.9	0.1	86.9
4 (n=5)	11.9	1.7	10.2	0.1	88.0
5 (n=2)	13.0	3.4	9.7	0.1	86.9
Average	12.2	2.3	10.0	0.1	87.7
S.D.	1.39	0.49	0.50	0.01	0.39

Table 4. Percentages of bound sialic acid of whole protein, lipid and carbohydrate to total sialic acid in mature milk. (%)

Lactation (days)	Whole protein	Casein	Whey protein	Lipid	Carbo-hydrate
40	16.3	5.8	10.5	0.7	83.0
42	16.7	6.6	10.1	0.5	82.8
60	13.0	6.6	6.4	0.6	86.4
62	12.8	4.9	7.9	0.5	86.7
70	18.2	11.5	5.7	1.1	80.7
72	17.7	11.4	16.3	0.5	81.8
80	11.8	7.9	3.9	0.7	87.5
82	16.8	12.7	4.1	1.1	82.1
90	16.7	10.4	6.3	1.6	81.7
92	16.8	9.0	7.8	1.2	82.0
Average	15.7	8.7	8.0	0.9	83.5
S.D.	0.71	0.86	1.15	0.12	0.77

ン結合性シアル酸には変化がみられなかったことは、特に注目すべき点である。乳汁成分は、一般に、泌乳日数の増加とともに減少傾向を示すからである。

これらの結果から、全シアル酸含量に対する各結合性シアル酸の割合を求めると、Table 3 および 4 のとおりとなった。初乳と常乳のカゼイン結合性シアル酸および脂質結合性シアル酸の割合を比較すると初乳より常乳の方がそれぞれ 3.8 倍および 9.0 倍で、高いことが明らかである。これらの結合性シアル酸が、初乳より常乳で、特に高い割合を示すのは、乳児の発育と何らかの関係があるのかも知れない。

本実験では、人乳の一般組成を測定することはできなかったが、文献値 (NRC 1953) をもとにして各成分 100 g 当たりの結合性シアル酸含量を算出すると Table 5 のとおりであった。これによると初乳の乳清タンパク質は常乳の 1.8 倍であり、糖質では、初乳は常乳の 5.3 倍ときわめて高かった。しかし、カゼインは初乳より常乳が 2.8 倍であり、脂質においても初乳より常乳が 1.5 倍とやや高かった。

Table 5. The amounts of bound sialic acid of the protein, lipid and carbohydrate in 100 g of each component in human milk.

	Colostrum		Mature milk	
	Concentration* g/100 ml	Bound sialic acid mg/100 g	Concentration* g/100 ml	Bound sialic acid mg/100 g
Total solids	12.8	812	12.4	219
Protein	2.9	435	1.0	491
Casein	1.2	197	0.4	558
Whey protein	1.7	602	0.6	327
Lipid	2.9	4	3.8	6
Carbohydrate	5.3	1,721	7.0	326

* NRC 1953

乳中におけるシアル酸の意義については、現在のところカゼインミセルの安定性に寄与しているとか、脂肪滴の均質な分散に役立っていることなどがいわれている (奥山 1968) にすぎない。

また、最近、シアル酸を結合するタンパク質の生化学的意義について、広範囲な研究が行なわれている。それらによると、血液型物質、ホルモンなどとして、また、免疫反応などの上で重要な役割を果たしている (清澤 1978, 奥山 1968) ことが明らかになりつつある。たとえば、シアル酸を含む種々のムコタンパク質は、ウィルスによる赤血球凝集反応を阻止する作用があるが、この作用はシアル酸の種類によって差があり、N-アセチル型のは、強いが、N-およびO-ジアセチル型のは、特定のウィルスしか阻止しないといわれている (茂手木 1962)。人乳のシアル酸はすべてN-アセチル型であるが、ウィルスに対するこのような作用について、今後、さらに、検討する必要がある。

全シアル酸の約 50% は、シアリルラクトース、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し (Carlson 1985)、シアリルラクトースは人乳 100 ml 当たり、50~60 mg 含まれている (山本 1978) という。本実験の結果からも、人乳の全シアル酸の 80% 以上が糖質と結合していることが明らかである。人乳と牛乳における乳児栄養上の相違としてビフィズス因子があげられる。すなわち、人乳中のオリゴ糖に含まれる N-アセチルグルコサミンがビフィズス菌の細胞壁の素材として、必要であるからである (山本 1978)。しかし、オリゴ糖を構成するシアル酸の意義

については、明らかではない。

また、シアル酸は酸性スフィンゴ糖脂質のガングリオシドの一構成成分である。ガングリオシドは、脳、赤血球、消化管粘膜など、生体内組織に広く分布している (Ohashi 1978) が、人乳や牛乳中にも確認されている。(Takamizawa et al. 1986, Laegreid et al. 1986). Laegreid ら (1986) によると、人乳のガングリオシドは主に G_{M3} (II³NeuAc-LacCer) と G_{D3} (II³(NeuAc)₂-LacCer) であり、全ガングリオシドの 75~85% が G_{M3} によって占められ、さらに G_{D3} を含めると 95% 以上になるという。 G_{M3} および G_{D3} は、シアル酸をそれぞれ 1 および 2 分子結合した sialyllactosylceramides であるが、この種の糖脂質は肝臓、腎臓および小腸粘膜に高い含有率で存在することが知られている。

人乳の脂質結合性シアル酸がすべて G_{M3} に結合していると仮定すると、人乳 100 ml 当たり、 G_{M3} 濃度は、初乳では約 0.37 μ mol, 常乳では約 0.70 μ mol となる。

乳児の脳重量は生後 6 カ月間で約 400 g 増加し (塚田 1969, 若生 1978), したがってこの間における脳の 1 日当たりの平均増加量は 2.2 g である。神経組織のガングリオシド含量について、生後 9 カ月乳児の白質ガングリオシドは、シアル酸として湿組織 1 g 当たり、309 μ g である (日本生化学会編 1979)。したがって脳 2.2 g の増加のためには、約 680 μ g 必要となり、N-アセチルノイラミン酸としては 2.2 μ mol に相当する。乳児の 1 日の哺乳量を平均 850 ml (中山 1983) とすると、乳児の G_{M3} 摂取量は、1 日当たり、約 3.1~5.9 μ mol になる。これらの値は、脳の発育のために必要とする 1 日当たりのガングリオシド量より多いが、人乳中のガングリオシドが脳の発育にどのように関わっているかについては、今後、さらに、広範囲にわたる研究が必要となる。

Summary

In human milk, the sialic acid (N-acetylneuraminic acid) exists in the bound form to such components as protein, lipid and carbohydrate, but not in the free form.

In this study, the distribution of the bound sialic acid in human colostrum and mature milk was investigated by determining the sialic acid contents of whole protein, casein, whey protein, lipid and carbohydrate.

The total sialic acid contents in 100 ml of the colostrum and mature milk were 103.9 mg and 27.2 mg, respectively. The bound sialic acid contents in 100 ml of the colostrum and mature milk were whole protein, 12.6 and 4.91; casein, 2.36 and 2.23; whey protein, 10.24 and 1.96; lipid, 0.116 and 0.220 and carbohydrate, 9.12 and 22.8 mg, respectively.

Percentages of the bound sialic acid of casein and lipid to total sialic acid were 3.8 and 9.0 times higher in the mature milk than in the colostrum, respectively.

要 約

人乳中のシアル酸はN-アセチルノイラミン酸として、タンパク質、脂質および糖質に結合した状態で存在している。

初乳と常乳各 10 検体について全シアル酸含量ならびに全タンパク質、カゼイン、乳清タンパク質、脂質および糖質にそれぞれ結合するシアル酸含量を測定した。

その結果、乳汁 100ml 当たり、全シアル酸含量は、初乳と常乳では、103.9mg および 27.2mg であり、さらに初乳と常乳の各結合性シアル酸含量は、それぞれ全タンパク質結合性では 12.6mg, 4.91 mg, カゼインでは 2.36mg, 2.23 mg, 乳清タンパク質では 10.24mg, 1.96mg, 脂質では 0.116mg, 0.220mg. および糖質では 91.2mg, 22.8mg であった。

全シアル酸に対する各結合性シアル酸の割合を算出したところ、カゼイン結合性シアル酸と脂質結合性シアル酸は、初乳より常乳の方がそれぞれ、3.8 倍および 9.0 倍高い値を示した。

引 用 文 献

- Carlson, S. E. 1985. N-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Ame. J. Clin. Nutr.* 41: 720-726.
- 木幡 陽. 1986. 糖蛋白質糖鎖の構造と機能. *化学と生物*. 24: A 175-176.
- 清澤 功. 1978. 人乳のシアル酸. *Jap. Dairy. Food Sci.* 17: A 55-75.
- Laegreid, A. and A-B. K. Otnaess. 1986. Purification of human milk gangliosides by silica gel chromatography and analysis of trifluoroacetate derivatives by gas chromatography. *J. Chromat.* 377: 59-67.
- 茂手木祐喜. 1962. シアル酸. *Medicina.* 1: 285-290.
- 長澤太郎, 両木岱造, 清澤 功, 寺本容子. 1964. 人乳ならびに牛乳の結合性糖類に関する研究. *栄養と食糧*. 17: 217-222.
- 中山健太郎. 1983. 乳幼児栄養の実際. 第9版. 医学書院. 東京. p. 89.
- National Research Council (NRC). 1953.
- 日本生化学会編. 1979. 生化学データブック I. 東京化学同人. 東京. p. 1816.
- Ohashi, M. 1978. A comparison of the ganglioside distributions of fat tissues in various Animals by two-dimensional thin layer chromatography. *Lipids.* 14: 52-57.
- 奥山 隆. 1968. 乳のシアル酸. *Jap. Dairy. Food Sci.* 17: A 55-75.
- Takamizawa, K, M. Iwamori, M. Mutai and Y. Nagai. 1986. Gangliosides of bovine buttermilk. *J. Biol. Chem.* 26: 5625-5630.
- 塚田裕三. 1969. 脳の生化学. 朝倉出版. 東京. p. 28.
- 若生 宏. 1978. 小児栄養のすべて. 金原出版. 東京. p. 23.
- Warren, L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. Biol. Chem.* 234: 1971-1975.
- 山本良郎. 1978. 母乳の脂質と糖質について. *Jap. Dairy. Food Sci.* 27: A 163-173.