

各種殺菌牛乳中の機能性たんぱく質に関する研究 ～牛乳中のラクトフェリンの分析～

食品・化学技術室 大垣 佳寛, 松田 皓生, 海老原 昇
次 長 宮崎 浩子
古谷乳業株式会社 高野 和也, 白井 寛, 石出 卓也

Studies on Functional Proteins in Various Heat-Treated Milk ～ Development of Analytical Method of Lactoferrin in Milk by High Performance Liquid Chromatography ～

Yoshihiro OGAKI, Kosei MATSUDA, Noboru EBIHARA, Hiroko MIYAZAKI,
Kazuya TAKANO, Hiroshi SHIROI and Takuya ISHIDE

本研究では、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によるラクトフェリン(LF)の分析法を開発し、生乳及びUHT, HTST, LTLT 殺菌牛乳中の未変性の LF の分析を行った。

イオン交換法により乳試料中の未変性の LF を抽出した試料について HPLC 分析したところ ELISA による定量値と良い一致を見せた。

また、本法による未変性の LF の定量値は、生乳で 9.6-16.0 mg/100mL で、HTST 牛乳で 3.2-8.0 mg/100mL であった。LTLT 牛乳や UHT 牛乳には LF は殆ど含まれなかった。

本分析法は牛乳等の品質管理や研究開発に好適に用いることができると考えられる。

1. はじめに

ラクトフェリン(LF)は乳中に含まれる分子量約 80000 の鉄結合性の糖たんぱく質である。血漿に含まれ鉄イオンの輸送を担うトランスフェリンと類似の構造をもつ。LF は 1939 年に Sørensen らによって牛乳の乳清画分から赤色たんぱく質として発見され、1960 年に母乳と牛乳から単離された¹⁾。LF は特に人の初乳に多く含まれ、乳児にとって感染防御など重要な働きをしている²⁾。LF の生理機能として、抗菌・抗ウイルス活性、ビフィズス菌増殖促進作用、免疫調節作用、抗酸化作用、鉄吸収調節作用などの多様な作用が知られている³⁾。LF は未加熱の牛の生乳には約 20 mg/100mL、ナチュラルチーズには約 300 mg/100g 含まれている⁴⁾が加熱により変性しやすいと考えられている。現在 LF はホエイからの工業的な大規模生産が実用化され⁵⁾、サプリメントとしても販売されている。

LF の分析方法としては、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)^{4,5)}、ラテックス免疫凝集法⁶⁾、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)^{7,8)}が用いられており、その他、キャピラリー電気泳動法⁹⁾やバイオセンサー¹⁰⁾を用いた方法も研究されている。その中でも ELISA

が最もよく用いられている。

ELISA は、抗原抗体反応を用いて分析対象物を検出する方法で、LF に限らず種々の個々のたんぱく質の分析に幅広く用いられている。たんぱく質等の抗原に合わせた抗体を調製する必要があり、これらを予め調製した分析キットも市販されている⁴⁾。しかしながら、分析キットがやや高価であり、さらに分析するたんぱく質や抗体の固相化に時間がかかるとともに、操作に熟練が必要である難点がある。

ラテックス免疫凝集法⁶⁾は抗原(または抗体)を、ラテックスに固定化された抗体(または抗原)と反応させて凝集させ、その濁りを光学的に測定するもので、ELISA に比べて測定が短時間で済み、操作も簡便であり多検体分析に適するが、分析キットがやや高価であることに加え、臨床検査用の生化学自動分析装置が必要となる。

HPLC 法^{7,8)}は、様々な有機物、イオンなどの分析に頻繁に用いられている汎用性のある分析方法である。オートサンプラーを用いると、多検体を自動分析することが可能である。

本研究では、HPLC 法によるホエイ中の LF の分析法を開発し、さらに加熱殺菌前の生乳と、UHT(超

高温瞬間殺菌), HTST(高温短時間殺菌)及び LTLT(低温保持殺菌)牛乳中の未変性の LF について, HPLC 法を用いて定量分析を試みた。

2. 実験方法

2.1 試料・試薬

生乳及びこれを HTST, UHT 殺菌した牛乳については古谷乳業株式会社から提供されたものを用いた。HTST 法の殺菌条件は 75℃で 15 秒である。市販牛乳については千葉市内の小売店にて購入した。いずれの試料も冷蔵の状態でご所に搬入し, 分析直前まで当所の冷凍庫にて -25℃に冷凍して保存して, 分析直前に解凍して使用した。

LF の抽出及び精製に用いる酢酸, 酢酸ナトリウム(無水), 水酸化ナトリウム, 塩化ナトリウムは富士フイルム和光純薬の特級試薬。LF 標準品は同社の牛乳由来(含量 95.0%以上)を用いた。LF の分離にはイオン交換クロマトグラフィ用充填剤 Toyopearl SP-550C(東ソー製)を用いた。HPLC に用いたアセトニトリル及びトリフルオロ酢酸(TFA)は富士フイルム和光純薬の HPLC 用を用いた。水は超純水(Milli-Q 水)を用いた。

2.2 緩衝液等の調製

2.2.1 酢酸緩衝液 A (pH=4.0) の調製

0.83 mol/L(50.0 g/L)酢酸と, 0.2 mol/L(16.4 g/L) 酢酸ナトリウム水溶液を pH=4.0 になるように混合して(容量比でほぼ 1 : 1)調製した。

2.2.2 酢酸緩衝液 B (pH=6.0) の調製

酢酸緩衝液 A 400 mL に 1.0 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を pH=6.0 になるまで加えて(約 160 mL)調製した。

2.2.3 溶出液 (1.5 mol/L NaCl 水溶液) の調製

塩化ナトリウム 43.8 g(0.75 mol)を 500 mL ビーカーに入れ, 水約 250 mL を加え沸騰させ完全に溶解させ, 冷却の後 500 mL メスフラスコに入れ, 水を標線まで入れて調製した。

2.2.4 LF 標準溶液 (A) の調製

LF 標準品 0.020 g を酢酸緩衝液 A:水=1 : 1(容量比)の溶液 10 mL に溶解し, 20 mL のメスフラスコに入れ, 酢酸緩衝液 A : 水=1 : 1(容量比)の溶液で標線まで満たして 100 mg/100 mL の標準溶液を調製した。

上記溶液についてそれぞれ 4.0 mL, 2.0 mL, 1.0 mL をそれぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ, 酢酸緩衝液 A : 水=1 : 1(容量比)の溶液を標線まで満

たしてそれぞれ 20 mg/100 mL, 10 mg/100 mL, 5.0 mg/100 mL の標準溶液を調製した。

2.2.5 LF 標準溶液 (B) の調製

LF 標準品 0.020 g を 1.5 mol/L NaCl 水溶液少量に溶解し, 20 mL のメスフラスコに入れ標線まで 1.5 mol/L NaCl 水溶液を入れ 100 mg/100 mL の標準溶液を調製した。

上記溶液についてそれぞれ 4.0 mL, 2.0 mL, 1.0 mL をそれぞれ 20 mL のメスフラスコに入れ, 1.5 mol/L NaCl 水溶液を標線まで入れ, それぞれ 20 mg/100 mL, 10 mg/100 mL, 5.0 mg/100 mL の標準溶液を調製した。

2.2.6 LF 添加ホエイ (10 mg/100 mL) の調製

UHT 牛乳 20 mL をそれぞれ 4 本の 50 mL 遠心チューブに分注し, それぞれに酢酸緩衝液 A 20 mL を加えて 1 分間上下に振とうした後 800×g で 5 分遠心分離し, 上澄みをろ紙(東洋ろ紙 No.2)でろ過し, ホエイを調製した。あらかじめこのホエイ中に LF が含まれないことを確認した。その後, 2.2.4 で調製した LF 100 mg/100 mL 溶液 2.0 mL を 20 mL のメスフラスコに入れ, 上記で調製したホエイで標線まで満たし LF 濃度 10 mg/100 mL とした。

2.3 分析操作

2.3.1 カラムの作成

ミニカラム(ムロマックミニカラム L 室町ケミカル製)に, 20 %エタノールに懸濁している Toyopearl SP-550C を樹脂の正味量として 1.0 mL 充てんした後, 酢酸緩衝液 B を 10 mL 流し, 流れ去ったら, カラムの出口の栓を閉じ, さらに酢酸緩衝液 B を 5.0 mL 加えて, ふたをつけて試験管(長さ 180 mm, 内径 15 mm)にさして 3 日以上放置し, 試験開始まで保存した。

2.3.2 LF の抽出・精製

ふた付き 15 mL 遠心チューブに試料 5.0 mL と酢酸緩衝液 A 5.0 mL を加え, ふたを閉め 1 分間上下に激しく振とうした後, 800×g で 5 分遠心分離し, 上澄みのホエイを 5.0 mL マイクロピペットで試験管に回収した。

このホエイ 5.0 mL に 1.0 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 1.0 mL 添加し, ボルテックスミキサーで試験管をよく振とうした。

上記で調製したミニカラムの出口のキャップを取り, 予め満たされていた酢酸緩衝液 B を捨て, 再度試験管にさしたのち, 上記ホエイ(計 6.0 mL)全てをカラムにゆっくり入れ溶出させた。さらに酢酸緩

衝液 B 4.0 mL をホエイの入っていた試験管に入れ、ボルテックスミキサーを用い試験管を洗い、この溶液もカラムに入れ溶出させた。

その後、別の試験管にカラムを移し、カラムに 1.5 mol/L NaCl 水溶液 5.0 mL をゆっくり入れて溶出させた。

この溶液の一部を孔径 0.20 μm のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製シリンジフィルターでろ過して HPLC 用バイアルに入れた。この溶液は元の乳試料に対して 2 倍希釈となっている。

2.4 高速液体クロマトグラフィによる LF の分析

上記試料溶液について高速液体クロマトグラフ(島津製作所 LCMS-8030)を用い、以下の条件で分析を行なった。カラム : Shodex Asahipak C4P-50 4D(内径 4.6 mm $\times$ 150 mm) + ガードカラム Shodex Asahipak C4P-50G 4A(いずれも昭和電工製)、溶離液

(A) : アセトニトリル+0.1% TFA, 溶離液(B) : 水 +0.05% TFA, グラジエント条件: 0 % A (0-2 分), 0%-30.0% A (2-6 分), 30.0%-31.0% A (6-11 分), 31.0%-50.0% A (11-14.7 分), 50% A (14.7-20 分), 50%-0% A (20-22 分), 流速 : 0.8 mL/min, カラム温度 : 40°C, 検出器 : ダイオードアレイ紫外可視分光光度計, 波長 : 280 nm, 波長幅 : 4 nm, 注入量 : 25 μL 。

2.5 ELISA による LF の分析

比較のため生乳及びそれらを殺菌した試料について ELISA にて LF の分析を行った。分析は外部機関に依頼した。なお、分析は Bovine Lactoferrin ELISA Kit(Bethyl Laboratories 社製)を用い、付属のマニュアルのとおり試験を行い、マイクロプレートリーダーはモレキュラーデバイス社製 SpectraMax Plus 384 を用いたとのことであった。

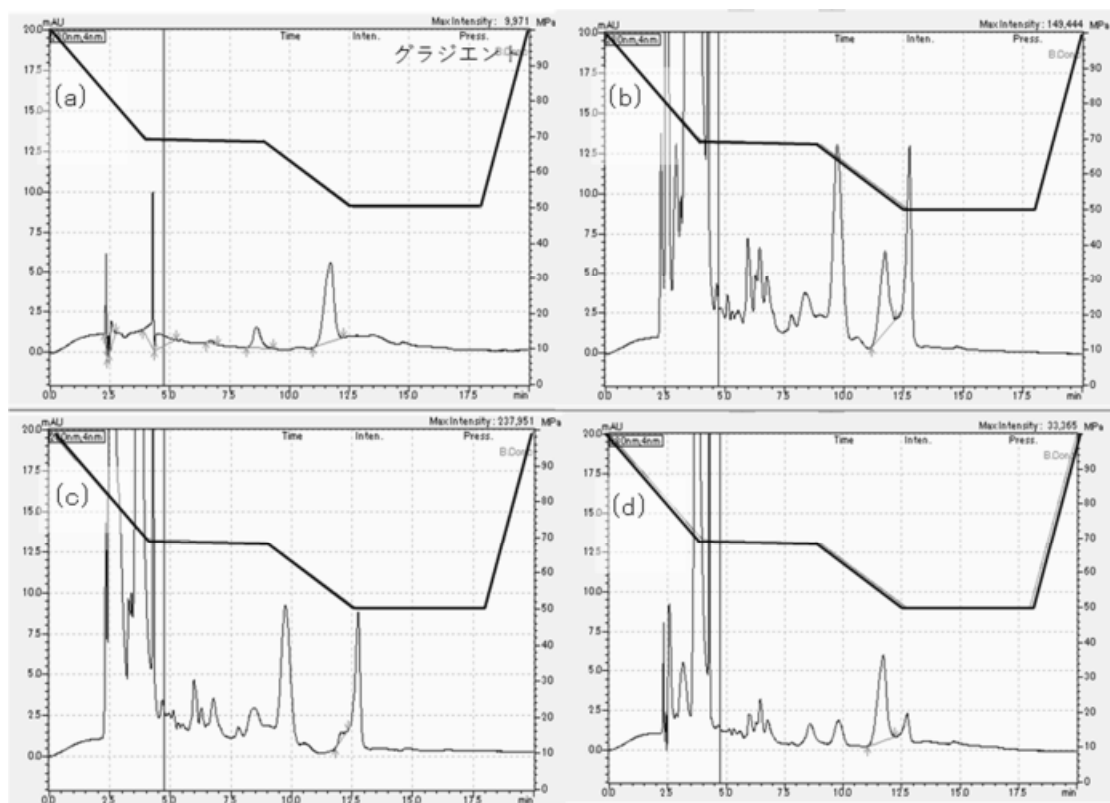


図1 LF 添加ホエイ (10 mg/100mL) のクロマトグラム

(縦軸 : 吸光度 mAU (280 nm), 横軸 : 保持時間)

(a) LF 標準溶液 (A) (10 mg/100mL), (b) LF 添加ホエイ (10 mg/100mL),
(c) カラム通過後の溶出液, (d) 1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶離後の溶離液

3. 結果及び考察

3.1 イオン交換樹脂によるホエイの精製

まず、前報¹¹⁾の方法で、乳試料(2022年7月採取)について、酢酸緩衝液 A を加え、攪拌、遠心分離を行い、シリジフィルターでろ過した試料について LF を HPLC 分析した。その結果生乳で 23.7 mg/100mL, HTST 牛乳で 18.5 mg/100mL の分析結果を得た。しかし、同試料について外部分析機関において ELISA で分析を行ったところ、それぞれ 12.2 mg/100mL, 5.9 mg/100mL となり値に乖離が生じた。このため、酢酸緩衝液 A で分離するだけでは LF の精製が不十分であったと考え、LF の精製によく用いられているイオン交換樹脂(Toyo pearl SP-550C)を充填したカラムを用い^{12,13)}、このカラムにホエイを通過させることにより LF を樹脂に吸着させ、さらにその樹脂に 1.5 mol/L NaCl 水溶液を加えて LF を溶離させ、この溶離液について HPLC を試みることにした。

3.2 HPLC による LF 添加ホエイ (10mg/100mL) の分析

まず、Toyo pearl SP-550C 充填カラムによって LF がどの程度回収できるかを検討するため、UHT 牛乳から調製した、未変性の LF をほとんど含まないことを確認したホエイに LF を一定の濃度(10 mg/100mL)になるように含有させた試料について、当該カラムに通過させたのち、1.5 mol/L NaCl で溶離させた溶液について HPLC 分析を行った。

図 1 に、(a) : LF 標準溶液(A)(10 mg/100mL), (b) : LF 添加ホエイ(10 mg/100mL), (c) : (b)をカラム通過させた後の溶出液, (d) : (b)を 1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶離させた溶液のクロマトグラムを示す。(c)のカラム通過後の溶出液において、LF がほとんど溶出していないと認められるため、LF の樹脂への保持はほぼ完全になされていると推定した。一方 1.5 mol/L NaCl 水溶液による LF の溶離は、(d)に示した LF のピーク面積からほぼ完全であると考えられた。

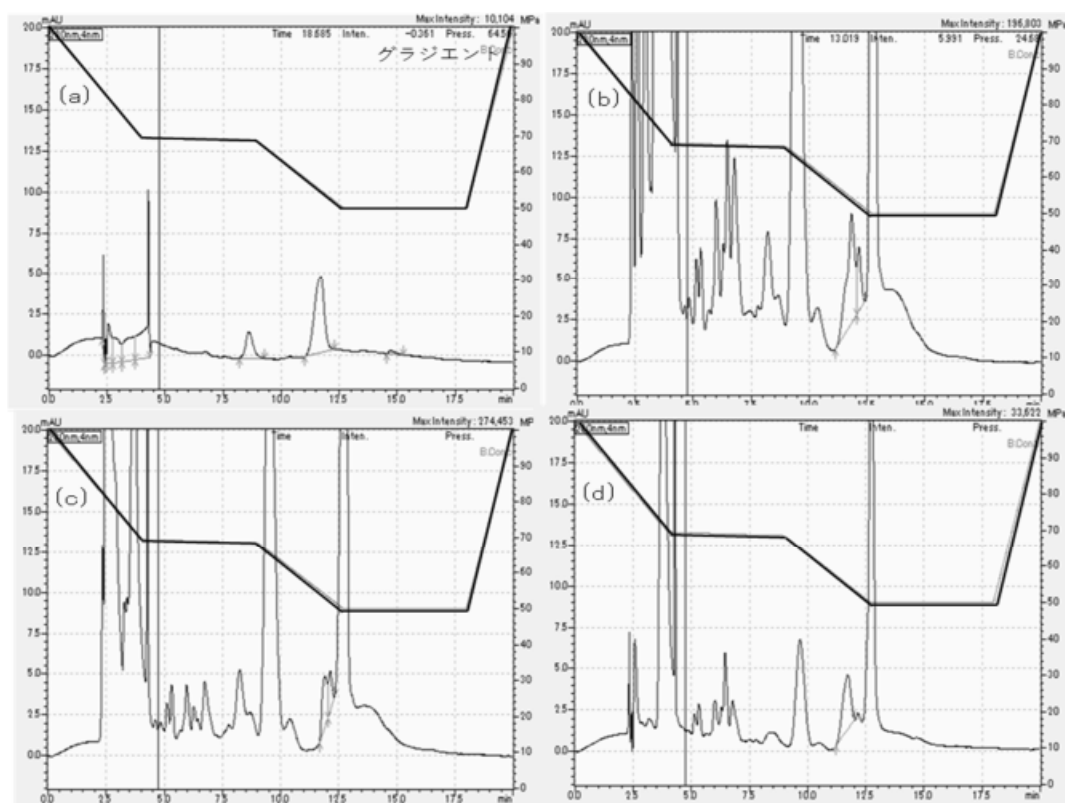


図2 生乳ホエイのクロマトグラム

(縦軸：吸光度 mAU (280nm), 横軸：保持時間)

(a) (参考) LF 標準液(B) (10 mg/100mL), (b) 生乳から調製したホエイ
(c) カラム通過後の溶出液, (d) 1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶離後の溶離液

1.5 mol/L NaCl 水溶液中の LF の回収率は $97.4 \pm 1.8\%$ ($n=3$) と計算され、優れた回収率を示した。また、ノイズレベルから計算した検出限界、定量下限はそれぞれ 0.6 mg/100mL, 2.0 mg/100mL (原試料で 1.2 mg/100mL, 4.0 mg/100mL) と計算された。

このように、イオン交換樹脂 Toyopearl SP-550C を用いたカラムにホエイを通過させることにより LF をほぼ完全に捕捉でき、1.5 mol/L NaCl 水溶液でほぼ完全に溶出でき、この方法を用いて LF を精製し HPLC 分析できることを確認した。

表 1 生乳及び HTST 牛乳の HPLC 及び ELISA による LF の分析結果 (mg/100mL, $n=2$)

試料	HPLC (カラム溶出後)	ELISA
生乳	12.3	12.2
HTST	6.3	5.9

試料は 2022 年 7 月採取

3.3 HPLC による生乳ホエイの分析

図 2 に、(a): LF 標準溶液(B)(10 mg/100mL), (b): 生乳から調製したホエイ, (c): (b) をカラムに通した溶出液, (d): (b) をカラムに通した後 1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶離後の溶離液のクロマトグラムを示す。生乳から調製したホエイのクロマトグラム(b)には、12.6 分の大きなピークの前に 2 つのピークがある。そのうち前者のピークはリーディングしており、前のピークと十分に分離していないと推定できる。

一方、このホエイをカラムに通した後の溶出液(c)では、同じリテンションタイムに 2 本のピークが重なって溶出している。

図 1 の(c)において、カラム通過後の溶出液中に LF がほとんど検出されなかったことにより、図 2 の(c)の 2 本のピークは LF ではなく、何らかの不純物であったと予想される。一方、1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶離後の溶離液(d)では、(b)の LF の位置に相当するピークが小さくなっており、これは不純物が除かれたためピークが小さくなったと推察できる。

このように、イオン交換樹脂カラムにホエイを負荷することで、同じリテンションタイムに溶出する不純物を溶出させ、その後 1.5 mol/L NaCl 水溶液で溶出させたものを HPLC 分析することで LF の含

有量を定量出来る。

但し、前報¹⁹⁾でも報告したとおり、乳に酢酸緩衝液を加えることで完全に LF を抽出するのは難しいと考えられ、乳中の LF の実際の量は抽出率など考慮するとこれ以上は含まれていると予想される。

3.4 HPLC と ELISA との比較

表 1 に、上記のイオン交換樹脂カラムによる前処理を行った生乳及び HTST 牛乳の HPLC と ELISA による LF の分析結果を示す。HPLC による生乳及び HTST 牛乳の LF の分析値はそれぞれ 12.3 mg/100mL, 6.3 mg/100mL, 対して ELISA による分析値はそれぞれ 12.2 mg/100mL, 5.9 mg/100mL となり、ほぼ一致した。

表 2 産地の異なる生乳 (A, B 2 種類), HTST 牛乳, UHT 牛乳及び市販の LTLT 牛乳, UHT 牛乳 (4 種) 中の LF の含有量 (mg/100mL, $n=2$)

試料	LF 含有量
生乳 A	13.9
生乳 B	13.7
LTLT 牛乳	tr
HTST 牛乳	6.5
UHT 牛乳 A	nd
UHT 牛乳 B	nd
UHT 牛乳 C	nd
UHT 牛乳 D	nd

試料は 2022 年 12 月採取

nd: 検出限界未満, tr: 検出限界以上定量下限未満

なお、UHT 牛乳 A は生乳 A を殺菌したもので、HTST 牛乳は生乳 B を殺菌したものの。

3.5 各種試料中の LF の含有量

表 2 に、産地の異なる生乳(A, B 2 種類), HTST 牛乳, UHT 牛乳, 及び市販の LTLT 牛乳, UHT 牛乳(3 種)中の未変性の LF の含有量を示す。なお試料は 2022 年 12 月に回収したものである。

生乳 A, B 中の未変性 LF の含有量はそれぞれ 13.9 mg/100mL, 13.7 mg/100mL と定量された。一方 HTST 殺菌牛乳については 6.5 mg/100mL と定量され、HTST 牛乳ではほぼ 50%の LF が未変性で残っていることが分かった。HTST 牛乳は殺菌温度が

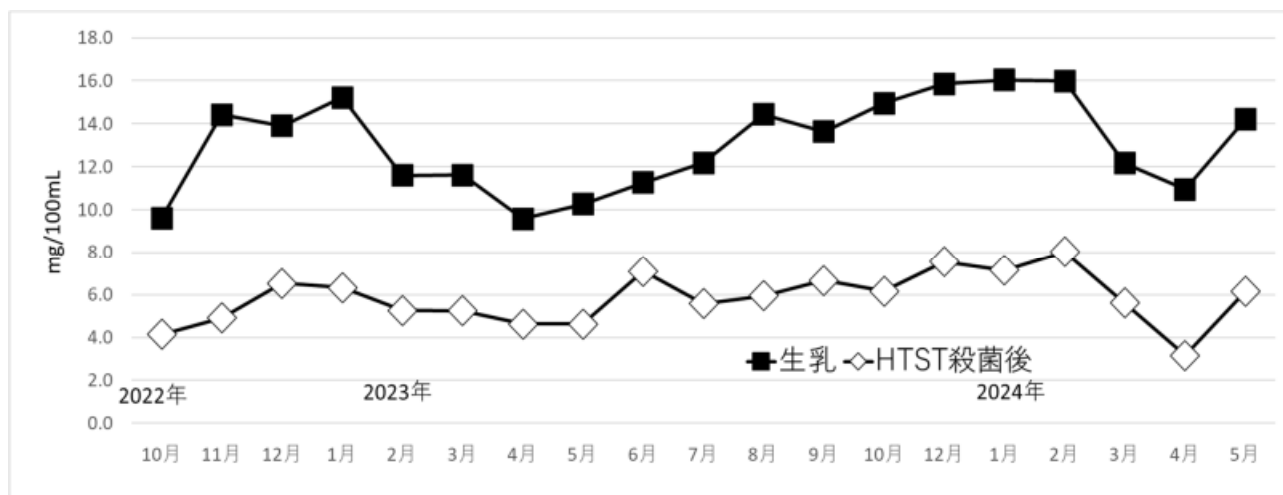


図3 生乳及びそれを HTST 殺菌した乳中の LF の含有量の変化
(2022 年 10 月～2024 年 5 月, なお, 2023 年 11 月の試料は入手できなかった。)

75℃と比較的高いものの、殺菌時間が 15 秒と短いことにより、LF の変性が少なかったことによると推定される。一方、市販の LTLT 牛乳中の未変性 LF の含有量は定量下限値以下であった。LTLT 牛乳は殺菌温度が 65℃前後と比較的低いのに対し、殺菌時間が 30 分と長く、LF の変性が大きかったことが原因であると推定される。また、UHT 牛乳ではすべて検出限界以下となった。UHT 牛乳は殺菌時間が 1～3 秒と短いものの、120℃以上で加熱されるので、LF の変性が大きかったことが原因であると考えられる。

3.6 生乳及び HTST 牛乳中の LF 含有量の年次変化

図 3 に、2022 年 10 月から 2024 年 5 月までに回収した生乳及びそれらを HTST 殺菌した牛乳中の未変性の LF の含有量の変化を示す。

HTST 殺菌前の生乳中の未変性 LF の含有量は 9.6-16.0 mg/100mL で、平均値は 12.5 mg/100mL。対してこれらを HTST 殺菌した牛乳中の未変性の LF の含有量は 3.2-8.0 mg/100mL で、平均値は 5.8 mg/100mL であった。また、季節によって若干の変動が見られ、春から夏にかけては低い傾向がみられ、逆に秋から冬にかけて高い傾向が見られた。この原因として乳牛の生育環境の違いによると推察されるが、さらなる検討を進めていく必要がある。

4. 結論

イオン交換クロマトグラフィを用いた前処理により、乳試料中の未変性の LF を高い回収率で精製することが出来た。また本精製法を用いた乳試料

について HPLC 分析を行ったところ、ELISA による定量値と良い一致を見せた。

また、本法による未変性の LF の定量値は、生乳で 9.6-16.0 mg/100mL で、HTST 牛乳では 3.2-8.0 mg/100mL であった。また、LTLT 牛乳では全て定量下限値以下であり、UHT 牛乳では全て検出限界以下であった。

本 HPLC 法は ELISA の代替として牛乳等の品質管理や研究開発に好適に用いることができると考えられる。

参考文献

- 1) 山内恒治：“ラクトフェリン”，日本食品科学工学会誌，Vol. 53, No. 3, p. 193 (2006)．
- 2) 織田浩嗣：“ラクトフェリンの生体防御作用に関する研究”，ミルクサイエンス，Vol. 62, No. 3, pp. 105 - 109 (2013)．
- 3) 田村吉隆，齋藤仁志：“膜技術を活用したラクトフェリンの製造”，膜 (MEMBRANE)，Vol. 30, No. 4, pp. 192 - 197 (2005)
- 4) フナコシ株式会社：“ウシラクトフェリン ELISA キット／抗体”，
< <https://www.funakoshi.co.jp/contents/56118> >
(参照日 2024 年 8 月 9 日)．
- 5) J.B. Cheng, J.Q. Wang, D.P. Bu, G.L. Liu, C.G. Zhang, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, J.Z. Wang: “Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 91, No. 3, pp.970-976, (2008)．

- 6) 難波俊二, 奥田優子, 石井利明, 神原敬一, 藤澤宗駿, 盛田俊介: “ミルクサイエンス”, **Vol. 53, No. 4**, pp. 230 - 231 (2004).
- 7) E. Tsakali, A. Chatzilazarou, D. Houhoula, S. Koulouris, J. Tsaknis, J. V. Impe: “A Rapid HPLC Method for the Determination of Lactoferrin in Milk of Various Species”, *Journal of Dairy Research*, **Vol. 86, No. 2**, pp. 238-241 (2019).
- 8) Y. Zhang, F. Lou, W. Wu, X. Dong, J. Ren, Q. Shen: “Determination of Bovine Lactoferrin in Food by HPLC with a Heparin Affinity Column for Sample Preparation”, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, **Vol. 100, No. 1**, pp.133-138 (2017).
- 9) H. Chen, Z. Wang, F. Fan, P. Shi, X. Xu, M. Du, C. Wang: “Analysis Method of Lactoferrin Based on Uncoated Capillary Electrophoresis”, *eFood*, **Vol. 2, No. 3**, pp. 147-153 (2021).
- 10) A. P.-Nowak, M. Urbanowicz, K. Sadowska, D. G. Pijanowska: “DNA-based Molecular Recognition System for Lactoferrin Biosensing”, *International Journal of Biological Macromolecules*, **Vol. 253, No. 3**, p. 126747 (2023).
- 11) 大垣 佳寛, 海老原 昇, 宮崎 浩子, 高野 和也, 白井 寛, 石出 卓也: “高速液体クロマトグラフィーによるラクトフェリンの分析方法の開発”, 千葉県産業支援技術研究所研究報告, **Vol. 19**, pp. 3 - 6 (2021).
- 12) コスモ・バイオ株式会社: “酪農食品科学特論 - 機能性ミルクタンパク質実験講座 - 改訂版”, I. 構造編-1. ミルクタンパク質の分離と精製, <<https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/milk-protein/milk-protein-02.asp>> (参照日 2024 年 8 月 13 日).
- 13) 雪印乳業株式会社, 重松 昭典, 佐藤 薫, 手塚 宣之, 柴 真由美, 富沢 章, “ラクトフェリンの製造方法”, 日本国公開特許公報 2004-307344 (2004 年 11 月 4 日).