

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591328

研究課題名（和文）母乳ガングリオシドとシアル酸含有多糖類の生理作用：神経細胞分化への影響

研究課題名（英文）The Physiological function of milk gangliosides and their sialic acid containing polysaccharides : effect to the central nervous system ontogenesis and differentiation

研究代表者

泉 達郎 (IZUMI TATSURO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80119891

研究成果の概要（和文）：ガングリオシドは神経系に高濃度に存在し、一部のガングリオシドは少量ではあるが神経組織以外の臓器や血球、血清、脳脊髄液に存在することが知られている。ヒトの母乳は新生児、乳児にとって、エネルギー源だけでなく、感染防御、脳の発育に重要な働きをしている事が知られている。

我々は満期産の母親よりのヒト母乳には GD3 と GM3 ガングリオシドが高濃度に存在し、牛乳や調整粉乳より高濃度である事、GD3 が初乳では唯一の主要ガングリオシドであり、GM3 は出産後 8 日より急に出現し、徐々に増加する事を報告した。一方、早期産の母親からの母乳に関する data はないため、妊娠 30 週未満の早期産時の母乳でも検討した。早期産母体の母乳ガングリオシドは出産後 2-3 日で頂値となり、10 日まで高濃度が維持された。GD3 は満期産母乳と同様に出産後、7-10 日までの初乳で主要ガングリオシドであり、GM3 はほとんど検出されなかった。その後、GD3 は低下し、GM3 が増加した。出産後 5-8 日までの母乳 GD3 濃度は、早期産母乳の方が満期産母乳との間に差はなかったが、それ以降の時期の GM3 濃度は早期産母乳が満期産母乳より低値であった。満期産と早期産母乳の母乳は、ともに GD3 と GM3 を主要成分とし、GD3 と GM3 がともに未熟な脳及び、大脳神経組織、胎児脳や中枢神経系の悪性腫瘍で主要なガングリオシド成分である事より、 ^{14}C -GD3、 ^{14}C -GM3 を自分で作製し、ラットの母乳に混入、新生児ラットの胃に直接注入し、大脳への移行、GD3、GM3 それぞれより GM1、GD1a、GD1b、GT1b 等、複雑ガングリオシドへの生合成代謝を検討した。しかし、現時点で大脳への移行、生合成は確認されていない。この理由として 1. 実験手順そのものに問題、2. ^{14}C -GD3、 ^{14}C -GM3 の投与量、濃度が低いため検出感度以下であった。3. ラットへの投与方法、4. ガングリオシドではなく、多糖類に ^{14}C -をラベルして検討すべきであった等を考え、実験を継続している。

研究成果の概要（英文）：Objective: Gangliosides are present in high concentrations in the nervous tissue, and some are observed in small amounts in many extraneural tissues and body fluids. Human milk may play important roles in energy supplementation, prophylaxis of infection, and brain development. For preterm infants, human milk gangliosides are also very important substances during the early lactation stage. However, there are no data on human milk gangliosides from mothers at preterm delivery. We had described that human milk contains higher concentration of GD3 and GM3 gangliosides than cow's milk or infant milk formula. GD3 is a major component of the colostrums, and GM3 increases sharply at 8 d postpartum and then increases gradually in the milk of healthy human mothers with full-term delivery. We investigated the characterization of gangliosides and chronologic changes in human preterm milk earlier than 30 wk of gestation from 1 to 60 d after birth. And now, we also tried to examine the milk gangliosides incorporation to the brain during suckling period.

Methods: Forty-one samples were analyzed by high-performance thin-layer chromatography and a microtechnique using 1 mL of milk from each lactation and compared with 61 full-term human milk samples. After the preparation of ^{14}C -GD3 and ^{14}C -GM3, we tried to the incorporation of these gangliosides to the suckling rat brain, through milk.

Results: Total lipid-bound sialic acid of human milk gangliosides after preterm delivery showed a peak concentration at 2 to 3 d postpartum and then remained at a high concentration until approximately 10 d. GD3 was the major ganglioside in the colostrum until approximately 7 to 10 d postpartum. GM3 was scarcely detected until 7 d postpartum and then increased gradually. There was no difference in the GD3 concentration per 1 mL of human milk between preterm and full-term human milk until approximately 5 to 8 d postpartum. After that time, the GD3 concentration decreased sharply. In contrast, the total concentrations of GM3 per 1 mL of human milk from mothers after preterm delivery were lower than those from mothers after full-term delivery throughout the entire period examined.

Conclusion: This finding is essential to elucidate the composition of human milk gangliosides after preterm delivery, which may contribute to the analysis of the physiologic composition and formulation appropriate preterm infant nutrition.

However, we could not confirm the incorporation of these gangliosides to the rat brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：母乳ガングリオシド、GD3 と GM3、神経細胞への取込み、複雑ガングリオシドへの生合成、脳の発達・分化、小児神経学

1. 研究開始当初の背景

母乳が新生児乳児期の主要なエネルギー源として身体発育や脳の発達に重要な役割を持つ事は明らかではあるが、母乳の方が人工調製粉乳より、新生児乳児期以降の認知能の発達をより促進させるのか、否か、については議論がある。母乳の方が、より知的発達を促進するとの報告の方が多いが、小児期では母乳と人工調製粉乳の両群では差がないとの報告も一部にはある。

ただ、従来のこれらの報告はアンケート調査などに基づく、統計的手法で検討したものであり、授乳期間中完全母乳栄養であったのか、例えば、ほんの一時期人工調製粉乳を与えた例は、どのように対応したのか、不明な点もあり、統計的手法の限界がある。

我々は、従来より母乳中のガングリオシドや、シアル酸含有多糖類の分析研究を継続し、その生理作用を脳神経細胞の分化、発達、成熟、機能の面で、どのような影響を持つかの研究を継続している。母乳中にはGM3 と GD3 ガングリオシドが存在し、その分布比は初乳と後期乳とでは、出産、授乳後8日で急速に変化することを示し (Pan XL Izumi T. Early Hum

Dev 1999;55:1-8) GM3、GD3 ガングリオシド含量とその組成比を市販の人工調製粉乳と対比すると、母乳の方がガングリオシド含量がシアル酸量で2-3倍多く、組成比が異なることを報告した (Pan XL Izumi T. Early Hum Dev 2000;57:25-31)。一方、流産した胎児や新生児の脳と、未熟で悪性度の高い神経上皮性細胞腫瘍ではGM3 やGD3 が主要なガングリオシド成分であることを示し (Pan XL Izumi T. Brain Hum Dev 2000;22:196-198)、母乳ガングリオシドと未熟な脳組織では共通性を有することを示した。GD3 は従来より未熟な脳神経系に豊富に存在し、脳の発達、分化に重要な作用をもつことが指摘されており、母乳、特に初乳にGD3 が選択的に唯一のガングリオシドとして存在する意義を脳の発達面より検討すべきと考えた。また、母乳は人工調製粉乳に比べ、認知能や知的発達をより促進するとの報告は、統計的手法に基づくもののみである (Golding J, et al Early Hum Dev 1997;49:sl 75-84, Horwood LJ, et al. Arch Dis Child 2001;84:F23-27)。川村ら (微量栄養素研究 1998;15:59-63) は、6週齢の成熟ラットではGM3 が経口後に、脳へ移行するこ

とを報告している。乳仔期-授乳期・21日齢前-のラットでは、初乳の主要ガングリオシドである、GD3を¹⁴C-標識したものを経口的に投与した後、大脳へ移行して、複雑型ガングリオシドへの分化、生合成の原料として使用され得るか否か、母乳の脳発達への意義を検討する上で、本研究はきわめて重要である。

2. 研究の目的

GD3はヒト母乳初乳と未熟な脳神経系に共通する主要ガングリオシドであり、シアル酸含有多糖類が両者に存在する事も指摘されている。この母乳中GD3が新生児乳児の大脳神経系の発達に直接関与しているかを¹⁴C-GD3の消化管からの吸収、移行実験、大脳内でのより複雑なガングリオシドへの生合成、更に、GM3やシアル酸含有多糖類の神経細胞への移行率の差異を検討し、脳神経系の分化、発育への作用と、脳の発達により適した人工調整粉乳開発、及び、脳神経細胞の正常発育における母乳ガングリオシドの役割を検討する予備研究とする。

母乳と未熟な脳神経系に共通するガングリオシド、GD3が母乳より新生児に吸収され大脳に移行し、脳の発育、分化、成熟にどのように関与しているかを検討する。

ヒト母乳中のガングリオシドや多糖類の分析を満期正常新生児を出産した母親の母乳や早期児や低出生体重児を出産した母親の母乳分析を行い、より生理的で脳神経系の発達により適した人工調整粉乳開発の予備データとする。

3. 研究の方法

¹⁴C-GD3と¹⁴C-GM3を新生児仔ラットの胃内に投与し、大脳への移行と、大脳内におけるより複雑なガングリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b等への生合成の推移と、それぞれのガングリオシドの差異、大脳神経系内への分布を神経病理学的にも検討した。

【¹⁻¹⁴C】acetic anhydrideにGD3、GM3を標識化し、¹⁴C-GD3、¹⁴C-GM3を作成する。それぞれを妊娠ラットより出生した、日齢が正確な新生仔ラットの生後1日目より、哺乳にて乳白色に拡大した胃内に¹⁴C-GD₃あるいは¹⁴C-GM₃を注射器を使用して直接、正確に適量を投与する。¹⁴Cガングリオシドの投与後そのラットを投与0、1、6、9時間後に順次、断頭し、ラット大脳への標識ガングリオシドの取込み、GM1、GD1a、GD1b、GT1b、GQ1bへの生合成代謝を、大脳ホモジネートより溶解抽出し、HPTLCと脳超薄切片の

autoradiographyにて神経病理学的に、その分布を検討した。前年度に引き続き¹⁴C-ガングリオシドの経口的脳内取込み、生合成代謝経路、脳神経細胞系への分布の研究を継続した。¹⁴C-GD3や¹⁴C-GM3は当研究室で標識、精製したものを使用し、妊娠Sprague-Dawleyラットを購入し、出産後より、定時の生後日数にそれぞれの標識ガングリオシドを新生児の胃内に注入して、定量的に脳内への移行、複雑ガングリオシドの生合成、代謝経路、脳神経系への分布を解析した。

4. 研究成果

¹⁴C-GD3、¹⁴C-GM3を自分で作製し、ラットの母乳に混入、新生児ラットの胃に直接注入し、大脳への移行、GD3、GM3それぞれよりGM1、GD1a、GD1b、GT1b等、複雑ガングリオシドへの生合成代謝を検討した。しかし、現時点で大脳への移行、生合成は確認されなかった。この理由として1. 実験手順そのものに問題、2. ¹⁴C-GD3、¹⁴C-GM3の投与量、濃度が低いため検出感度以下であった。3. ラットへの投与方法、4. ガングリオシドではなく、多糖類に¹⁴C-をラベルして検討すべきであった等を考え、実験を継続している。

ただ、同時に進行した早産児母体母乳のガングリオシドの特性と経時的変化については分析データをまとめNutrition 2011;27:998-1001に報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1) 欧文論文

①Uchiyama S, Sekiguchi K, Akaishi M, Anan A, Maeda T, Izumi T. Characterization and chronological changes of preterm human milk gangliosides. Nutrition 査読有. 2011;27:998-1001.

②Okazaki N, Takeguchi N, Sonoda K, Handa Y, Kakiuchi T, Miyahara H, Akiyoshi K, Korematsu S, Suenobu S, Izumi T. Detection of platelet-binding anti-measles and anti-rebulla virus IgG antibodies in infants with vaccine-induced thrombocytopenic purpura. Vaccine 査読有. 2011;29:4878-4880.

③Miyahara H, Okazaki N, Nagakura T, Korematsu S, Izumi T. Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. Clin Experiment Allergy 査読有.

2011;41:186-191

④ Sekiguchi K, Akiyoshi K, Okazaki N, Yamada H, Suzuki M, Maeda T, Suenobu S, Izumi T, Kang D. PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency : a case report. Clin Neurophysiol 査読有. 2010;121:800-801.

⑤ Miyahara H, Sonoda K, Okazaki N, Sekiguchi K, Kawano T, Akiyoshi K, Maeda T, Izumi T. Ictal bradycardia in an infant following surgical treatment for hemimegalencephaly. Pediatr Int 査読有. 2010;52:156-157.

⑥ Korematsu S, Yamamoto K, Nagakura T, Miyahara H, Okazaki N, Akiyoshi K, Maeda T, Suenobu S, Izumi T. The indication and effectiveness of low dose erythromycin therapy in pediatric patients with bronchial asthma. Pediatr Allerg Immunol 査読有. 2011;21:489-492.

⑦ Yamada H, Izumi T. Manifestation of neurofibromatosis 1 in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy. Pediatr Neurol 査読有. 2009;41:211-214.

⑧ Maeda T, Akaishi M, Shimizu M, Sekiguchi K, Anan A, Takano T, Imai K, Suenobu S, Korematsu S, Izumi T. The subclassification of schizencephaly and its clinical characterization. Brain Develop 査読有. 2009;31:694-701.

⑨ Korematsu S, Kosugi Y, Kumamoto T, Yamaguchi S, Izumi T. Novel mutation of early, perinatal onset myopathic type VLCAD deficiency. Pediatr Neurol 査読有. 2009;41:151-153.

⑩ Korematsu S, Miyahara H, Kawano T, Yamada H, Akiyoshi K, Sato K, Maeda T, Suenobu S, Izumi T. A relapse of systemic type juvenile idiopathic arthritis after a rubella vaccination in a patient during a long-term remission period. Vaccine 査読有. 2009;37:5041-5042.

2) 和文論文

① 泉 達郎、是松聖悟、高野智幸、秋吉健介. “小児科医のいない街”から“子どもを産み育てやすい街”への転換—過疎地域における小児医療・保健の役割と評価—. 小児保健研究、査読有、2011、70 巻記念号、88-90.

② 是松聖悟、秋吉健介、高野智幸、拝郷敦彦、末延聡一、前田知己、清田晃生、川野達也、関口和人、宮原弘明、半田陽祐、岡成和夫、岡崎直歩、前田美和子、和泉 啓、加藤里絵、武口真広、那須家栄、吉松 淳、檜原久司、泉 達郎.

地方における小児・周産期医療を担う医師確保対策調査. 日本小児科学会雑誌、査読有、2009;113:158-1592

3) 著書

① 泉 達郎. 熱性痙攣. 五十嵐隆編集、小児科診療ガイドライン—最新の診療指針—第2版、2011;220-222. 総合医学社、東京

② 泉 達郎. 小児の急性脳症、ライ症候群. 山口 徹、北原光夫、福井次矢編集、今日の治療指針—私はこう治療している—2011;1144-1146. 医学書院、東京

③ 泉 達郎. Alpers 病、肝・胆道系症候群 (I) —その他・胆道系疾患—、新領域別症候群 2010;13:535-538. 日本臨牀社、東京

④ 泉 達郎. 熱性けいれん (febrile seizures). 山口 徹、北原光夫、福井次矢編集、今回の治療指針—私はこう治療している—2009:1041-1042. 医学書院、東京

⑤ 泉 達郎. 神経疾患. 森川昭廣監修、内山聖、原 寿郎、高橋孝雄編集、標準小児科学第7版 2009:620-699、医学書院、東京

⑥ 泉 達郎. もやもや病. 内山 聖、安次嶺馨編集、小児救急アトラス 2009:297-298、西村書店、東京

[学会発表] (計1件)

1) Uchiyama S, Sekiguchi K, Akaishi M, Anan A, Maeda T, Izumi T. Characterization and chronological changes of preterm human milk gangliosides. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research

2) 他、国内学会・研究会、小児科、小児神経科、栄養代謝関係 計80回以上

[その他]

ホームページ「大分大学医学部小児科学講座」

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 達郎 (IZUMI TATSURO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80119891

(2) 研究分担者

是松聖悟 (KOREMATSU SEIGO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60264347

未延聡一 (SUENOBU SOUICHI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30253785

前田知己 (MAEDA TOMOKI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80264349

秋吉健介 (AKIYOSHI KENSUKE)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70305043

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：