

## 原 報

# 殺菌条件の異なる牛乳からカゼインホスホペプチドの調製と

## それらのマウス脾臓細胞の増殖に及ぼす影響

木原行啓・大谷 元

(信州大学農学部食品機能学研究室)

Preparation of casein phosphopeptides from different kinds of pasteurized milks and their action on proliferative responses of mouse spleen cells in cell cultures

Yukihiro Kihara and Hajime Otani

(Laboratory of Food Bioscience, Faculty of Agriculture, Shinshu University, Minamiminowa-mura 399-4598, Japan)

(Received February 28, 2000; Accepted April 10, 2000)

### Summary

Casein phosphopeptides were prepared from 12% trichloroacetic acid-soluble fractions of raw and different kinds of pasteurized cow's milks digested with porcine trypsin by ethanol precipitation. The yield of casein phosphopeptide preparation reduced by approximately 25% at maximum when cow's milk had been pasteurized at higher than 80°C. However, the elution profile of all casein phosphopeptide preparations from the pasteurized milks was very similar to that of casein phosphopeptide preparation from raw milk, and sequences 59-79 of  $\alpha$  s<sub>1</sub>-casein, 1-32 of  $\alpha$  s<sub>2</sub>-casein and 1-25 of  $\beta$ -casein were identified as major peptides in the casein phosphopeptide preparations. Moreover, all CPP preparations from the pasteurized milks had mitogenic effects on mouse spleen cells and enhanced proliferative responses of mouse spleen cells stimulated by lipopolysaccharide and concanavalin A.

### 要 約

市販飲用牛乳にトリプシンを作用させ、その12%トリクロロ酢酸可溶性分画に塩化カルシウムとエタノールを加えてカゼインホスホペプチド (CPP) を沈殿させた。一定量の牛乳タンパク質から生成する CPP 量は、牛乳の殺菌温度が80°C以上になると、生乳からの場合と比べて最大で約25%減少した。しかし、生乳および市販飲用牛乳から調製されたすべての CPP は、逆相高速液体クロマトグラフィーにおいて類似した溶出パターンを示し、 $\alpha$  s<sub>1</sub>-カゼインの59-79域、 $\alpha$  s<sub>2</sub>-カゼインの1-32域および $\beta$ -カゼインの1-25域に相当するペプチドが各 CPP 標品中の約半分、或いはそれ以上を占めた。また、調製したすべての

CPP は、マウス脾臓細胞に対してマイトージェン活性を示すとともに、B-およびT-リンパ球マイトージェンで誘導されるマウス脾臓細胞の増殖を顕著に促進した。

### 緒 言

近年、牛乳カゼインの消化物から種々の生物活性を有するペプチドが分離同定されており、それらの中でも最もよく研究されているペプチドの1つにリン酸化されたセリン残基を含むカゼインホスホペプチド (CPP) がある。CPP はカルシウムと結合する能力を有していることから、腸管内でカルシウムが無機リン酸と結合して沈殿するのを抑制し、カルシウムの吸収を促進する<sup>1)</sup>。そのために、CPP はカルシウムの吸収

促進を目的とした特定保健用食品素材として既に認可されているところである<sup>2)</sup>。

一方, Hata *et al.*<sup>3)</sup>は, 細胞培養系において牛乳  $\alpha$ <sub>1</sub>-カゼインの59-79域や牛乳  $\beta$ -カゼインの1-25域に相当するCPPがマウス脾臓細胞やウサギパリエル板細胞に対してマイトージェン活性を示すとともに, B-およびT-リンパ球のマイトージェンで誘導されるそれら細胞の増殖やマウス脾臓細胞による免疫グロブリンの産生を促進することを見出した。合わせて彼らは, 牛乳  $\alpha$ <sub>2</sub>-カゼインの1-32域や牛乳  $\beta$ -カゼインの1-28域のCPPをおよそ90%含む市販CPP標品である明治CPP-Ⅲにも同様の免疫促進活性があることを示した<sup>4)</sup>。さらに彼らは, CPP-Ⅲのマイトージェン活性は消化管内主要プロテイナーゼの影響は受けないが, 酸性ホスファターゼにより顕著に低下することを明らかにした<sup>4)</sup>。その後, Otani *et al.*<sup>5)</sup>は, オボアルブミンをタンパク質源として与えて腹腔内に $\beta$ -ラクトグロブリンを投与したマウスにCPP-Ⅲを経口的に与えると, オボアルブミンや $\beta$ -ラクトグロブリンに対する腸管の特異IgA量や総IgA量がCPP-Ⅲを与えない場合と比べて顕著に増大することを見出した<sup>5)</sup>。カゼインを経口的に摂取すると腸管内でCPPが生成することや, それらCPPは糞中に排泄されることは周知のところである<sup>6-8)</sup>。したがって, それらの報告は, 牛乳の摂取はカルシウムの吸収促進だけでなく, 腸管IgA応答の増強においても有効であることを示唆している。

通常われわれが購入している飲用牛乳には殺菌のための加熱処理が施されている。わが国で現在使用されている牛乳の加熱殺菌処理法としては, 低温保持殺菌法(LTLT, 62~65°C, 30分間), 高温短時間殺菌法(HTST, 75~85°C, 15~20秒間), 超高温殺菌法(UHT, 120~130°C, 2~3秒間)および超高温滅菌法(LL, 140°C, 2~3秒間)がある<sup>9)</sup>。牛乳の加熱は病原菌を殺すための重要な処理であるが, 加熱により一般にタンパク質は変性し, 凝集物を形成し, 生物活性を失う場合が多い。牛乳タンパク質の主要成分であるカゼインは, 熱に対して比較的安定なタンパク質であり, 100°C以下の加熱では際立った化学変化を起こさないが, 120°C以上の加熱によりカゼインミセルの凝集や凝固を起こすと言われている<sup>10)</sup>。そのために, われわれが通常飲用している市販牛乳の摂取においても,

生乳や単離カゼインを摂取した場合と同様に, CPPが生成するか, また, 生成したCPPにリンパ球の増殖促進活性があるかどうかを明らかにすることは牛乳の保健機能を考える上で重要な課題と考えられる。

そこで, 本論文では, 従来牛乳カゼインからCPPの調製に利用されている方法を各種殺菌条件の異なる牛乳に施し, CPPを調製し, それらCPPの化学的性質や細胞培養系におけるマウス脾臓細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

## 実験方法

### 1. 供試牛乳

生乳は長野県南箕輪村の酪農家から購入した。各種条件下で殺菌処理した牛乳は信州大学農学部周辺のスーパーで購入した。それらは, 63°C 30分, 65°C 30分, 80°C 15分, 120°C 2秒または140°C 3秒の処理を行ったもの各1種, 並びに125°C 2秒, 130°C 2秒または140°C 2秒の処理を行ったもの各2種である。なお, それら牛乳の容器にはすべて成分無調整牛乳と表示してあるものである。

### 2. 標準CPP

本論文で標準CPPとして使用した牛乳  $\alpha$ <sub>1</sub>-カゼインの59-79域のペプチドおよび牛乳  $\beta$ -カゼインの1-25域のペプチドは著者の1人, 大谷らが既報<sup>3,11)</sup>において調製したものである。また,  $\alpha$ <sub>2</sub>-カゼインの1-32域のペプチドは, Hirayama *et al.*<sup>12)</sup>がその多量の存在を示した市販CPP標品(CPP-Ⅲ, 明治製菓株式会社, 東京, 日本)から当研究室でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離精製し, ペプチドシーケンサによりその一次構造を確認したものである。

### 3. CPPの調製

CPPは, Manson and Annan<sup>6)</sup>の報告を参考にして次の方法で調製した。すなわち, 牛乳のpHを1N NaOHで7.2に調整し, トリプシン(豚脾臓由来, Sigma, St. Louis, USA)を牛乳の容器に表示してあるタンパク質重量の0.01%重量加えて, 37°Cで3時間反応した。続いて, 反応液と同容量の24%トリクロロ酢酸溶液を加え, 37°Cで20分, さらに室温で20

分放置した。放置後、4°Cで3000 rpm, 20分間の遠心分離を行い、上澄みを回収し、そのpHを3N NaOHで4.7に調整した。次いで、その溶液とその溶液の5%容量の20%塩化カルシウム溶液を混合し、さらに混合液と同容量の冷エタノールを加えて30分氷冷した。氷冷後、混合液を4°Cで3000 rpm, 20分間の遠心分離を行い、得られた沈殿を最初に用いた牛乳の40%容量の脱塩水に懸濁させ、1N NaOHでpH 7.5に調整しながら完全に溶解させた。次いで、その溶液をSPECTRA/PORR® CE膜(分画分子量1000, フナコシ株式会社, 東京, 日本)に注入し、水道水で一晩透析後、凍結乾燥し、CPPとした。また、この凍結乾燥重量をCPP量とした。

#### 4. リン酸の定量

CPP中のペプチドに共有結合しているリン酸(有機リン酸)量は、CPP標品中の総リン酸量から無機リン酸量を減じることにより求めた。なお、無機リン酸と総リン酸の定量はAllen<sup>13)</sup>の方法により行った。なお、リン酸量はCPP 1 mg中の $\mu\text{g}$ 量として表示した。

#### 5. 逆相高速液体クロマトグラフィー

逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)は、TSK-Gel ODS 80 T<sub>M</sub>カラム(6.0 mm ID×15 cm, 東ソー, 東京, 日本)を装着した高速液体クロマトグラフ(島津製作所, 東京, 日本)を用いて行った。なお、移動相には0.05%トリフルオロ酢酸を含む蒸留水とアセトニトリルを用い、最初の40分まではアセトニトリル濃度を5~40%のリニアグラジエントとし、その後の10分間はアセトニトリル濃度40~80%のリニアグラジエントとして展開した。流速は0.8 ml/minであり、ペプチドの測定波長は214 nmである。

#### 6. マウス脾臓細胞の培養

6週齢、雄、C3H/HeN系マウス(日本SLC株式会社, 浜松, 日本)を頸椎脱臼により屠殺し、脾臓を採取した。採取した脾臓を抗生物質(ペニシリン: 100 IU/ml, ストレプトマイシン: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 明治製菓株式会社, 東京, 日本)を含むCelgrosser-P(住友製薬株式会社, 東京, 日本) 5 mlに浸し、丁寧に

ほぐして細胞を浮遊させた。続いて、その細胞を同培地 5 mlを用いて4°Cで1200 rpm, 5分間の遠心洗浄を3回行った後、細胞数が $5.0 \times 10^6$  cells/mlになるようにCelgrosser-Pに懸濁し、マウス脾臓細胞浮遊液とした。なお、トリパンブルー染色による細胞の生存率は98%以上であった。

マウス脾臓細胞浮遊液100  $\mu\text{l}$ , 0.15 M NaClを含む0.01 Mリン酸緩衝液, pH 7.2, (PBS)に溶解したCPP溶液(最終濃度: 0~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10  $\mu\text{l}$ およびPBSに溶解したリポポリサッカライド溶液(LPS, Difco Laboratories, Detroit, USA: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはコンカナバリンA溶液(Con A, 和光純薬, 大阪, 日本: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10  $\mu\text{l}$ をマイクロプレートの各ウェルに入れ、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した。細胞の増殖はMTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide}法<sup>14)</sup>により測定した。各試料について5つのウェルを用いて測定し、それらのMTT値の平均値と標準偏差をt検定分析に供することによりCPP無添加の場合とCPPを添加した場合の統計的有意差の有無を判定した。

### 結果および考察

#### 1. 各種殺菌処理牛乳から調製されるCPP量

各種殺菌処理牛乳から調製されたCPP量を、牛乳タンパク質1 gから得られる量として示した結果をFig. 1に、また、それらCPP 1 mg中の総リン酸量、無機リン酸量および有機リン酸量を求めた結果をTable 1に示した。牛乳の殺菌温度が80°C以上になると、生乳やLTLT乳からの場合と比べて、調製されるCPP量は低下する傾向を示した。しかし、その低下割合は最大でも25%程度であった。また、それらCPP中の有機リン酸量も殺菌条件の違いや同じ殺菌処理条件でも商品の違いにより最大でおよそ25%程度低下した。

一般にCPPは、カゼインの消化液のpHを酸性にし、塩化バリウムや塩化カルシウムを加えた後、エタノールを加えると沈殿することが古くから知られている<sup>6,15)</sup>。最近、塩やエタノールを加える時のpHがアルカリ側でもCPPが得られ、アルカリ溶液から調製したCPPは酸性溶液からのものと比べてホスホセリン残基が少ないものも含むことが報告されている<sup>16)</sup>。

しかし、本実験では CPP の純度を上げるために、トリクロロ酢酸を12%濃度になるように加えた後、塩化カルシウムを加え、エタノールで沈殿させる古典的

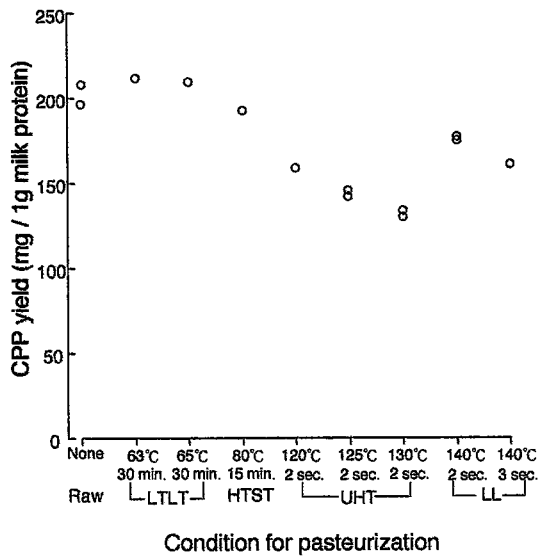


Fig. 1 Yields of CPP preparations from different kinds of pasteurized milks. Each value represents the mean for 3 time preparations.

な方法で CPP を調製した。上述したように調製されたペプチドには有機リン酸が含まれることからその主成分は CPP と考えられる。また、本実験結果から、われわれが通常飲用している総ての牛乳のトリプシン処理により CPP が生成するが、80°C以上で殺菌処理された牛乳からの生成量は生乳からの場合と比べて最大で約25%減少することがわかる。Burton<sup>10)</sup>は、カゼインミセルは100°C以上の加熱では不可逆的な構造変化を起こし、120°C以上ではカゼインミセルが凝集し巨大ミセルを形成することを報告している。一方、Zittle<sup>17)</sup>および Haque and Kinsella<sup>18)</sup>は、牛乳の75°C付近の加熱により SS 結合を介して  $\beta$ -ラクトグロブリンと  $\alpha$ -ラクトアルブミンとの間に複合体が形成し、さらに120°C以上の加熱になると  $\beta$ -ラクトグロブリンは  $\kappa$ -カゼインとの間に分子間 SS 結合を介して複合体を生じ、カゼインミセルの解離や脱リン酸を引き起こすことを示している。また Kauman<sup>19)</sup>は、カゼインミセルに沈着した  $\beta$ -ラクトグロブリンはキモシンなどのプロテイナーゼの作用を不完全にすることを示している。したがって、そのような現象が、殺菌牛乳から調製される CPP 量やその中の有機リン酸量が減少する要因となったものと考えられる。なお、140°C

Table 1 Phosphorus contents in CPP preparations

Condition for pasteurization	Number of samples	Total phosphorus content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ CPP)	Inorganic phosphorus content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ CPP)	Organic phosphorus content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ CPP)
Raw milk	2	30.5	11.4	19.1
		35.6	13.9	21.7
LTLT				
63°C 30 min.	1	29.6	10.6	19.0
65°C 30 min.	1	24.4	7.9	16.4
HTST				
80°C 15 min.	1	26.6	10.7	15.9
UHT				
120°C 2 sec.	1	23.1	10.5	12.6
125°C 2 sec.	2	25.5	13.1	12.4
		31.2	16.8	14.4
130°C 2 sec.	2	23.5	11.4	12.1
		24.4	7.6	16.8
LL				
140°C 2 sec.	2	29.6	12.5	17.1
		24.4	10.2	14.2
140°C 3 sec.	1	27.1	11.1	16.0

Each value represents the mean for 3 time analyses.

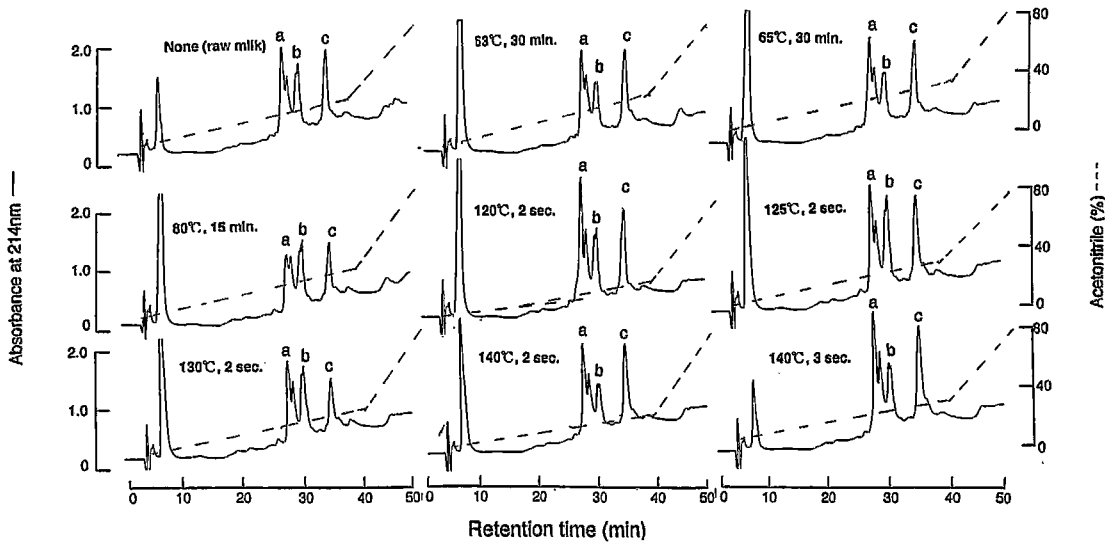


Fig. 2 RP-HPLC profiles of the CPP preparations from different kinds of pasteurized milks. Retention times are follows: a, 27.98~28.26; b, 30.45~30.94; c, 35.67~35.79.

で殺菌されたLL乳からのCPP量の方が120~130°Cで殺菌されたUHT乳からのものよりも多い傾向を示したが、その原因が原料乳の違いによるものなのか、それともその他の要因によるものなのかは本実験では明らかではなく、その点に関してはさらに検討を要するところである。

2. 各種殺菌処理牛乳から調製したCPP中の主要ペプチド

各種殺菌処理牛乳から調製したCPPの逆相高速液体クロマトグラムをFig. 2に、また、それらクロマトグラムでa, bおよびcと示したリテンションタイムが28分付近、30分付近および36分付近の主要ピークの割合を求めた結果をTable 2に示した。各CPPともに数個の大きなピークが検出され、a, bおよびcで示した3つのピークの占める割合は全体の45~67%であった。しかし、それら3つのピークの占める割合と殺菌条件との間に特定の関係は見られなかった。

一方、図には示していないが、本実験で使用した逆相高速液体クロマトグラフィーの条件下で、牛乳 $\alpha_{S1}$ -カゼインの59-79域、牛乳 $\alpha_{S2}$ -カゼインの1-32域および牛乳 $\beta$ -カゼインの1-25域のペプチドを溶出させると、それらのリテンションタイムはそれぞれ28分、

Table 2 Ratio of major peaks of the CPP preparations on RP-HPLC

Condition of pasteurization	Ratio of major peak (%)			Total (%) (a+b+c)
	a (27.98~28.26*)	b (30.45~30.94*)	c (35.67~35.79*)	
Raw milk	25.00	17.00	19.27	61.27
LTLT				
63°C 30 min.	19.44	12.03	18.04	49.51
65°C 30 min.	18.96	11.28	15.51	45.75
HTST				
80°C 15 min.	17.04	15.73	13.77	46.54
UHT				
120°C 2 sec.	24.57	13.15	14.74	52.46
125°C 2 sec.	20.23	16.52	16.51	53.26
130°C 2 sec.	19.79	16.28	14.40	50.47
LL				
140°C 2 sec.	23.55	12.84	19.91	56.30
140°C 3 sec.	27.90	15.60	23.72	67.22

\* Retention time (min)

30分および36分を示した。Ono *et al.*<sup>20)</sup>は、カゼインミセルにトリプシンを作用させると牛乳 $\alpha_{S1}$ -カゼインの59-79域や牛乳 $\beta$ -カゼインの1-25域のCPPが生成することを報告している。また、Hirayama *et al.*<sup>12)</sup>は、牛乳カゼインにトリプシンを作用させることによ

り調製した市販のCPP 標品 (CPP-III) 中の主要ペプチドは牛乳  $\alpha$ <sub>2</sub>-カゼインの1-32域と牛乳  $\beta$ -カゼインの1-28域であることを示している。筆者らの実験から、牛乳に直接トリプシンを作用させた場合に生成する主要 CPP は  $\alpha$ <sub>1</sub>-カゼインの59-79域、 $\alpha$ <sub>2</sub>-カゼインの1-32域および  $\beta$ -カゼインの1-25域であり、それらの CPP は牛乳の殺菌条件が異なっても生成され、それら3つのペプチドが調製される CPP 中のおよそ半分、或いはそれ以上を占めると結論づけられる。

### 3. 各種殺菌処理牛乳から調製した CPP のマウス脾臓細胞の増殖に及ぼす影響

各種殺菌処理牛乳から調製した CPP 存在下および非存在下でマウス脾臓細胞を48時間培養し、細胞の増殖状態を MTT 値として示した結果を Fig. 3 に示した。生乳から調製した CPP を添加した場合と比べて各殺菌処理牛乳から調製した CPP を添加した場合の MTT 値は低下したが、CPP 無添加の場合よりも明らかに高い MTT 値であった。すなわち、本結果は、すべての殺菌処理牛乳から調製した CPP はマウス脾臓細胞に対してマイトージェン活性を有することを示している。

そこで、生乳および最も低いマイトージェン活性を示した120°C 2秒の殺菌処理牛乳から調製した CPP の B-および T-リンパ球マイトージェンである LPS お

よび ConA<sup>21)</sup>で誘導されるマウス脾臓細胞の増殖に及ぼす影響を調べ、その結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。生乳および120°C 2秒の殺菌処理牛乳から調製した CPP はともに両マイトージェンで誘導されるマウス脾臓細胞の増殖を有意に促進し、それらの増殖促進活性に大きな違いは見られなかった。なお、図には示していないが、120°C 2秒以外の殺菌処理を施した牛乳から調製した CPP も全て B-および T-リンパ球マイトージェンで誘導されるマウス脾臓細胞の増殖

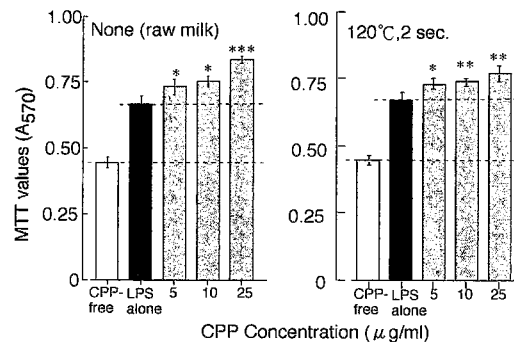


Fig. 4 Typical effects of CPP preparations from a raw milk and a pasteurized milk at 120°C for 2 seconds on proliferative responses of mouse spleen cells induced by lipopolysaccharide stimulation. Significant differences from each CPP-free culture at \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

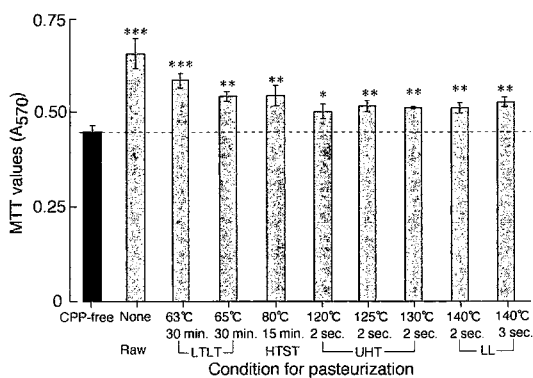


Fig. 3 Effects of the CPP preparations from different kinds of pasteurized milks on mouse spleen resting cells. Significant differences from each CPP-free culture at \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

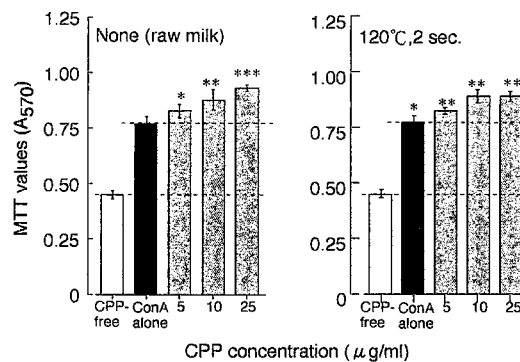


Fig. 5 Typical effects of CPP preparations from a raw milk and a pasteurized milk at 120°C for 2 seconds on proliferative responses of mouse spleen cells induced by concanavaline A stimulation. Significant differences from each CPP-free culture at \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

を顕著に促進し、牛乳の殺菌条件の違いによる際立った相違は見られなかった。すなわち、これらの結果から牛乳の殺菌条件が異なっても、それら牛乳のトリブシン処理により生じる CPP はリンパ球の増殖促進活性を維持していると結論づけられる。

以上のように本論文では、殺菌処理条件が異なる市販の飲用牛乳をトリブシン処理し、それらから CPP の調製と、調製された CPP の若干の化学的および生物学的特性づけを行った。その結果、現在わが国で使用されている殺菌処理牛乳からも生乳の場合と同様に CPP が調製されるとともに、一定量の牛乳タンパク質から調製される CPP 量は生乳からの場合と比べて最大でも25%程度しか低下しないことが示された。また、殺菌処理条件が異なっても調製された CPP 中のペプチドのおよそ半分は、 $\alpha$ s<sub>1</sub>-カゼインの59-79域、 $\alpha$ s<sub>2</sub>-カゼインの1-32域および $\beta$ -カゼインの1-25域に相当する CPP が占めていた。さらに、本実験で使用する全ての殺菌処理牛乳から調製した CPP は、B-およびT-リンパ球マイトージェンで誘導されるマウス脾臓細胞の増殖を促進した。筆者らは先に、腹腔内や皮内に $\beta$ -ラクトグロブリンを注射したマウスや仔猪に CPP を経口的に与えると、飼料タンパク質や注射した $\beta$ -ラクトグロブリンに対するIgA 応答や腸管の総IgA レベルが顕著に増大することを明らかにしている<sup>5,22)</sup>。また、カゼインを経口的に摂取すると腸管内で CPP が生成することや、CPP は未消化のまま糞中に排泄されることはよく知られたところである<sup>7,8)</sup>。したがって、牛乳を飲むことはカルシウムの腸管からの吸収を促進するだけでなく、腸管における免疫系の賦活にも寄与する可能性が強く示唆される。

## 謝 辞

本研究の一部は、文部省からの科学研究費（課題No. 10660258）の援助により行ったものであり、記して謝意を表す。

## 引用文献

- 1) 小野伴忠：酪農科学・食品の研究，43, A73 (1994)

- 2) 有原圭三：畜産の研究，52, 459 (1998)
- 3) I. Hata, S. Higashiyama and H. Otani: *J. Dairy Res.*, 65, 569 (1998)
- 4) I. Hata, J. Ueda and H. Otani: *Milchwiss.*, 54, 3 (1999)
- 5) H. Otani, Y. Kihara and M. Park: *Food Agric. Immunol.*, 12, 165 (2000)
- 6) W. Manson and W. D. Annan: *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 16 (1971)
- 7) H. Meisel and H. Frister: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, 1275 (1988)
- 8) T. Kasai, R. Iwasaki, M. Tanaka and S. Kiriya: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 26 (1995)
- 9) 小野伴忠：ミルクのサイエンス—ミルクの新しい動き，(社)全国農協乳業プラント協会，170 (1994)
- 10) H. Burton: *J. Dairy Res.*, 51, 343 (1984)
- 11) H. Otani, Y. Mine and A. Hosono, *Milchwiss.*, 42, 505 (1987)
- 12) M. Hirayama, K. Toyota, G. Yamaguchi, H. Hidak and N. Naito: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1126 (1992)
- 13) R. J. L. Allen: *Biochem. J.*, 34, 858 (1940)
- 14) T. Mosmann: *J. Immunol. Methods.*, 65, 55 (1983)
- 15) 斉藤安弘：ジャパンフードサイエンス，29, 21 (1990)
- 16) E. C. Reynolds, P. F. Riley and N. J. Adamson, *Anal. Biochem.*, 217, 277 (1994)
- 17) C. A. Zittle, M. P. Thompson, J. H. Custer and J. Cerbulis: *J. Dairy Sci.*, 45, 807 (1962)
- 18) Z. Haque and J. E. Kinsella: *J. Dairy Sci.*, 55, 67 (1988)
- 19) V. W. Kauman: *Milchwiss.*, 39, 259 (1984)
- 20) T. Ono, Y. Takagi and I. Kunishi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 16 (1998)
- 21) A. Nakamura, K. Nagai, S. Suzuki, K. Ando and G. Tamura: *J. Antibiotics*, 39, 1148 (1986)
- 22) H. Otani, H. Kitamura, M. Park, Y. Kihara, T. Oshida, S. Kusuhara and K. Sawada: *Milchwiss.*, 55, in press (2000)