

牛乳摂取による血漿中微量元素とアミノ酸の 濃度変動と複合体の分析

信州大学医学部保健学科検査技術科学 日 高 宏 哉
信州大学医学部医学科病態解析診断学 本 田 孝 行
信州大学医学部附属病院臨床検査部 山 内 一 由
信州大学医学部医学科病態解析診断学 勝 山 努

【要 約】

最近、生体微量元素が生活習慣病や消化器疾患など多くの疾患と関連していることが注目されている。牛乳はミネラルをはじめアミノ酸やビタミンなどを豊富に含有し、生体に必要な微量栄養素の摂取に適している。今回、牛乳の摂取による生体微量元素の吸収や血清中での分布や動態について、牛乳の摂取後に経時的に採血し、血漿中の生体微量元素およびアミノ酸の濃度変動およびその存在様式を検討した。

牛乳摂取により、血清中のカルシウムと無機リンは有意な増加を示したが、鉄は減少した。マグネシウムや銅は大きな変動はなかったが、亜鉛では摂取後30分後に増加する群と減少する群に分けられた。血清亜鉛は、マグネシウムと正の相関関係を示した。鉄や銅とも正の相関傾向にあったが有意ではなかった。血清を分子量約10,000の限外フィルターで高分子を除外したろ液中の亜鉛濃度は、牛乳摂取30分後に有意に減少 ($p < 0.05$) したのち、摂取前の濃度またはそれ以上に増加した。アミノ酸はメチオニンやフェニルアラニンなど摂取後は増加傾向を示したが、ヒスチジンやシステインでは減少傾向を示すものがあり有意ではなかった。血清中の亜鉛は、約75%はアルブミンと結合してい約20%は高分子蛋白と結合していたが、約5%はアミノ酸またはペプチドと結合しており、遊離型はほとんど検出されなかった。

Key words：アミノ酸、生体金属、アミノ酸分析、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)、
原子吸光分析、クロマトグラフィー

【はじめに】

生体微量元素の重要性は古くから認識されているが、最近になって生活習慣病や消化器疾患など多くの疾患の発症原因の追求や経静脈性高栄養法などの治療効果の改善のために生体微量元素の測定法や臨床的意義が注目されている。生体微量元素は血清中では比較的濃度範囲が狭く調節されており、不足分を補うためや過剰摂取を避けるには、摂取量ではなく吸収量や生体での存在様式が問

題となる。

牛乳は優れたミネラル源であり、アミノ酸やビタミンなども豊富で生体に必要な微量栄養素の摂取に適している。しかし、牛乳のカルシウムは、亜鉛やマグネシウムの吸収に抑制的に働くとされており、またイオンとして単独で存在する場合とアミノ酸との複合体では腸壁を經由しての吸収に差があることが報告されている。そのため、微量元素の化学形および共存する成分を考慮することが、正確な栄養摂取の評価に重要である。

本研究では、牛乳の摂取負荷により、生体金属の吸収と体内での動態とアミノ酸との相互作用を検討するにより、微量元素およびアミノ酸の生体機能におよぼす影響を明らかにすることである。今回、牛乳の摂取後に経時的に採血し、血漿中の生体微量元素およびアミノ酸の濃度変動およびその存在様式を検討した。

【倫理的配慮】

本研究の倫理的配慮について、以下に示す手続きにより行なった。

- 1) 研究計画書の作成および共同研究者と研究手順の打ち合わせを行なった。
- 2) 信州大学医学部倫理委員会に研究課題「牛乳摂取による血漿中微量元素とアミノ酸の濃度変動と複合体の分析」を申請し、承認された。(承認番号645号)
- 3) ボランティアの被験者に研究内容、および疫学的倫理指針に則り研究を行なうことを説明書にて説明したのち、承諾を紙面(同意書)にて得た。

【材料、方法】

1. 材料

牛乳：通常脂肪牛乳の明治の「おいしい牛乳」500mlパック（無脂乳固形分8.3%以上、脂肪分3.5%以上、生乳100%）を用いた。

2. 対象

実験は、28才から51才の健常人男性のボランティアで、上述の研究内容の説明を受け同意書による承諾を得た11名について行なった。

3. 牛乳負荷試験のプロトコール

- 1) 食後2時間以上経過後、ボランティアの健常人に牛乳500mlを摂取させた。
- 2) 摂取前と、摂取後30分、60分、120分に採血(プレーンおよびヘパリン含有採血管)を行った(図1)。

- 3) ヘパリン含有血液は、直ちに4℃で3000rpm、10分間遠心分離、血漿を得た。プレーン採血間血液は、凝固した後3000rpm、10分間遠心分離し血清を得た。一部は冷凍保存し、残りは冷蔵保存した。

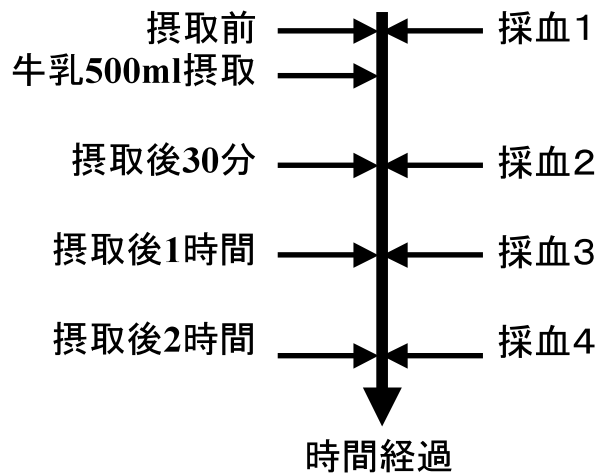


図1. 牛乳負荷試験プロトコール

4. 測定方法

- 1) 生化学項目および生体金属は、生化学自動分析装置BioMajesty JCA-BM2250（日本電子）により測定した。酵素はJSCC法（アミラーゼはBen-G5-PNP法）、総蛋白はビウレット法、アルブミンはBCG法、グルコースはHK法、リン脂質、コレステロール、トリグリセライド、HDL-C、LDL-Cは酵素法およびホモジニアス法、電解質はISE希釈法、CaはOCPC法、iPとMgは酵素法、Feはニトロソ-PSAP法、CuはTAMSMB比色法で測定した。
- 2) 亜鉛濃度は、原子吸光度分析装置Z-5000（日立製作所）を用いて測定した。血清200ulに10ul濃硝酸を加え、混和した後20mM硝酸を1.5ml添加し、60℃で10分放置したのち、3000rpm、10分間遠心分離した。上清中の亜鉛をフレイム法にて測定した。
- 3) アミノ酸組成は、ガスクロマトグラフィー質量分析計GC/MSアミノ酸分析装置で測定した。
- ① 試料の調整：試料の調整には、EZ：faast（Phenomenex、CA）を用いた。ガラス試験管に血漿100μlと内部標準液100μlを分取し混合した。混合試料をSPEチップ（吸着用ゲル）に通した後、洗浄液を吸い上げて通しゲルを洗浄した。次いで、溶出液でアミノ酸を溶出した後、有機誘導体試薬を加え混和した後約1分間放置した。続いて抽出試薬を添加して有機溶媒層にアミノ酸誘導体を抽出し、窒素下で乾固した後に有機溶媒に再溶解した。
 - ② GC/MS装置およびカラム：GC-MSは、GC部はGC-2010、MS部はGCMS-QP2010、オートインジェクターはAOC20i（ともに島津製作所）を用いて、ヘリウムをキャリアガス（1.1ml/min）として分析した。キャピラリーカラム：ZB-AAA アミノ酸分析GCカラム（長さ：10m、内径：0.25mm）を用いた。

③ GC/MS分析条件

GC分析の昇温プログラムはオープン温度を110.0℃から320℃まで30℃/minで昇温させて分析した後、MS Source 240℃、MS Quad 180℃、50-450 m/zでアミノ酸の質量を測定した。

④ GC/MSによるアミノ酸分析

標識した遊離アミノ酸試料を、オートインジェクターにセットし、GC分析の昇温プログラムに従い、アミノ酸分析を行なった。アミノ酸の同定は、各ピークを構成するイオン質量から行なった。

- 4) フィルター膜による血清試料の分画は、Microcon遠心式フィルターユニットYM10 (Millipore, MA) を用いて行なった。血清試料を添加した後、マイクロチューブ遠心機により10000rpm、60分間遠心分離し、ろ液を分析に用いた。Microcon遠心式フィルターユニットYM10は、限界分子量は約10000Daで、アルブミン以上の分子量の蛋白はほぼ100%除外できた。
- 5) ゲルろ過法による分画は、FPLC (Pharmacia Biotech) システムを用いて行なった。カラムはSuperose 6 BおよびSuperdex Peptide PC3.2/30ゲルカラムを用いた。試料を添加したのち、リン酸緩衝液 (PBS) を用いて0.5ml/minで溶出した。各分画は、上述した原子吸光分析法により亜鉛濃度、GC/MSアミノ酸分析システムによりアミノ酸分析を行なった。

表1 生化学データ

	h	mean	SD		h	mean	SD		h	mean	SD			
LD	0.0	136.0	22.6		PL	0.0	216.9	31.1	iP	0.0	3.95	0.57		
	0.5	137.3	20.3			0.5	221.1	29.2		**	0.5	4.23	0.59	***
	1.0	136.2	20.4			1.0	220.3	29.3			1.0	4.59	0.61	***
	2.0	138.1	18.5			2.0	221.8	28.2		*	2.0	4.95	0.47	***
ALP	0.0	201.4	39.8		TG	0.0	133.6	64.6	Ca	0.0	9.65	0.23		
	0.5	202.5	39.8			0.5	136.0	67.4			0.5	9.72	0.22	
	1.0	201.5	38.9			1.0	138.3	63.7			1.0	9.85	0.20	***
	2.0	201.4	38.0			2.0	152.8	57.4			2.0	9.95	0.23	***
r-GT	0.0	36.5	33.3		TC	0.0	195.9	28.1	Mg	0.0	2.09	0.18		
	0.5	37.1	33.7			0.5	199.5	27.2		**	0.5	2.12	0.17	
	1.0	37.5	33.6	*		1.0	198.2	26.6		*	1.0	2.09	0.16	
	2.0	37.5	34.9			2.0	198.5	26.6			2.0	2.09	0.16	
AMY	0.0	96.1	24.9		HDL-C	0.0	54.7	7.8	Cu	0.0	97.5	12.3		
	0.5	96.8	25.5			0.5	55.7	8.0			0.5	97.9	11.5	
	1.0	96.3	26.7			1.0	55.0	8.3			1.0	97.1	10.7	
	2.0	95.9	26.3			2.0	55.1	8.0			2.0	96.5	10.2	
CHE	0.0	334.5	43.8		LDL-C	0.0	120.4	23.1	Fe	0.0	97.7	22.6		
	0.5	338.6	45.7	*		0.5	122.5	22.9		*	0.5	96.6	24.6	
	1.0	337.0	45.5			1.0	121.5	22.5			1.0	94.0	23.7	
	2.0	336.1	43.6			2.0	121.6	22.7			2.0	89.5	24.8	*
TP	0.0	7.44	0.39		Na	0.0	142.1	1.0	Zn	0.0	968.9	110.1		
	0.5	7.56	0.36	*		0.5	142.1	1.2			0.5	964.4	81.9	
	1.0	7.50	0.30			1.0	142.2	1.3			1.0	932.6	76.8	
	2.0	7.47	0.31			2.0	141.5	0.9		*	2.0	902.7	89.8	
ALB	0.0	4.53	0.25		K	0.0	4.02	0.33	Zn (D-group)	0.0	1020.9	116.2		
	0.5	4.59	0.23	*		0.5	3.99	0.29			0.5	939.3	94.1	*
	1.0	4.58	0.22			1.0	4.10	0.24			1.0	906.5	88.4	*
	2.0	4.59	0.26			2.0	4.04	0.19			2.0	861.9	63.9	*
Glu	0.0	101.4	11.8		Cl	0.0	104.2	0.9	Zn (I-group)	0.0	925.6	92.0		
	0.5	90.3	20.4			0.5	103.8	1.2			0.5	985.3	72.0	***
	1.0	91.5	10.1			1.0	103.7	1.1			1.0	928.5	57.3	
	2.0	96.6	9.5			2.0	103.2	1.3		*	2.0	936.6	99.0	

n = 11 (Zn: Dgroup=5, I-group=6), *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

【結 果】

1. 牛乳負荷摂取による生化学データの変動

通常脂肪牛乳摂取前、と摂取後30分、1時間、2時間後の生化学データの平均値と標準偏差 (mean ± SD, n = 11) を図2に示した。摂取前と摂取後の平均値を比較した結果、酵素項目においてはr-GTの1時間値とCHEの30分値が有意な増加 (p < 0.05) を示した。また、TPとALBも30分値が有意な増加 (p < 0.05) を示した。脂質では、リン脂質と総コレステロールの30分値が有意な増加 (p < 0.01) を示した。TGとHDL-Cは変動がなく、LDL-Cの30分値が有意な増加 (p < 0.05) を示した。

ミネラルでは、Na⁺とCl⁻の2時間値で有意な減少 (p < 0.05) を示したが、濃度としては約1mEq/lの減少であった。無機リンとカルシウムは、摂取後の時間経過とともに有意な増加 (p < 0.001) を示した。一方、鉄イオンは減少傾向を示し、2時間値で有意な差 (p < 0.05) を認めた。マグネシウムおよび銅イオンは、有意な差はなかった。

亜鉛においても全体の平均値としては、有意な差が認められなかった。しかしながら、30分値

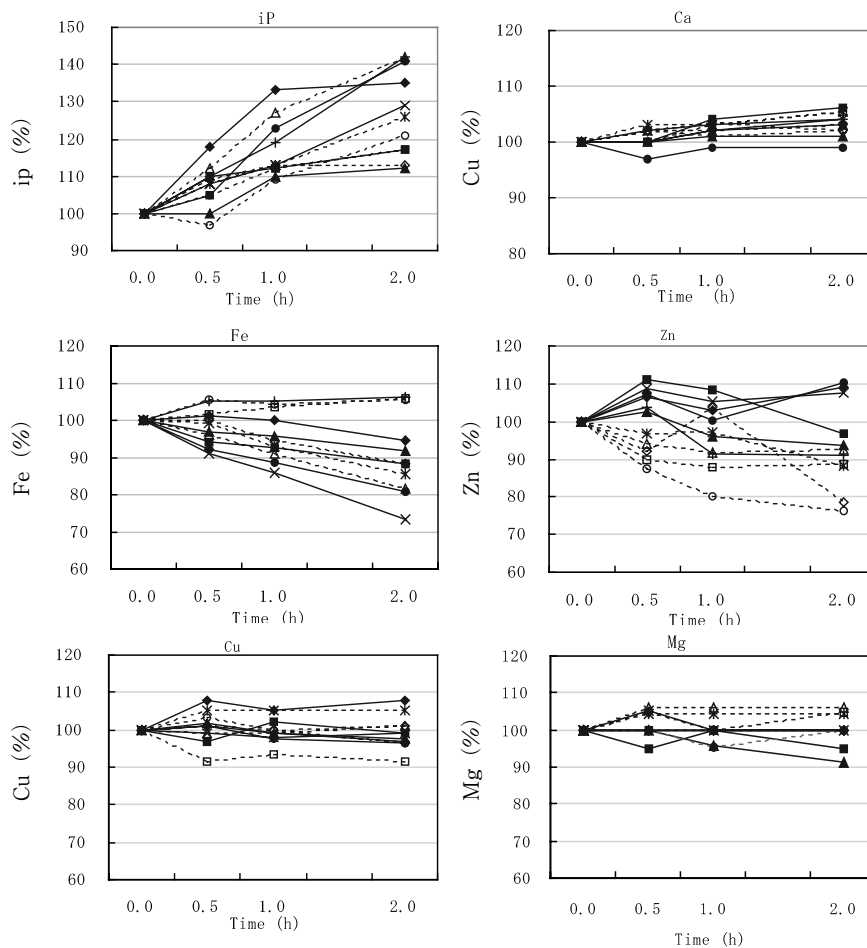


図2 血清中金属濃度の相対的変動

で摂取前に比べて濃度が減少する群（Dグループ；n=5）と増加する群（Iグループ；n=6）に分類することができた。そこで両群で平均値の変動を検討した結果、減少群では時間経過とともに有意な減少（ $p<0.05$ ）を示し、増加群では30分値で有意な増加（ $p<0.001$ ）を示した。図3

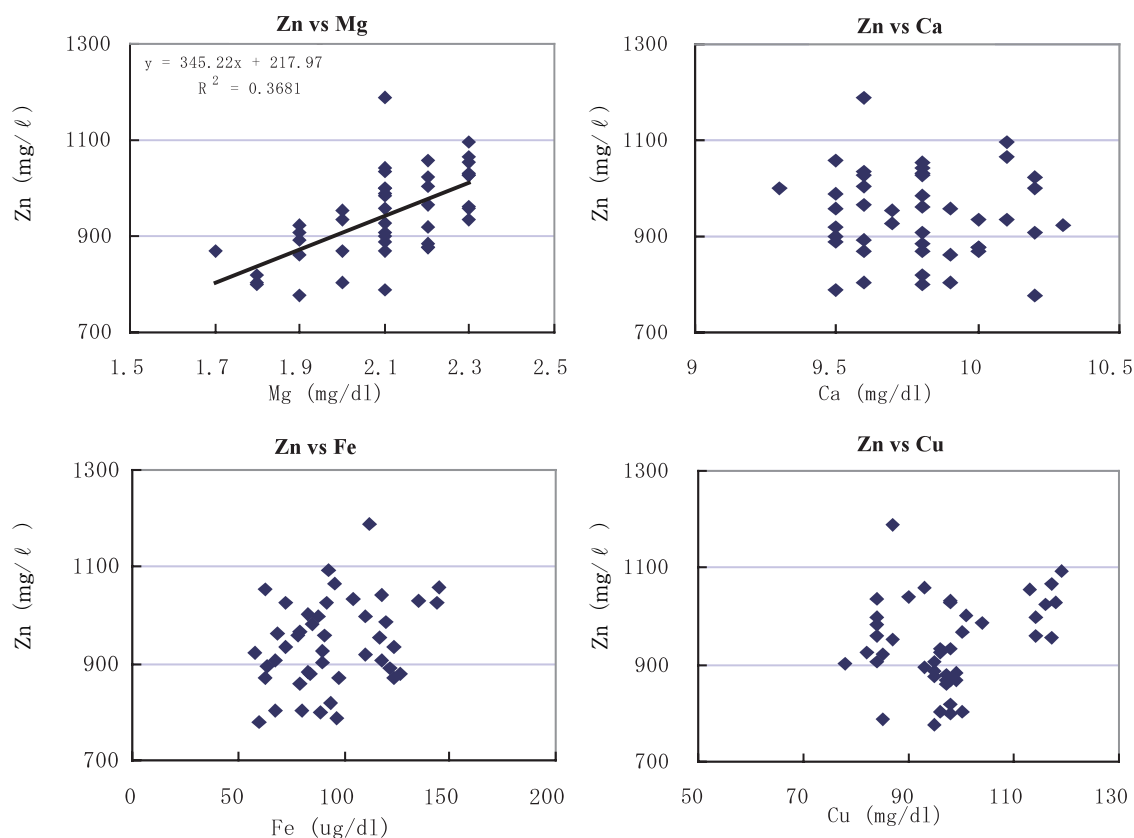


図3 血清中金属濃度の相関関係

に金属イオンの相対的な変動を示した。

2. 亜鉛と他の金属イオンとの関係

亜鉛濃度の変動が他の金属イオンと関連するか検討した。亜鉛は、マグネシウムと正の相関関係（ $r^2=0.3681$ ）にあったが、鉄とは正の相関傾向を示したが有意差はなく、他のイオンとは相関性も認められなかった。

3. 血清ろ液中亜鉛濃度の変動

血清中亜鉛は血清中では大部分が大分子の蛋白と結合して存在している。そこで、小分子と結合している、または遊離の亜鉛濃度を測定するために、排除限界が約10,000Daの限外ろ過膜を用いて血清をろ過し、ろ液中の亜鉛濃度を原子吸光度計で測定した。摂取後30分後では、有意に減少（ $p<0.05$ ）し、その後亜鉛濃度は増加し、多くは摂取前より増加する傾向にあった（図4）。

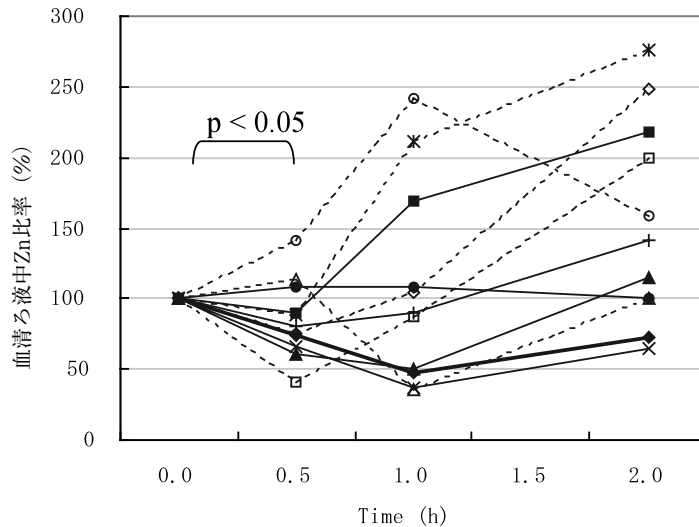


図4. ミルク負荷試験による血清ろ過液中亜鉛の相対的変化

4. アミノ酸の変動

亜鉛との結合性と関連するアミノ酸について、摂取による変動を検討した。摂取後、メチオニンは有意に増加した ($p < 0.05$)。総亜鉛の増加群 (グラフ中の実線) と減少群 (グラフ中の破線) を比較した結果、増加群でメチオニンは有意に増加した ($p < 0.05$) が減少群では有意差はなかった。ヒスチジンは、メチオニンと同様な変動傾向を示したが、統計的には有意差はなかった。フェニルアラニンなどはメチオニンと同様増加傾向を示したが、2群での差はなかった。一方、システインは減少傾向を示したが、有意差はなかった (図5)。

5. ゲルろ過クロマトグラフィーによる亜鉛の分布

血清蛋白のSuperrose 6 Bを用いたゲルろ過クロマトグラフィー分画中の亜鉛濃度パターンを図6に示した。約75%はアルブミン分画に存在し、20%がマクログロブリンなどの高分子分画に存在した。残り数%が低分子分画 (チューブNo.39-41) に存在した (図6)。

次いで、低分子分画の詳細な分画を検討するために、分子量約10,000の限外ろ過量のフィルター膜で血清をろ過した後、ペプチド用カラムを用いて検討した結果、アルブミン分画には亜鉛は存在しておらず、亜鉛は遊離アミノ酸より分子量が大きい分画に存在し、約300~700Da付近に分画された (図7-A)。図中の矢印は、標準物質の溶出位置を示した。亜鉛のピーク分画 (分画33, 34) では、ヒスチジンが有意に高値であったほか、アラニン、グリシン、イソロイシン、アスパラギン、メチオニン、システインが多く含まれていた。分画40以降は遊離アミノ酸分画であった。

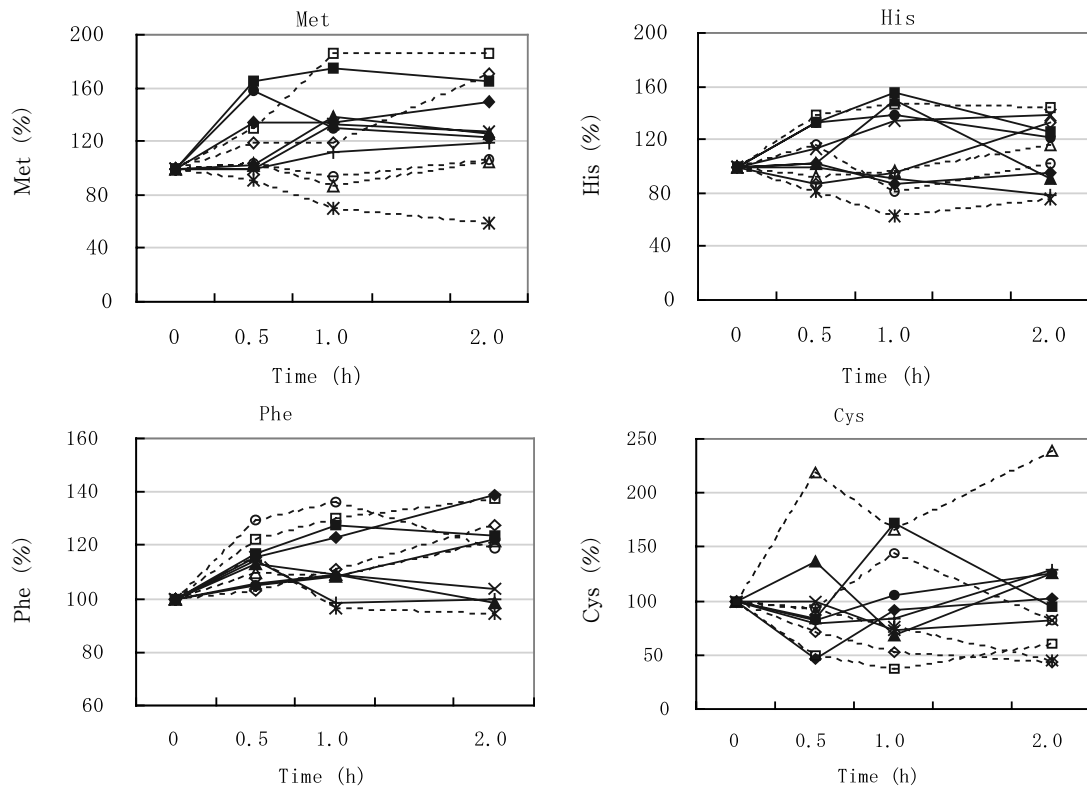


図5. 血清中アミノ酸の相対的変動

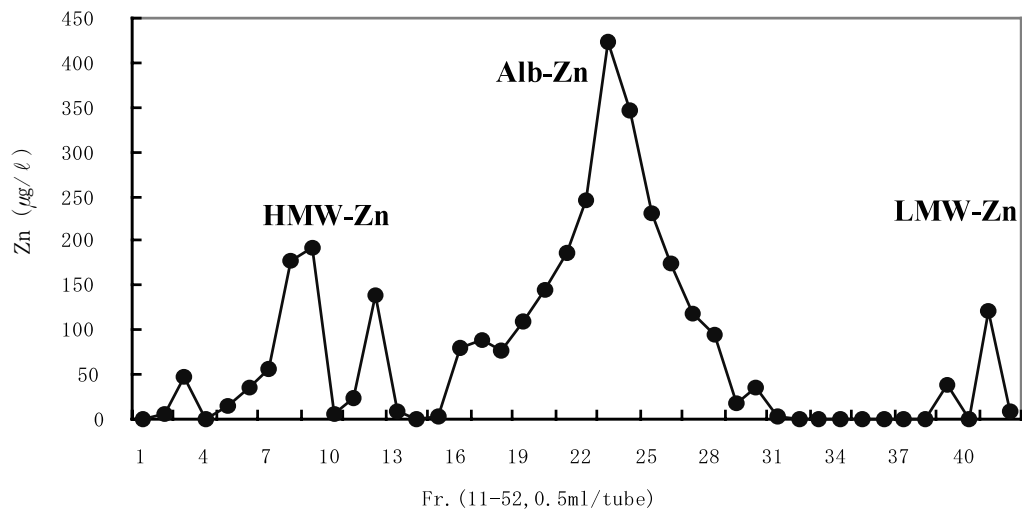


図6. Superose6(FPLC)による血清中亜鉛の分布

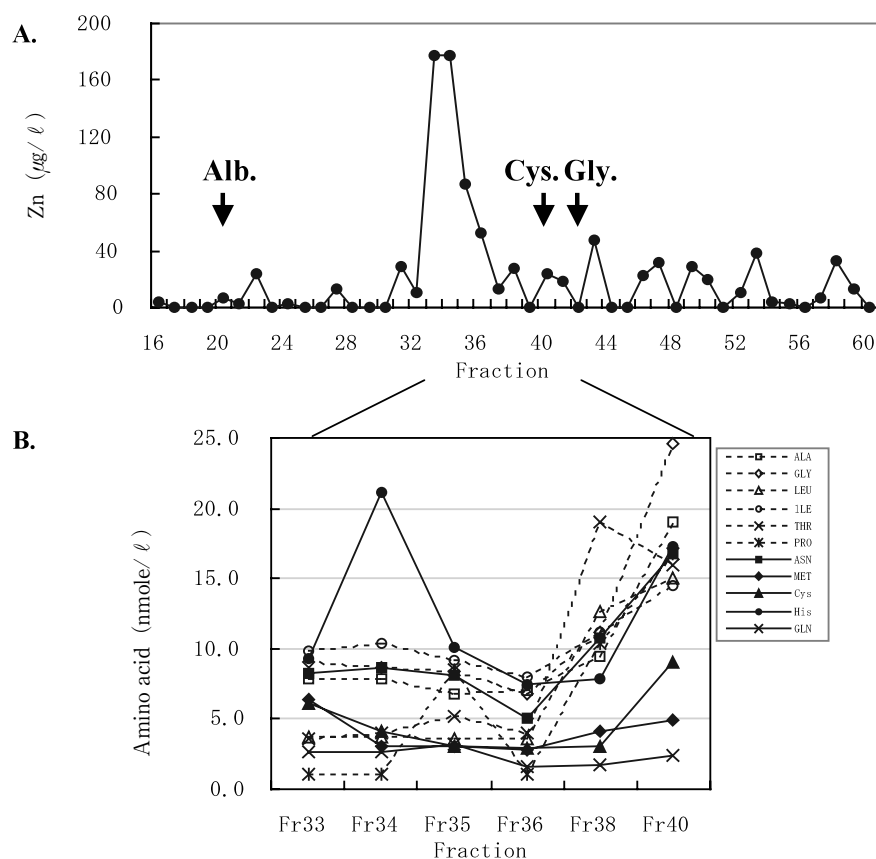


図7. Peptide column (FPLC)による血清ろ液中の亜鉛とアミノ酸の分布
panel A: 亜鉛分画、panel B: アミノ酸分画

【考 察】

牛乳の摂取後の生体微量元素およびアミノ酸の血清内での動態について検討した。

牛乳の摂取により、牛乳水分による血清成分の希釈はほとんど認められず、r-GTやCHE、TP、Alb、脂質などが若干増加したが、30分から1時間の間の一過性であった。しかし、無機リンとカルシウムは経時的に血清濃度が増加しており、牛乳成分の吸収による増加だけでなく、組織、細胞間との相互作用が引き起こされていると考えられた。

無機リンとカルシウム以外の他の金属イオン単独では有意な変動はなかったが、亜鉛は摂取後30分で増加する群と、摂取後経時的に減少する群に分類できた。亜鉛濃度の変動はマグネシウム濃度と関連しており、関連があるといわれている銅イオンとは有意差はなかった。亜鉛の減少群の一例で、15分値も測定したが同様な動態であった。これは、牛乳摂取により血清中の総亜鉛の一部は、末梢組織や細胞または赤血球や白血球、血小板などとの相互作用を示した結果と考えられた。血清の限外フィルターろ過液中での亜鉛濃度は、30分値でわずかに減少するがその後は増加傾向にあった。約95%が血清蛋白と結合していることから、血清蛋白間での相互作用もあり、血清中で蛋白との結合も調整されていると考えられた。

血清中の亜鉛は、遊離型ではほとんど検出されず、アミノ酸または低分子ペプチドと結合してい

ると考えられた。ゲルろ過クロマトグラフィーでの亜鉛分画ではヒスチジン含量が多く、メチオニンやシステインなど含硫アミノ酸が存在していた。亜鉛は含硫アミノ酸との親和力も強いことから、低分子型亜鉛は緩やかな結合をしていると考えられた。

蛋白代謝および脂質代謝に重要な働きをしているメチオニン、ホモシステイン、システインなど含硫アミノ酸の代謝には、葉酸、ビタミンB6、B12などのビタミンが必須である。含硫アミノ酸はポリペプチドとも強い親和性があり一方、核酸やタンパク質の合成やタンパク質分解酵素に関与する亜鉛なども強い親和力を有している。その結果、含硫アミノ酸は血漿中や細胞中での存在様式が多彩で、微量元素との相互作用が代謝機序に重要な役割を果していると考えられる。微量元素、アミノ酸、ビタミン、ポリペプチドの密接な相互作用が吸収や排泄機構に関与していると考えられるが、その機序や機能はまだ十分に明らかにされていない。現在、これらの存在様式について、質量分析装置を用いて検討中である。

【結 語】

牛乳摂取により、血漿中のCaとiPの経時的な増加と亜鉛濃度の変動およびメチオニンなどのアミノ酸濃度の変動が認められた。血漿中での生体金属やアミノ酸の変動は牛乳成分の吸収による影響だけでなく、血漿中と組織、細胞、血球間で微量成分の相互作用が引き起こされていると考えられた。

【謝 辞】

信州大学名誉教授武富 保先生に深く感謝致します。

【参考文献】

- 1) 吉田政彦；マグネシウム(Mg)－正常値、摂取量、腸管でのMg吸収、尿中Mg排泄、内分泌的調節－、(1990) 臨床検査 Vol.34-No.11、p.1307～1310.
- 2) 池田 実、富田 寛；亜鉛(Zn)－生理、代謝、吸収、排泄、亜鉛酵素－、(1990) 臨床検査 Vol.34-No.11、p.1322～1325.
- 3) 朝倉 均；診療ガイドラインレビュー 4、炎症性腸疾患、(2002) 日本内科学会雑誌、Vol. 91-2、p.692-698. 2002

- 4) 大谷 元；ミルク蛋白質の消化により生じる生体防御ペプチド、(2004) FFI journal、Vol. 209-2, p.112-120.
- 5) 清水 章、中西豊文ら；検査部の臨床研究、質量分析を利用した臨床科学分析、(1999) 臨床病理 特集第109号、p.116-125
- 6) 糸川嘉則、五島孜朗編集；第1章 金属元素の必要性、第6章 亜鉛、銅の摂取の現状、(1994) 生体内金属元素、光生館、p.1-5、p.97-119
- 7) 荒川泰行、竹内重雄編著；II 消化器疾患と微量金属代謝、V 消化器疾患における血中・尿中微量金属測定とその解釈、(1990) 微量金属と消化器疾患。新興医学出版社、p.4-14、p.149-154
- 8) Sengupta S, Chen H, et al; Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine, (2001) J.Biol.Chem, Vol.276, 30111-30117. 2001