

牛乳摂取によるリン脂質分子種およびリゾリン脂質の血清中分布

代表	信州大学医学部保健学科検査技術科学	日高	宏哉
共同研究者	信州大学医学部病態解析診断学	本田	孝行
	信州大学病院臨床検査部	山内	一由
	信州大学医学部保健学科	本郷	実

Key words : リン脂質、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、質量分析

【要約】

リン脂質はリポ蛋白の主要構成成分であるが、最近では種々の機能を持つ機能性脂質であることが注目されている。牛乳摂取による脂質の吸収、代謝を検討するため、健常者男性ボランティア12名に500mlの市販牛乳を摂取させ、摂取前、摂取後30分、1時間、2時間の血清脂質濃度を測定した。次いで摂取前、摂取後2時間のリポ蛋白分画をおこない、リポ蛋白特にリン脂質(PL)リッチな高比重リポ蛋白(HDL)中のPLを構成する脂肪酸側鎖の異なる分子種およびリゾ体の分布を検討した。血清PL、総コレステロール(TC)は1時間値、ホスファチジルコリン(PC)は1時間値、2時間値で有意に増加したが、スフィンゴミエリン(SM)は30分値、1時間値、2時間値で有意に減少した。また2時間値では、リン脂質濃度は摂取前に近い濃度に戻っていたが、被験者の血清トリグリセライド(TG)濃度に関連して、各リポ蛋白分画の粒子サイズの変化が検出された。このとき、脂肪酸側鎖の異なるPC分子種の比率およびPCとリゾ体の比率の変化が認められた。健常者の牛乳摂取により、リポ蛋白中のリン脂質濃度、リン脂質亜分画およびその構成分子種は大きく変化をしており、その変化は被験者の血清TGすなわちTG代謝の差により異なっていることが見いだされた。

【はじめに】

リン脂質は、細胞膜や血清リポ蛋白の主要構成成分であり、ホスファチジルコリン(PC)とスフィンゴミエリン(SM)が細胞膜外層の主成分である。最近、リン脂質およびその水解物のリゾ体が、脂質メディエーターとして脂質代謝だけでなく蛋白代謝や細胞の機能に重要な働きをしていることが注目されている。また、牛乳にはリン脂質が約1%含まれており、動物実験で牛乳リン脂質が血清コレステロール濃度の低下効果を有することなどが報告されている。しかし、ヒトにおいて、牛乳リン脂質の摂取効果の判定や摂取によるリン脂質の存在様式や生理的機能については、まだ十分な情報を得ていない。

吸収された脂質は、カイロミクロン(CM)として血液中に分泌され、リポ蛋白リパーゼ(LPL)により水解され、CM-レムナントとして肝臓に速やかに取り込まれる。以前我々は、牛乳摂取試

験において、摂取後 30 分でリン脂質とコレステロールが有意に上昇することを報告した。コレステロールは LDL 分画がわずかに上昇したが、リン脂質の血清リポ蛋白中の分布は不明であり、リン脂質構成脂肪酸の組成の変化も明らかでない。

本研究の目的は、牛乳の摂取による吸収されたリン脂質の血漿リポ蛋白中の分布、リン脂質の分子種（脂肪酸組成）の分布を分析し、リン脂質代謝経路を明らかにすることである。そのため、牛乳摂取によるリン脂質の血漿リポ蛋白中の分布を時間経過で検討し、さらに、リン脂質の分子種（種類と側鎖脂肪酸組成）の分布を検討した。

【倫理的配慮】

本研究の倫理的配慮について、信州大学医学部倫理委員会より承認された（承認番号 1170 号）。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

牛乳は市販の通常脂肪牛乳「おいしい牛乳」（無脂乳固形分 8.3%以上、脂肪分 3.5 %以上、生乳 100%）（明治牛乳、東京）を用いた。コレステロール、TG 測定試薬は、第一化学薬品（現セキスイメディカル）、PL 測定試薬は和光純薬から得た。クロロホルム、メタノールは和光純薬から得た。PC および SM 測定の試薬は、日高ら（文献 8）の試薬を用いた。質量分析のマトリックス試薬は 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (2,5-DHB; Sigma) を用いた。

2. 対象

試料は、23 才から 47 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 12 名について行なった。

3. 方法

1) 牛乳摂取試験のプロトコール

牛乳摂取試験のプロトコールを図 1 に示した。食後 4 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。摂取前と、摂取後 30 分、1 時間、2 時間後に採血（ブレーン採血管）を行った。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。

2) 分析方法

(1) 脂質定量

血清脂質は、マイクロプレートを用いた測定系で測定した。血清中 TG、コレステロール、PL の測定は、メーカー指定のプロトコールに従い、分注量をマイクロプレートに適合するように若干改変して測定した。下記に示す FPLC 分画の脂質は、測定試料を血清の 10 倍にして

測定した。PC と SM は日高らの方法（文献 8）により測定した。

(2) ゲル濾過クロマトグラフィー

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 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。分画 14-19 付近に超低比重リポ蛋白 (VLDL) とカイロミクロンレムナント (CMr) 分画、分画 20-26 付近に低比重リポ蛋白 (LDL)、分画 27-38 付近に高比重リポ蛋白 (HDL) が分画された。各分画の脂質をクロロホルム/メタノール混液 (C/M 2:1 v/v%) で脱脂後、質量分析を行った

(3) 質量分析法によるリン脂質組成分析

有機溶媒による抽出脂質試料 1 ul (C/M 2:1 v/v%) と 2,5-DHB マトリックス溶液 (10mg/ml, C/M 2:1 v/v%) 1 ul を混和し、その混合試料 1 ul を MALDI-TOF-MS のサンプルプレートに添加して、自然乾燥させた。MALDI-TOF-MS 分析装置は Voyager DE STR (3.0m 飛行チューブ長)、解析は DE-workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を用いた。

(4) 血清脂質濃度の変化の評価

血清脂質濃度の変化は、摂取前の濃度に対する摂取後の濃度の変化を 1 標本 t 検定 (関連 2 群の差の検定) で比較した。

【結 果】

1. 健康ボランティア被験者 12 名の血清脂質濃度 (TC、TG、PL、PC、SM) の一覧を表 1 に示した。12 名のうち、低コレステロール血症が 1 名、IIb 型高脂血症が 1 名、高 TG 血症が 2 名含まれていたが、残り 8 名の脂質濃度は基準範囲内にあった。

2. 牛乳摂取による血清脂質濃度の変化

牛乳摂取前と摂取後 30 分、1 時間、2 時間後の血清脂質濃度の平均値と標準偏差 (mean±SD, n=12) を図 2 に示した。摂取後 1 時間値で TC と PL 濃度は有意な増加 ($p < 0.05$) を示したが、2 時間値では差がなかった。また、TG は有意な差が認められなかった (図 2, A)。リン脂質分画の PC と SM 濃度では、PC は摂取後 1 時間値と 2 時間値で増加が認められ、SM は 30 分、1 時間、2 時間値のいずれも減少が認められた。

3. FPLC 分画における脂質濃度分布

今回、血清 PL 濃度としては摂取前と有意な差がなかったが、PC と SM で有意な差があった 2 時間値について、FPLC システムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりリポ蛋白粒子サイズとその脂質組成について検討した。高 TG 血症を示した被験者 1 では、摂取前に比べて 2 時間値では、(VLDL+CMr) の TG の減少が認められた (図 3)。さらに、PL、PC、コレステロールの分画では、(VLDL+CMr) の粒子サイズの大きい分画 (VLDL+CMr 大型粒子; Fr. 14,15) の減少が認められ、HDL では粒子の大きい分画 (HDL 大型粒子、Fr. 27-30) が減少しており、粒

子の小さい分画 (HDL 小型粒子、Fr. 31-38) が増加していた。LDL は変化がなかった (図 4)。また、血清 TG が低値な被験者 8 では、LDL の減少が認められた (図 5)。さらに、PL、PC、コレステロールの分画では、HDL 大型粒子 (Fr. 27-30) が増加しており、HDL 小型粒子 (Fr. 31-38) が減少していた (図 6)。これらの、リポ蛋白分画の粒子サイズを大型粒子と小型粒子に分けて、摂取後 2 時間値のリン脂質の変化の一覧を表 2 に示した。表 2 は、血清 TG 濃度の高い順に並べ直した。その結果、高血清 TG 群では (VLDL+CMr) 大型粒子の PL は減少傾向にあった。さらに LDL および HDL のサイズの大型粒子の PL は減少するが、小型粒子の PL は増加した。一方、血清 TG が低い群では、(VLDL+CMr) や LDL の PL はほとんど変化が無いが、HDL 大型粒子の PL が増加し、小型粒子の PL は減少した。

4. FPLC 分画における脂肪酸側鎖別リン脂質構成

被験者 1 と 8 の HDL のリン脂質組成およびその脂肪酸側鎖別のリン脂質分子種を質量分析で検討した。被験者 1 の分画 32,34,36 (HDL 小型粒子) では、摂取前の PC の脂肪酸側鎖別のリン脂質分子種の比率はほとんど変化がないが、摂取 2 時間後では、 m/z 758 の PC16:0/18:2 (H+) の比率が高くなっていた。また、PC に比べて LysoPC の比率も増加していた (図 7)。一方、被験者 8 の分画 30,32,34,36 (HDL 小型粒子) では、摂取 2 時間後で HDL の PC の脂肪酸側鎖の違いによる比率は変化がほとんどなかったが、HDL 大型粒子で、PC に対する lysoPC 比率が減少していた (図 8)。

【考 察】

健常男性ボランティア (以下被験者) における牛乳の摂取後の血清脂質濃度、リポ蛋白分画および脂肪酸側鎖別の PC 亜分画の変化について検討した。摂取前と市販牛乳 500ml 摂取後の血清脂質濃度において、TG は有意差がなかったことから、牛乳から吸収された TG は、血中で速やかに代謝された。一方、コレステロールおよびリン脂質で有意な増加を示したが、SM は有意な減少を示した。このとき、被験者の血清 TG 濃度が高値な群では、小型粒子の LDL および HDL が増加傾向を示し、血清 TG 濃度が低値では HDL 大型粒子が増加しており、被験者の血清 TG 濃度に関連してリン脂質分布および代謝は異なることと考えられた。さらに、脂肪酸側鎖の違いによる PC 分子の比率や lysoPC の PC に対する比率が異なっており、牛乳摂取によりリン脂質代謝がダイナミックに変化することが考えられた。

牛乳の摂取後の血清 TC および PL の増加傾向は、以前の我々の検討でも同様の結果を得ている。今回の分析では、PL の組成である PC は増加傾向にあったが、SM は減少傾向にあった。牛乳中の PL としては、グリセロリン脂質の PC とスフィンゴ脂質の SM が約 1 : 1 で含有しているとされているが、牛乳の摂取では SM の吸収が低いか、SM が CM レムナントなどの代謝に伴い速やかに肝臓や末梢組織細胞などに代謝されていき、PC とは異なる代謝経路、機序によることが考えられた。摂取 2 時間では血清 PL 濃度はほぼ摂取前にほぼ回復しているが、TG リッチリポ蛋白だ

けでなく LDL や HDL の粒子サイズ分布や PC、SM および lysoPC の組成も大きく変化していることが見いだされた。これらのリン脂質の変化は、被験者に一律ではなく被験者の血清 TG 濃度の差により異なっていたことから、被験者の TG 代謝レベルの差がリポ蛋白代謝全体に大きく影響していることが見いだされた。CM のリポ蛋白リパーゼ (LPL) の水解のとき HDL が新生することが知られており、HDL 代謝に影響を及ぼしているかもしれない。

最近、食後高脂血症が問題とされており、食後 4 時間で血清 TG がピークに達することが報告されている。この場合、高脂血症患者または疑いの患者へのバターやクリームやオフとミールなどの高脂肪食の摂取試験であるが、今回の牛乳などによってもその分析技術の向上により、比較的温和な条件かつ日常食に近い条件で、栄養障害や腸管吸収障害などの脂質代謝異常を解析することが可能かもしれない。また、牛乳自体は高 TG であるが、牛乳の摂取後にも健常者では血清 TG はほとんど増加していないことから、TG 代謝異常の分析に利用できるかもしれない。

【結 語】

健常者の牛乳摂取により、リポ蛋白中のリン脂質濃度、リン脂質亜分画およびその構成分子種は大きく変化をしており、その変化は被験者の血清 TG すなわち TG 代謝の差により異なっていることが見いだされた。

【謝 辞】

本研究を実施するにあたり、採血に支援をいただいた本学医学部保健学科 寺沢文子 博士、測定にあたり協力をいただいた本研究室修士学生の見谷敦司君、滝脇正貴君、ならびに卒業研究生の稲見恵里、大塚仁美、島田麻里、中村智代の諸君に感謝します。

【参考文献】

1. Iwata T, Kimura Y, Tsutsumi K, Furukawa Y, Kimura S. The effect of various phospholipids on plasma lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1993 ; 39 : 63-71.
2. 黒田圭一ほか：卵黄リン脂質摂取ラットの血清・肝臓脂質濃度に及ぼす魚油投与の効果，*日本栄養・食糧学会誌*，1997；50：25-30.
3. 黒田圭一ほか：脂肪酸組成の異なる 3 種のリン脂質及びその関連油脂のラット血清コレステロール上昇抑制効果の比較，*栄養学雑誌*．1990；48：213-220.
4. 佐々木一，桑久枝：ミルクリン脂質の脂質代謝調節作用，*ミルクサイエンス*，51，173-177 (2002)
5. Siri PW, Krauss RM. Influence of dietary carbohydrate and fat on LDL and HDL particle distributions. *Curr Atheroscler Rep*. 2005 ; 7 : 455-459.
6. 日高宏哉，本田孝行，山内一由，勝山 努．牛乳摂取による血中微量金属とアミノ酸の濃度変

動と複合体の分析, 平成 17 年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書 (牛乳・乳製品健康づくり委員会, 社団法人 日本酪農乳業協会), 2006 ; pp. 142-152.

7. Hidaka H, Hanyu N, Sugano M, Kawasaki K, Yamauchi K and Katsuyama T. Analysis of Human Serum Lipoprotein Lipid Composition Using MALDI-TOF Mass Spectrometry *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2007 ; 37 : 213-221.
8. Hidaka H, Yamauchi K, Ohta H, Akamatsu T, Honda T, Katsuyama T. Specific, rapid, and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in serum and lipid extracts. *Clin Biochem*. 2008 ; 41 : 1211-1217.

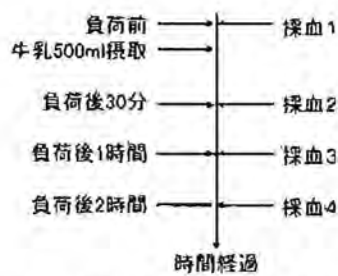


図1 牛乳負荷試験のプロトコール

表1 健康ボランティア被験者の血清資質濃度

Subject	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	mean	SD
TC	172	160	112	159	168	151	176	167	155	246	180	164	167.5	30.2
TG	296	116	64	178	94	55	122	34	112	189	42	34	111.3	78.2
PL	215	205	158	207	203	187	217	199	218	283	231	216	211.6	29.2
PC	162	158	124	156	142	138	150	133	151	207	153	122	149.7	22.4
SM	48	33	23	31	34	27	37	31	31	48	29	24	33.0	8.1

mg/dl

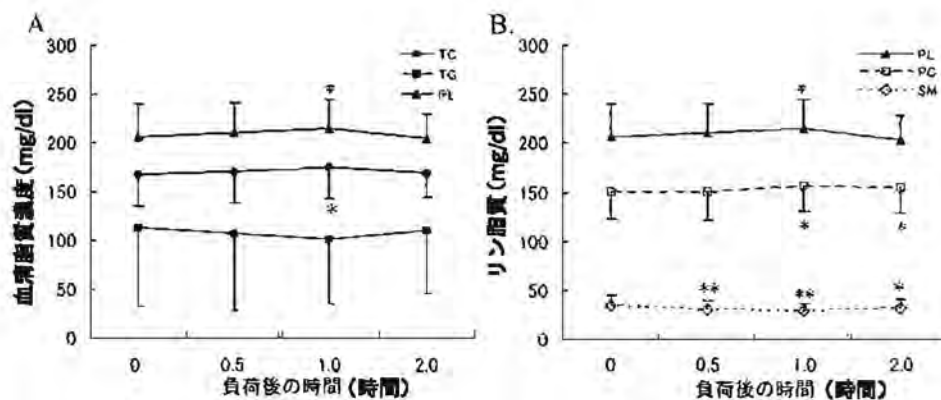


図2 牛乳負荷摂取による血清資質濃度の変動

A: 血清資質濃度、B: 血清リン脂質およびリン脂質分画濃度、*: $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

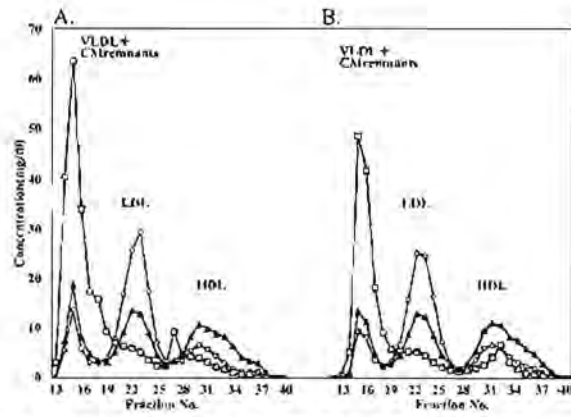


図3 FPLC分画における脂質濃度分布（被験者1）

A: 負荷前、B: 負荷後2時間、

○: コレステロール、 □: トリグリセライド、 ▲: リン脂質

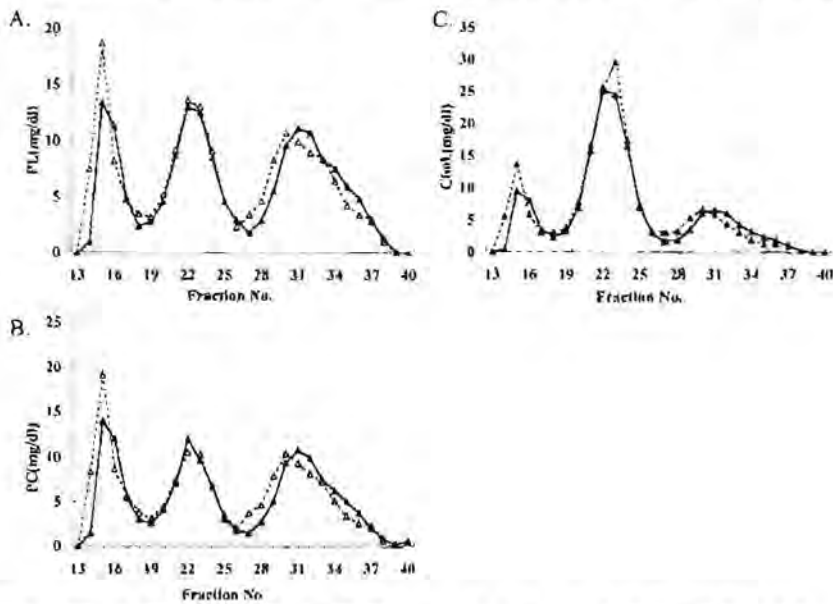


図4 FPLC分画におけるリン脂質とコレステロールの分布（被験者1）

A: PL, B: PC, C: コレステロール

△: 負荷前、▲: 2時間後

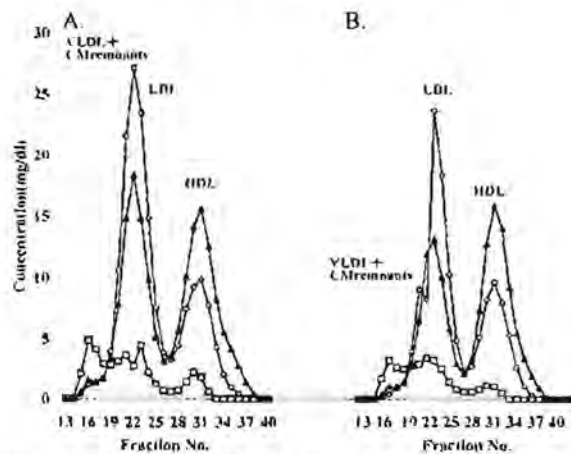


図5 FPLC分画における脂質濃度分布（被験者2）

A: 負荷前、B: 負荷後2時間、

○: コレステロール、 □: トリグリセライド、 ▲: リン脂質

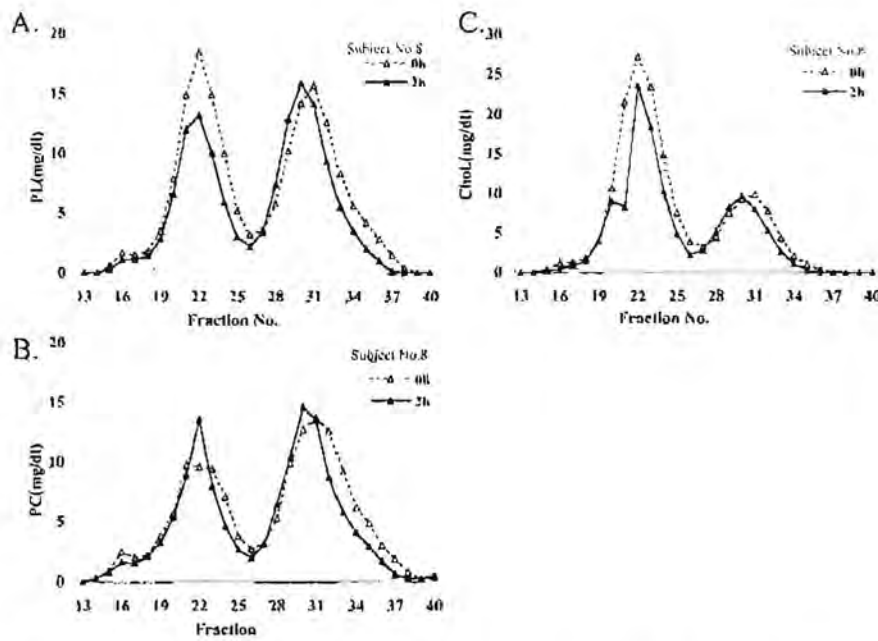


図6 FPLC分画におけるリン脂質とコレステロールの分布（被験者8）

A: PL, B: PC, C: コレステロール

△ : 負荷前, ▲ : 2時間後

表2 負荷前後（2時間値）のリポ蛋白分画リン脂質濃度の変化

No.	被験者	血清脂質(mg/dl)			VLDL+ CMrem.		LDL		HDL	
		TC	TG	PL	L	S	L	S	L	S
1	1	172	296	215	↓	→	→	→	↓	↑
2	10	246	189	283	↓	→	↓	↑	↓	↑
3	4	159	178	207	→	→	→	↑	→	→
4	7	176	122	217	↓	→	↓	↑	↓	↑
5	2	160	116	205	↑	↑	↑	↑	→	↑
6	9	155	112	218	→	→	→	→	↓	→
7	5	168	94	203	↓	↓	↑	→	→	→
8	3	112	64	158	↓	↓	→	↓	→	→
9	6	151	55	187	→	→	→	→	→	→
10	11	180	42	231	→	→	→	→	↑	↓
11	8	167	34	199	→	→	→	↓	↑	↓
12	12	164	34	216	*	*	*	*	*	*

L: 大型粒子サイズ群, S: 小型粒子サイズ群, *: 未測定

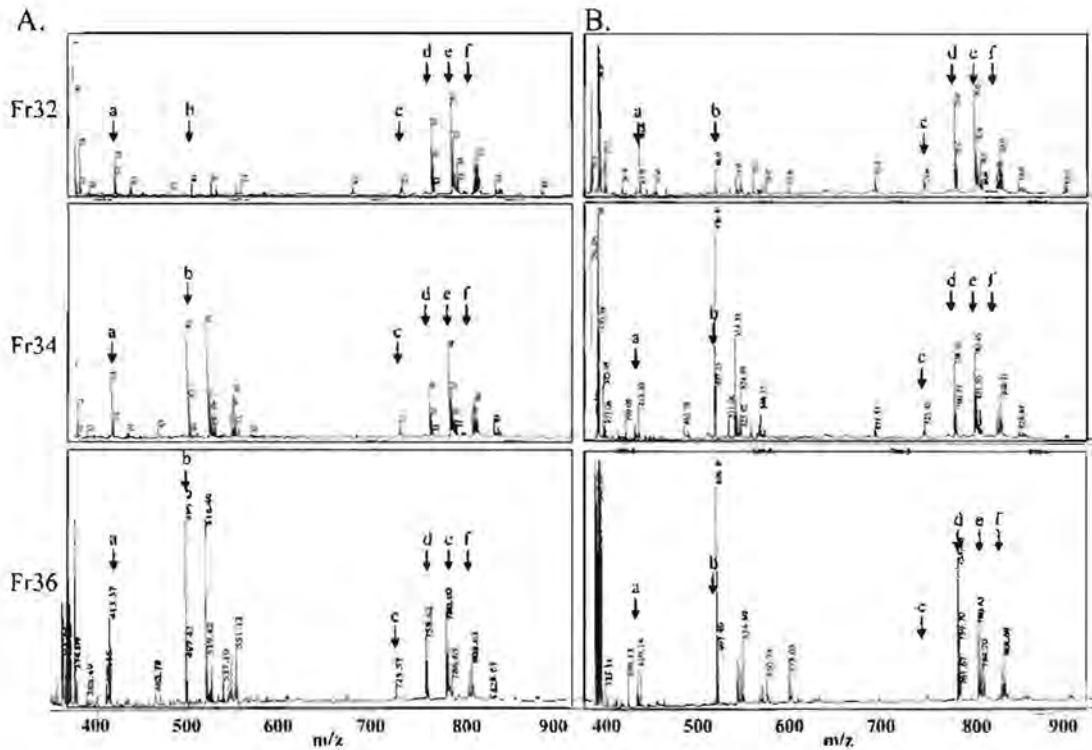


図7 FPLC分画における脂肪酸側鎖別リン脂質構成（被験者1）
 負荷後2時間，矢印：a：マトリックス，b：lysoPC [16:0 (H+)], c：SM [16:0 (Na+)],
 d, e, f：PC [16:0/18:2 (H+)], PC [16:0/18:2 (Na+)], PC [18:0/18:2 (Na+)]

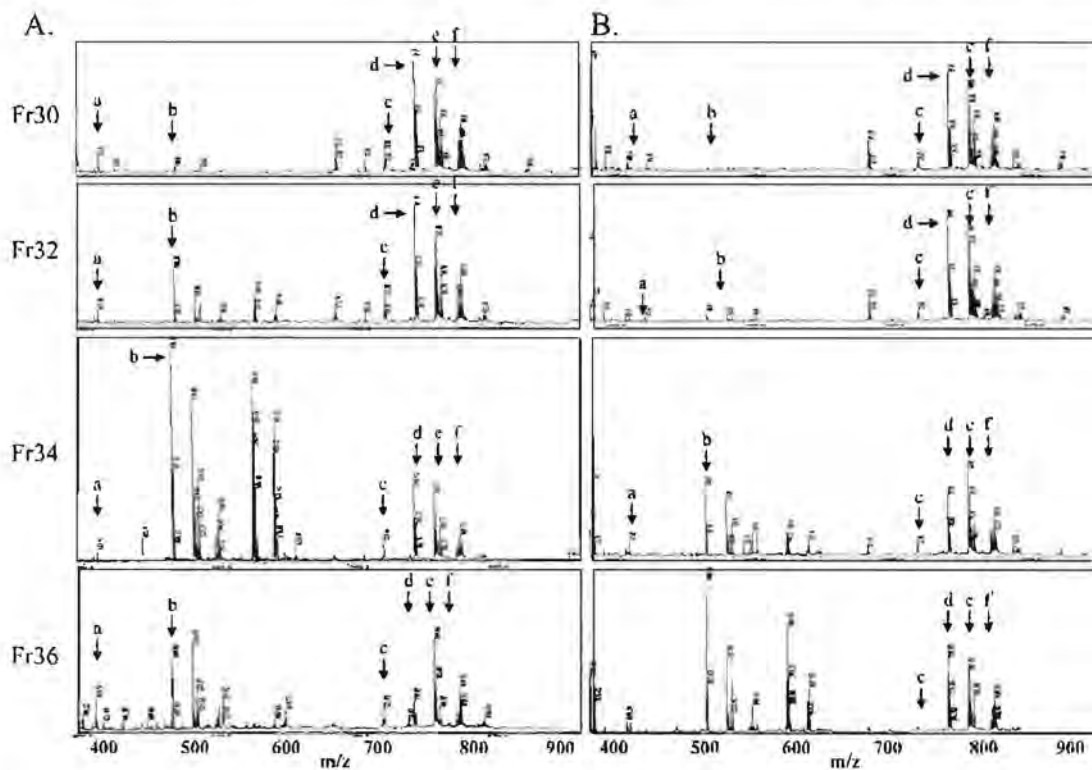


図8 FPLC分画における脂肪酸側鎖別リン脂質構成（被験者1）
 A：負荷前，B：負荷後2時間，矢印：a：マトリックス，b：lysoPC [16:0 (H+)], c：SM [16:0 (Na+)],
 d, e, f：PC [16:0/18:2 (H+)], PC [16:0/18:2 (Na+)], PC [18:0/18:2 (Na+)]