

牛乳に含まれる植物ステロールの種類と含有量および植物ステロールの吸収率に関する研究

東京大学医学部付属病院検査部 講師 橋本佳明

はじめに

最近、我々は、植物ステロール血症の2症例を見つけ、現在外来で経過をフォローしている。植物ステロール血症（シトステロール血症とも呼ばれる）とは、1)常染色体劣性遺伝、2)多発性黄色腫、3)若年発症の冠動脈疾患を臨床的特徴とする希な疾患である。植物ステロールは構造がコレステロールと非常によく似ているが側鎖の構造が異なる。本疾患は血中にこの植物ステロール（ β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロールなど）が増加していることが原因と考えられているが、その病因遺伝子は明らかになっていない。1974年にBhatt acharayyaとConnor(1)により姉妹例が報告されて以来、現在までに確認された患者数は約50例、我が国では約10例と推定されている。

この疾患の根本的な治療法はなく、植物ステロールの摂取制限が最も大切であると考えられている。植物ステロールは植物に含まれているが、植物を餌にしている動物（牛、山羊など）の乳にも植物ステロールが存在する可能性がある。しかしながら、これに関する論文は我々が検索した限りにおいてない。牛乳は様々な栄養素を豊富に含み、毎日摂取すべき食品の一つである。従って、植物ステロール患者に牛乳を許可できるかどうかを明らかにすることは重要である。

植物ステロール血症患者の血中植物ステロールの増加は、吸収率の亢進が原因であると考えられている。植物ステロールの小腸での吸収率は健常者では5%以下、植物ステロール血症患者では約25%と報告されている(2)。しかしながら植物ステロールの吸収率は食習慣の違いにより異なるかどうかは検討されていない。

今回、我々は、牛乳含有成分および植物ステロール有無について検討した。また、低カロリー玄米採食療法を約2カ月間入院して行ったリウマチ患者の血中植物ステロール濃度についても検討した。

研究計画・方法

1. 対象

55日間入院して低エネルギー玄米採食療法を行った女性の慢性リウマチ患者11名を対象とし、入院1日目、26日目、32日目、54日目の4回、早朝空腹時に採血した(図1)(3)。対象は健常者20名で早朝空腹時に採血した。

2. 食事内容

5分粥メニューを基本とし、55日間の入院中に3回（1回目：3日間、2及び3回目：5日間）の断食をいれた（図1）。断食の前後日は3分粥メニューとした。5部粥メニュー（約1,200kcal）は、朝食として青汁130g（生のふだんそう、春菊、白菜、たいさい、セリ、よめな（葉）をミキサー

図1 55日間の入院中のエネルギー摂取量と検査スケジュール

Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1200kcal	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○							○	○	○	○
600kcal												○				○					
200kcal													○	○	○						
exam (B)	▲																				
exam (U)	(▲)			▲				▲			▲					▲					

Day	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
1200kcal	○	○	○	○	○								○	○	○	○	○	○	○	○	○
600kcal						○						○									
200kcal							○	○	○	○	○										
exam (B)						▲						▲									
exam (U)					▲						▲										

Day	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
1200kcal	○	○	○								○	○	○	○	○
600kcal				○						○					
200kcal					○	○	○	○	○						
exam (B)														▲	
exam (U)			▲						▲				▲		

exam (B) : fasting blood collection

exam (C) : 24-hour urine collection

(▲) : urine was collected on the day before admission

表1 1日のエネルギーと栄養素の摂取量

Nutrients		Menu		
		A	B	C
Energy	kcal	1059	715	237
	kcal/kg BW	21.3	14.4	4.8
Proteins	g	46	32	3
	g/kg BW	0.93	0.65	0.06
Fats	g	34	26	0
Carbohydrates	g	146	92	59
Crude fiber	g	3.2	1.9	0
Cholesterol	mg	0	0	0
Calcium	mg	796	566	157
Phosphorus	mg	1033	694	53
Iron	mg	12	7.5	3.5
Vitamin A	IU	1240	62	0
B ₁	mg	1.13	0.7	0.04
B ₂	mg	0.45	0.24	0.09
C	mg	60	4	0

A two-day and a one-day dietary surveys were carried out on menus A and B, and menu C, respectively.

menu A : standard menu B : menu on the day before and after each fasting period;

C : menu during fasting periods

BW : body weight

にかけたもの)、昼食及び夕食は玄米100g(調理前重量)、豆腐(木綿)200g、黒胡麻20g、昆布粉5g、であった。3分粥メニュー(約600kcal)は、朝食なしで、昼食及び夕食は玄米50g、豆腐(木綿)100g、黒胡麻20g、昆布粉5g、であった(表1)。断食(約200kcal)メニューは、朝食はなしで、昼食及び夕食は澄まし汁420g(椎茸だし、しょうゆ10g)、黒砂糖30gであった。水分(柿の葉茶、水など)は自由に摂取させた。

3. 植物ステロールの測定方法

Seyamaらの方法(4)に従い測定した。血清または牛乳100 μ lを内部標準物質(Epicoprostanol)10 μ gが入っているガラスチューブに加えた。さらにエタノール性-1NKOH 1 mlを加え、ヒートブロックでステロールの加水分解を80 $^{\circ}$ C、1時間行った。その後水0.5mlとHexane 2 mlを加えてよく混合した後2,000rpmで5分間遠心した。Hexane層(上層)を別のガラスチューブに移し、残った下層にHexane 2 mlを加え、同様の操作を行いHexane層(上層)を先のガラスチューブに移した。

抽出したHexane溶液を窒素気流下で蒸発させ、ガラスチューブの底に残った白い不けん化物質にBenzoyl Chloride Reagent*¹ 0.3mlを加え、軽く攪拌し、室温で30分間静置した。Dichloroethane 2 mlと0.1NHCl 2 mlを加え、よく混合して、2,000rpmで10分間遠心した。水層(上層)を取り除き、有機溶媒層(下層)に水2 mlを加えた後、よく混合して、2,000rpmで10分間遠心した。この操作を再度行った後、有機溶媒層(下層)を別のガラスチューブに移し、有機溶媒を蒸発させた。

ガラスチューブの底に残った塩化ベンゾイルの誘導体をDissolving solution*² 1 mlに溶解し、HPLCにて分析した。

HPLCの条件

装置 ; D-6000 Data Station HPLC Manager

(HITACHI) L-4200 UV-VIS Detector, L-5020 Column oven

L-6000 Pump, L-6200 Intelligent Pump

L-6000 Interface, AS-4000 Intelligent Auto Sampler

分析カラム ; ODS, 150 \times 2.0mm, Shimadzu

カラム温度 ; 47 $^{\circ}$ C

Mobile Phase ; Acetonitrile : Water : Acetic Acid = 93 : 9 : 0.2 (v/v)

溶出・流速 ; 0.5ml/min

分析時間 ; 80minから100min

モニター ; 228nm

*¹ Benzoyl Chloride Reagent ; 1, 2-Dichloroethane : Pyridine : Benzoyl chloride = 10 : 1 : 0.3 (v/v)

*² Dissolving solution ; Acetonitrile : 1, 2-Dichloroethane = 2 : 1 (v/v)

ピークの同定 : 条件をできるだけ同様にしても保持時間は変動するので、試料と同様の操作を行った外部標準物質を、毎回HPLCに流しその流出パターンを得た。ピークの同定はExternal Standardとそれぞれの試料の相対保持時間(それぞれのピークの保持時間とInternal

Standardの保持時間との比) とを比較して行った。

濃度の算出：濃度はすべての試料に添加した濃度既知の内部標準物質とのピーク面積の比から求めた。

4. 牛乳の栄養成分濃度の測定

日立7600測定装置で、それぞれの項目の測定試薬を用いて測定した。

結 果

1. 牛乳の栄養成分濃度

総蛋白は3.2g/dlで、その内アルブミンが81%を占めた(表2)。脂質成分としては、トリグリセリドが2.9g/dl、リン脂質は40mg/dlであったが、コレステロールは9mg/dlと僅かであった。総蛋白や脂質値は文献(5)にもあり、ほぼ我々の測定値と同じであった。カルシウムも文献値とほぼ同じであったが、リンは測定値67mg/dl、文献値95mg/dlとやや乖離が認められた。牛乳の種類によって異なる可能性もあると考えられる。

表2 牛乳の主成分濃度

項目	蛋白	アルブミン	コレステロール	トリグリセリド
単位	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl
測定値	3.2	2.6	9	2910
文献値	3.1	—	11	2910

項目	リン脂質	カルシウム	リン	脂質
単位	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
測定値	40	95	67	—
文献値	—	100	95	3400

2. 牛乳中の植物ステロール濃度

HPLC法にて植物ステロール濃度を測定した。コレステロールのピークのみ認められ、植物ステロールのピークは認められなかった。

3. 低エネルギー玄米菜食療法と血中植物ステロール濃度

低エネルギー玄米菜食療法を行った慢性リウマチ患者では11名中8名において植物ステロールと思われるピークが認められたが、健常者では認められなかった(図2)。植物ステロールが認められた慢性リウマチ患者8名のうち、Campesterolが現れた者が1名で54日目に現れた。また、Sitosterol

は6名で、1日目に現れた者が2名、26日目に2名、32日目に1名、26日目と32日目の両方に現れた者が1名であった。Sitostanolは6名で、1日目に現れた者が1名、26日目に3名、54日目に1名、1日目と26日目に現れた者が1名であった。

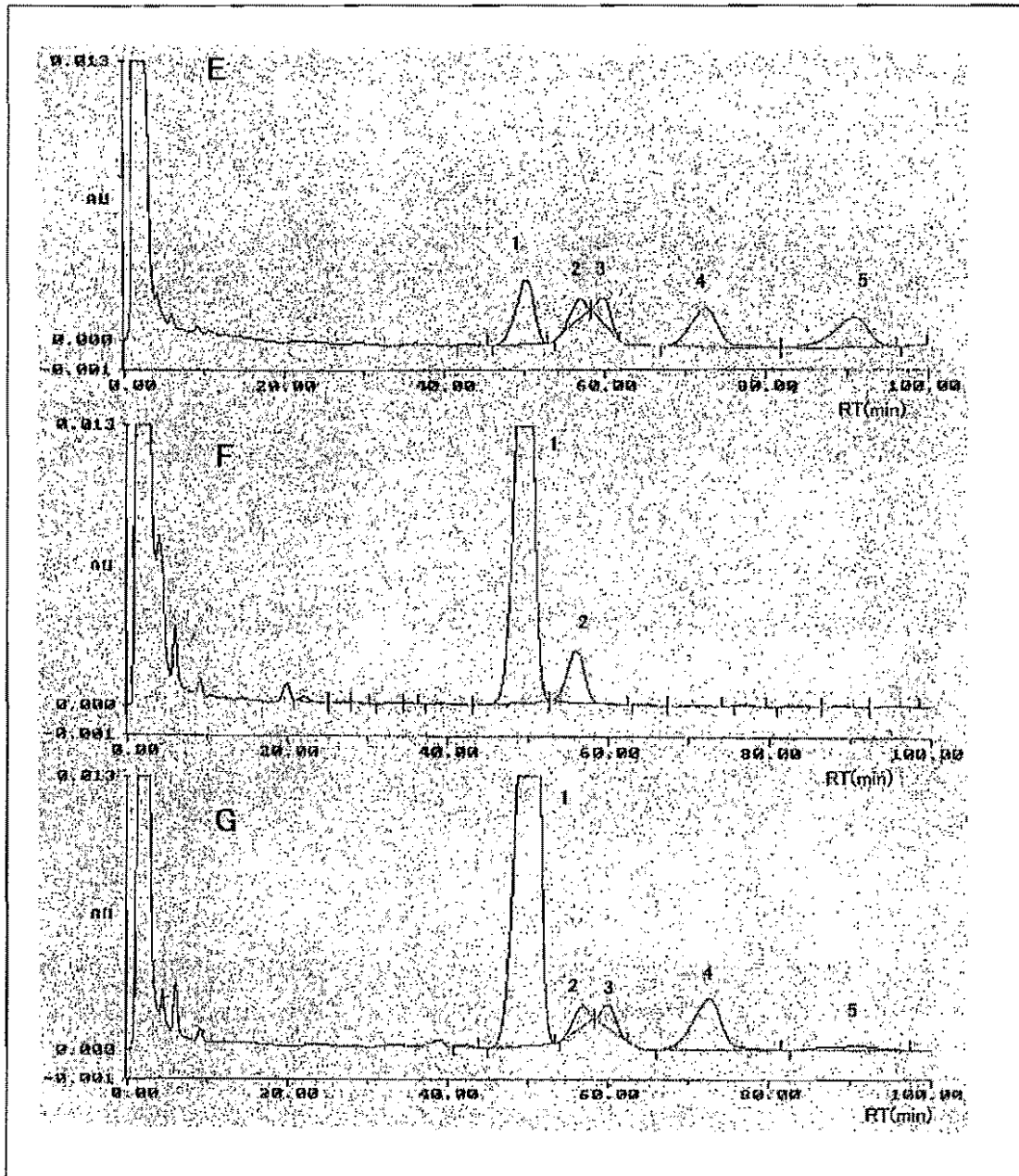


図2 External Standard(E)、健常者(F)、シトステロール血症患者(G)の分析パターン
1 : Cholesterol, 2 : Internal, 3 : Campesterol, 4 : Sitosterol, 5 : Sitostanol

表3 低エネルギー玄米菜食療法を行った慢性リウマチ患者の血中ステロール濃度

subject	day	Concentration (mg/dl)		
		Campesterol	Sitosterol	Sitostanol
1	1			
	26			
	32			
	54			0.31
2	1			
	26		1.89	0.64
	32			
	54	0.59		
3	1			
	26		0.89	
	32			
	54			
4	1			
	26			
	32			
	54			
5	1			
	26		0.69	
	32		0.79	
	54			
6	1		0.95	0.87
	26			
	32			
	54			
7	1			
	26			0.63
	32		0.94	
	54			
8	1			0.55
	26			0.31
	32			
	54			
9	1			
	26			
	32			
	54			
10	1			
	26			
	32			
	54			
11	1		1.04	
	26			0.41
	32			
	54			

考 察

牛乳にはコレステロールが約10mg/dl含まれていたが、HPLC法による測定では植物ステロールは認められなかった。牛は植物ステロールを餌より摂取しているが、牛乳中には分泌しないと考えられた。この結果を得た後、植物ステロール血症患者に牛乳を許可できるようになり、牛乳は患者の栄養補給源として大変役立っている。

次に植物ステロールの吸収率に関する検討を行った。低カロリー玄米菜食療法を行った慢性リウマチ患者では植物ステロール濃度の上昇が認められた。植物ステロールは体内で合成することができないので、血中植物ステロールは食物から摂取したものに由来すると考えられる。今回の対象者の胡麻摂取量は40g/日で胡麻油としては約20gである。一般日本人の平均植物油摂取量の30gと比較してむしろ少ない。従って本対象者の植物ステロールの吸収率が亢進した可能性がある。この原因は不明であるが以下の2つの点が考えられる。まず1点は低エネルギー食であったことである。低エネルギー食時にできるだけエネルギー源を吸収しようとする適応反応が小腸に生じている可能性が考えられる。腎臓においては、低エネルギー食時の適応反応として腎尿細管での蛋白の再吸収が亢進し尿中排泄量が減少することが報告されている(6)。2点目は動物性油脂を摂取しなかったことがあげられる。コレステロールは植物ステロールの吸収を阻害するとの報告がある。また、植物ステロールの摂取により血中ステロール濃度が低下したとの報告もある(7)。これらの報告は植物ステロールとコレステロールの吸収は競合していることを示唆している。

近年エネルギー摂取過多が、糖尿病や高血圧、血清脂質異常、脂肪肝、通風など様々な疾患の原因となっている。これらの疾患のまず行うべき治療は摂取エネルギー制限による体重の減量である。しかし摂取エネルギー制限後、初期には体重は順調に減少するが、しばらくして減少スピードが鈍化することが知られている。この原因の一つは、本研究のような人体内の吸収メカニズムの変化も一因ではないかと考えられる。低エネルギー状態での人体の適応反応に関するさらなる研究は、さまざまな疾患の治療や予防に役立つものと思われる。

ま と め

1. 牛乳にはコレステロールは含まれていたが、植物ステロールは検知できなかった。
2. 我々のHPLC法で、普通食を摂取している健常人では血中植物ステロールのピークを検知できなかったが、低カロリー玄米菜食療法を行ったリウマチ患者では、11名中8名に植物ステロールのピークを検知できた。低カロリー食であったことと動物性脂肪を摂取しなかったことが、植物ステロールの吸収率を亢進させた可能性がある。

文 献

1. Bhattacharyy AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 53 : 1033-1043, 1974
2. Salen G, Ahrens E Jr, Grundy SM. Metabolism of betasitosterol in man. *J Clin Invest* 49 : 952-967, 1970
3. 藤田晃人, 橋本佳明, 中原一彦, 田中敏郎, 田 豊子, 甲田光雄. 低カロリー玄米菜食療法による慢性リウマチ患者の病状と全身状態の変化。 *臨床病理* 47 : 554-560, 1999
4. Kasama T, Byun DS, Seyama Y. Quantitative analysis of sterols in serum by high-performance liquid chromatography. Application to the Biochemical diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis. *J Chromato* 400 : 241-246, 1987
5. 科学技術庁資源調査会. 四訂食品成分表. 女子栄養大学出版部, 1999
6. 渡辺信子, 橋本佳明, 大久保滋夫, 二村 梓, 真重文子, 中原一彦, 藤田晃人, 奥田豊子, 甲田光雄. 断食による尿中蛋白排泄量の変化。 *臨床病理* 46 : 214, 1998
7. 後藤直宏, 森 秀樹, 桂木能久, 戸井知子, 安川拓史, 島崎弘幸. 植物ステロールを含むジアシルグリセリンの血中ステロール低下作用。 *日本油化学会誌* 48 : 235-240, 1999