

## 報告書

牛乳及び乳製品はコリン化合物摂取に役立つか？

仙台白百合女子大学 人間学部

健康栄養学科

大久保剛

2022年5月13日

## I 緒言

コリンは、4級アンモニウムカチオンでメチル基を有する化合物である。コリンは、①生体の細胞膜の構造を維持する上で重要であり、②神経伝達物質のアセチルコリンの前駆物質の役割を担い、③One carbon metabolism いわゆるメチル基の代謝系でメチル基を供給する代謝サイクルにおいて重要な役割を果たし、エピゲノムへの関与が指摘されている。

このため、アメリカではビタミン様物質に分類されている。適正摂取量 (Adequate Intake : AI) として成人男性 500 mg/日、成人女性 425mg/日と定められている。特に、胎児や乳児の脳の構築に重要な役割を果たしていることが指摘されている<sup>1)</sup>ため、妊婦は 450 mg/日、授乳婦は 550 mg/日と成人女性よりも摂取量は多く設定されている。一方、コリン欠乏を起こすと肝機能障害を引き起こし、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼの上昇が知られている<sup>2)</sup>。

しかしコリンの合成に関して、de novo の合成系はあるが肝臓以外の臓器で殆ど合成することができないため、食事摂取で補う必要があるとされている。それにも関わらず、日本では、食事摂取としてのコリンに関する研究報告は殆どなく、コリンの推奨量はまだ定められていない。

コリン化合物は、水溶性物質のグリセロホスホコリン、遊離コリン、脂溶性物質のホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンなどがある。食品の中では、大豆、卵、牛乳に豊富に含まれている。アメリカでは、コリン化合物の摂取を推奨しているため、アメリカ農務省では、USDA Database for the Choline Content of Common Foods がインターネット上に公開されアメリカの主要食材に含まれる 6 種類のコリン化合物の含有量が掲載されている。

我々は、既に A 大学の女子学生 19 名と B 大学の男子学生 17 名に対し、季節変動を考慮して春夏秋冬で各 3 日間、における留め置き法を実施した。その結果、どの季節においても男女ともにアメリカの AI に比べて 50~60%の摂取量であった(データ未発表)。限界点として、アメリカ人と日本人の食生活の違いから、70 食材しかデータベースよりコリン含有量が算出できていない。また、アメリカの AI を単純に日本人にあてはめることは出来ない。しかし、これらを十分に考慮しても日本人はコリン摂取量が不足している可能性が示唆される。

今回は、乳製品がコリン化合物の補給に役立つか検証する。また、コリン摂取とアセチルコリンの関係性に着目した。日本は、統計的に見て不眠大国であり、4人に1人が睡眠に関する不満を抱えていると言われている。そこで、睡眠の機能にはコリン作動性細胞が関わっていることが知られているため、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンを豊富に含む食品、特に牛乳を長期摂取した時に睡眠にどのような影響を与えるか検証した。

## II 実験

### II-1 乳製品摂取後の血中コリン化合物濃度の変化

#### 《被験者》

心身共に健康な成人(大学生)男性4名・女性3名を対象に行った。

被験者候補に対してインフォームドコンセントを実施し、了解を得られた実験者候補を今回の実験の被験者とした。

#### 《実験方法》

牛乳(500ml)、ヨーグルト(400g)、チーズ(クリームチーズ18g×4個)摂食する。摂食前、摂食後60分、120分、180分後の計4回採血を実施し、速やかに血清を調整し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にコリン化合物測定時まで凍結保存した。

#### 《コリン化合物の測定》

##### ・サンプル調整

1. 血清 $10\mu\text{L}$ に対してメタノール $90\mu\text{L}$ の割合で抽出する。
2. メタノールに血清を入れた後に超音波処理を5分間行う。
3.  $10000\text{rpm}$ で5分間、遠心分離して変性したたんぱく質を除去する。
4. 上清を回収し、これを測定サンプルとする。

#### 水溶性コリンの分析条件(LC-MS/MS)

##### ・HPLC条件(日立LC2000)

カラム: XBrtdgeBEH HILIC Column、130A、 $3.5\mu\text{m}$ 、 $3.5\mu\text{m}$   
 $2.1\text{mm}\times 100\text{mm}$ 、1/pkg  
ウォーターズ製

流速:  $0.2\text{ml}/\text{min}$ 、カラム温度:  $30^{\circ}\text{C}$ 、サンプル温度:  $10^{\circ}\text{C}$ 、  
サンプル注入量:  $5\mu\text{l}$

##### バッファーの組成:

A:  $0.2\text{mM}$  酢酸アンモニウム p4.0

B: 100%アセトニトリル

分析時間: 20min

0分から3.2分: A.18.5%、B.81.5%

3.2分から5分: A.80%、B.20%

5分から14分: A.80%、B.20%

14分から14.1分: A.18.5%、B.81.5%

14.1分から20分: A.18.5%、B.81.5%

##### バッファーのグラジエント条件

##### ・MS/MS条件

イオン化モード(ESI/positive)

検出イオンのM/z: コリン 104.1070、ホスコリン 184. 0733、GPC258.1101

・その他

標品として以下のものを用いた。

コリン：Sigma C-7017、Choline Chloride

ホスホコリン：Sigma P0378、Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate

$\alpha$  GPC：日油株式会社

校正用標品：ギ酸ナトリウム（Burker 社）

分析方法：検量線法

脂質性コリンの分析条件（LC-MS）

・HPLC 条件（日立 LC2000）

カラム：CAPCELL PAK C18 ACR、3 $\mu$ m、1.5ml.D.x100mm

大阪ソーダ製

流速：0.2ml/min、カラム温度：30°C、サンプル温度：10°C、

サンプル注入量：5 $\mu$ l、

バッファの組成：

A：100%アセトニトリル

B：5mM 酢酸アンモニウム pH4.0

分析時間：15min

0分から0.5分：A.95%、B.5%

0.5分から2.5分：A.40%、B.60%

2.5分から5分：A.15%、B.85%

5分から8.5分：A.5%、B.95%

8.5分から13.5分：A.5%、B.95%

13.5分から13.6分：A.95%、B.5%

13.6分から15分：A.95%、B.5%

バッファのグラジエント条件

内部標準法：標準品とサンプルを1：19の比率で混合し、内部標準のピーク面積より検出されたPCの濃度を算出。1mMの標品を使用したため内部標準品は50 $\mu$ Mになっている。

標準品：PC,Avanti 社製、PC（12：0/12：0）

生体に存在していないリン脂質を使用。

## II-2 牛乳の長期摂取による睡眠への影響

### 《被験者》

心身共に健康な成人(大学生)男性3名・女性3名を対象に行った。

被験者候補に対してインフォームドコンセントを実施し、了解を得られた実験者候補

を今回の実験の被験者とした。

《実施期間》

2021/10/16～11/16

《実験方法》

牛乳を 200ml/日飲み、介入期間中は睡眠日誌を記録し、就寝時、起床時前半・後半の 3 つのアンケートを Google フォームより作成し、睡眠状態(睡眠時間や入眠・起床時間など)を検証した。同時に OSA 睡眠調査票 MA 版<sup>3)</sup>によって熟眠感への影響も調べ、正午にアンケートチェックをした。

また、摂取期間中の 1 か月間はアクチグラフ (アクチグラフ社製 wGT3X-BT) を利き手とは逆の手首に装着し活動量を測定した。入浴時や都合により装着できない場合は取り外し可能とした。介入期間後に回収し、解析ソフト (ActiLife アクチライフ社製) を用い入眠から起床までをアンケートと照らし合わせながら入力した。睡眠量と睡眠効率をソフトを用いて解析を行った。

人権の保護及び法令等の遵守への対応

ヘルシンキ宣言(2008 年改訂)を遵守して実施し、仙台白百合女子大学に設置された倫理審査委員会に承認を得た。研究実施に係る生データ類および、同意書などを取り扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮する。研究実施期間において得られた被験者のデータはすべて匿名化したうえで、仙台白百合女子大学人間学部健康栄養学科・大久保研究室において、研究代表者が責任をもって研究終了後、3 年間各種データを保管する。試験の結果を公表する際には、被験者を特定でき情報が含まれないようにした。試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータは使用しない。

**解析方法** (手首の活動量計から睡眠量を計測する) ActiLife を使い手動で行った。

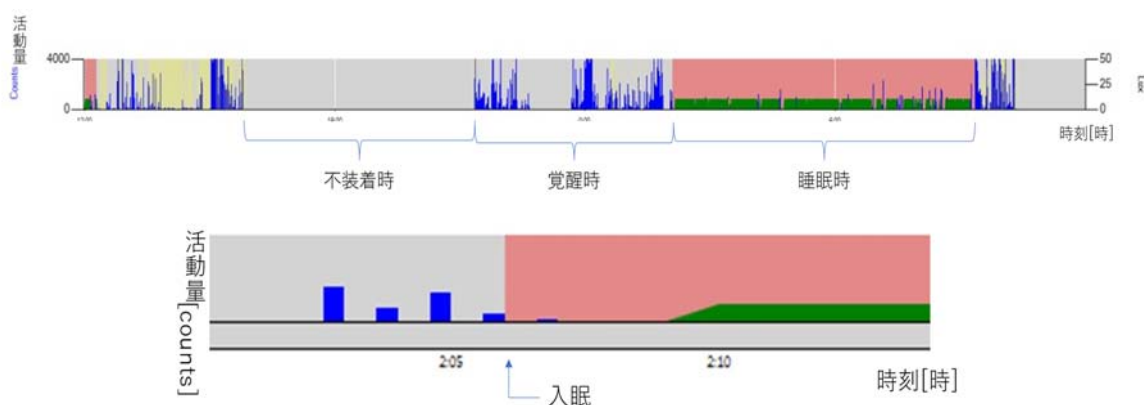


図 1.1(上図)手首の活動量、図 1.2(下図)入浴時の活動量

### III 結果

#### 乳製品摂取後の血中コリン化合物濃度の変化

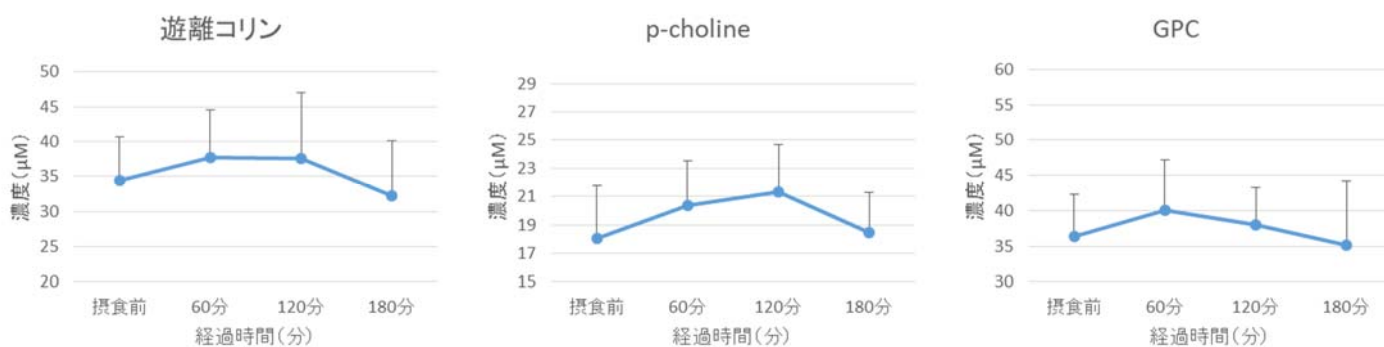


図2) 牛乳摂取後水溶性コリン化合物の血中濃度の変化

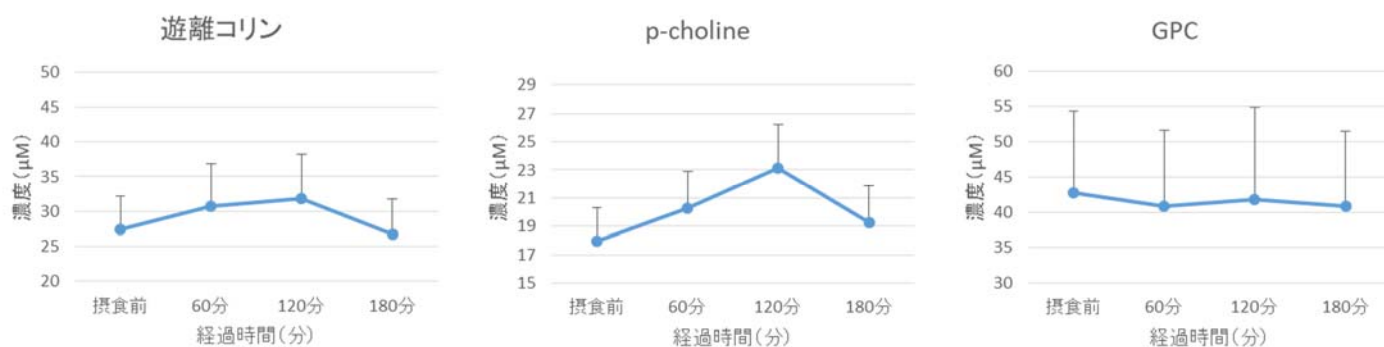


図3) ヨーグルト摂取後水溶性コリン化合物の血中濃度の変化

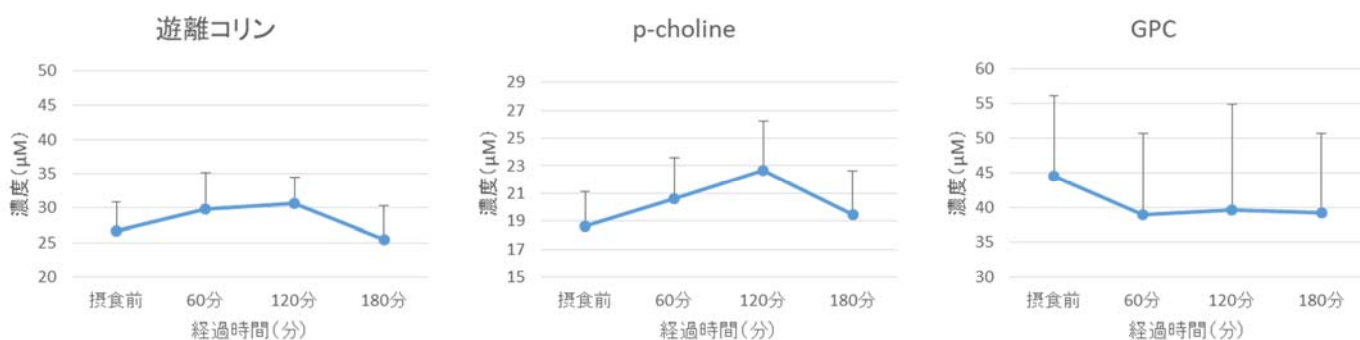


図4) チーズ摂取後水溶性コリン化合物の血中濃度の変化

遊離コリン、ホスホコリンは共に摂取後120分後に5 μM程度であるが、有意に血中濃度に上昇した。一方、グリセロホスホコリンに関しては、顕著な変化はみとめら

### 牛乳の長期摂取による睡眠への影響

アンケートとアクチグラフの解析から、睡眠時間と睡眠効率を算出した。図2は1か月の睡眠時間を個人別評価したものである。個人によって睡眠時間の差が大きい、有意な差は見られなかった。昼寝をしている人はその日の睡眠時間に含めたため、昼寝時間が多いと睡眠時間も多くなっている。

図5の睡眠効率も個人の差が大きい、有意な差は見られなかった。アクチライフの解析結果、夜の睡眠や長い睡眠の睡眠効率は高いが、昼寝などの短時間の睡眠効率は低い。そのため、昼寝をしている人は昼寝時の睡眠効率と就寝時の睡眠効率の平均を出したため低くなる傾向にあった(図6)。

1か月間を4週に分け、1週目は2021年10月18日から10月25日、2週目は2021年10月26日から11月1日、3週目は2021年11月2日から11月8日、4週目は2021年11月9日から11月16日までとした。

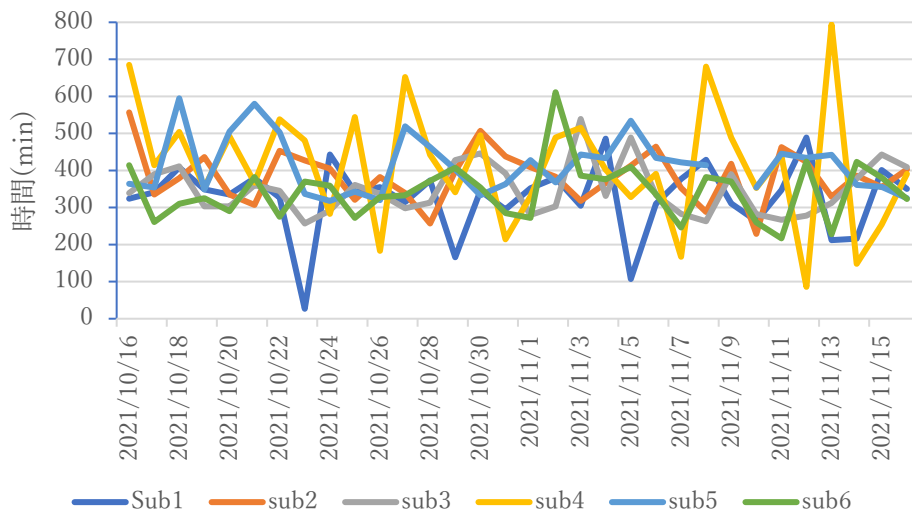


図5 睡眠時間 (個人)

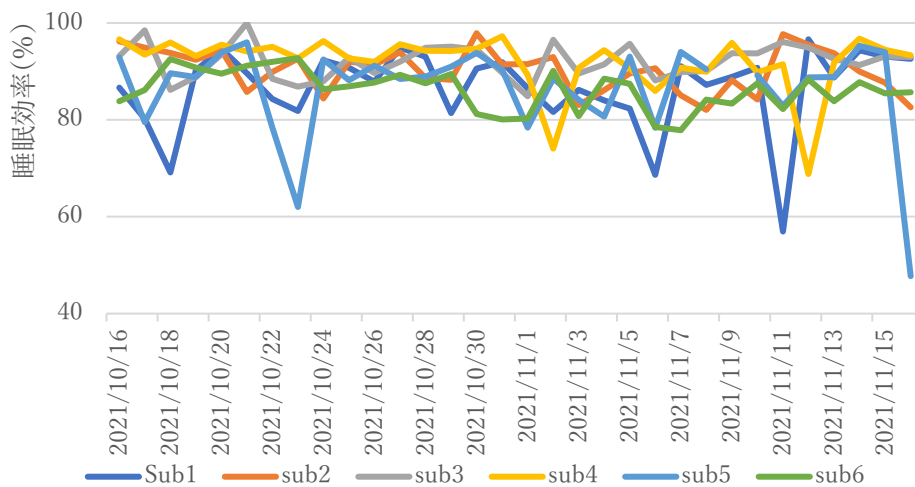


図6 睡眠効率 (個人)

図7, 8, 9は睡眠時間を4週に分け、さらに男女別と合計を出した。結果は牛乳の長期的摂取による睡眠時間の変化に有意な差は見られなかった。図10, 11, 12は睡眠効率を細分化させたもので、これも牛乳の長期的摂取による有意な差は見られなかったが、女性より男性のほうが睡眠効率向上の効果を期待されることが示唆された。

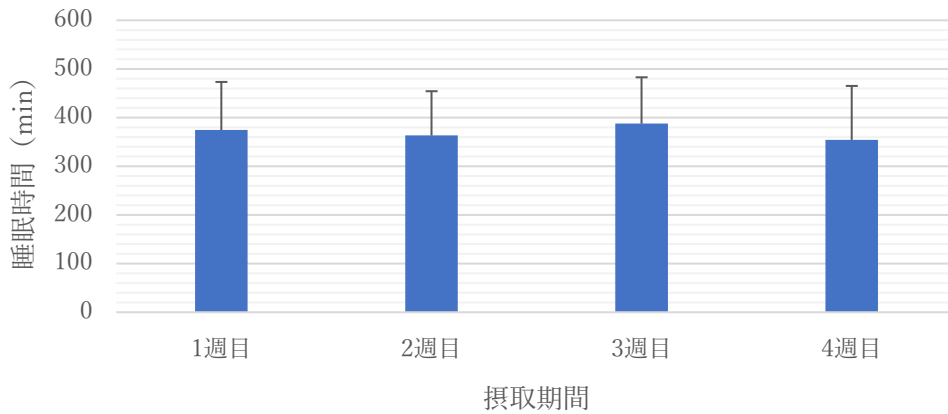


図7 睡眠時間 (合計)

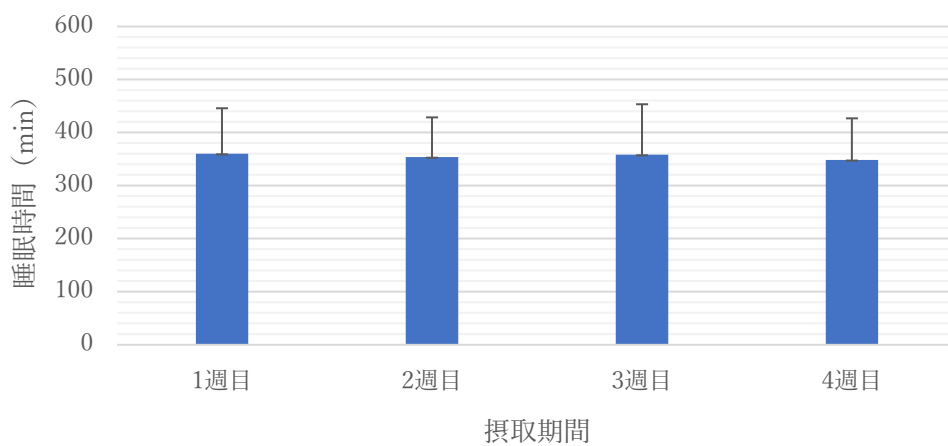


図8 睡眠時間 (男)

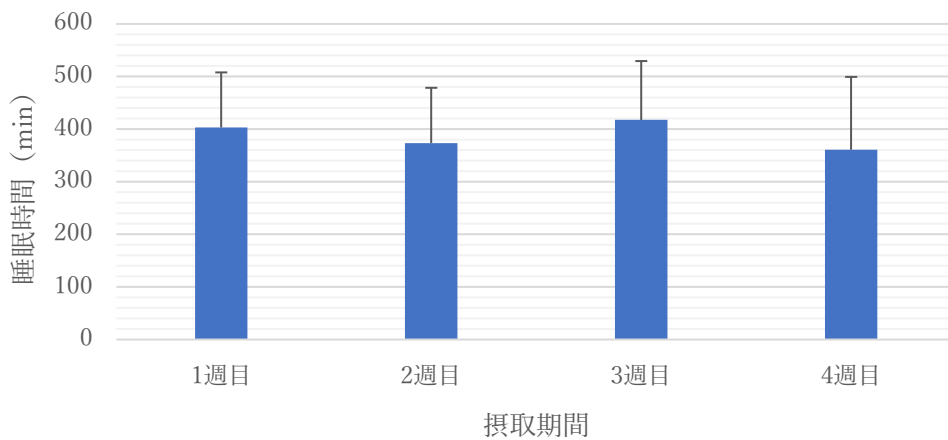


図9 睡眠時間 (女)



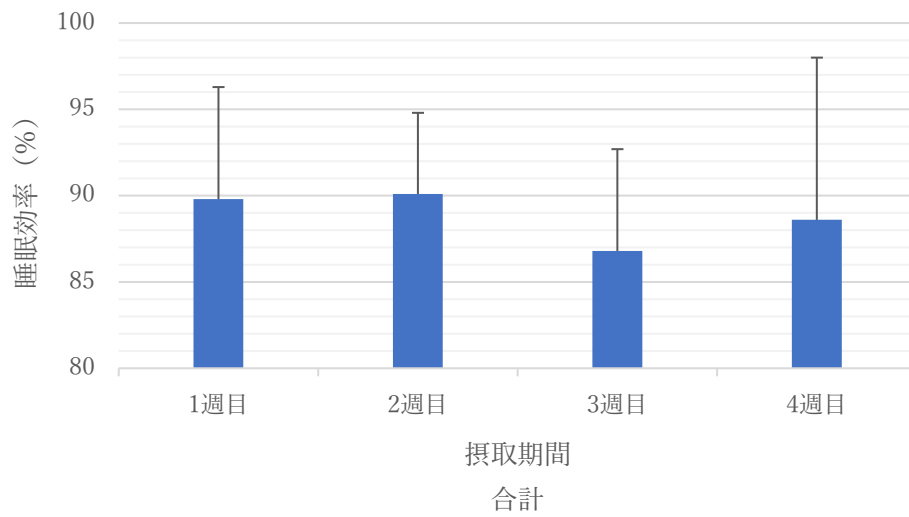


図 10 睡眠効率 (合計)

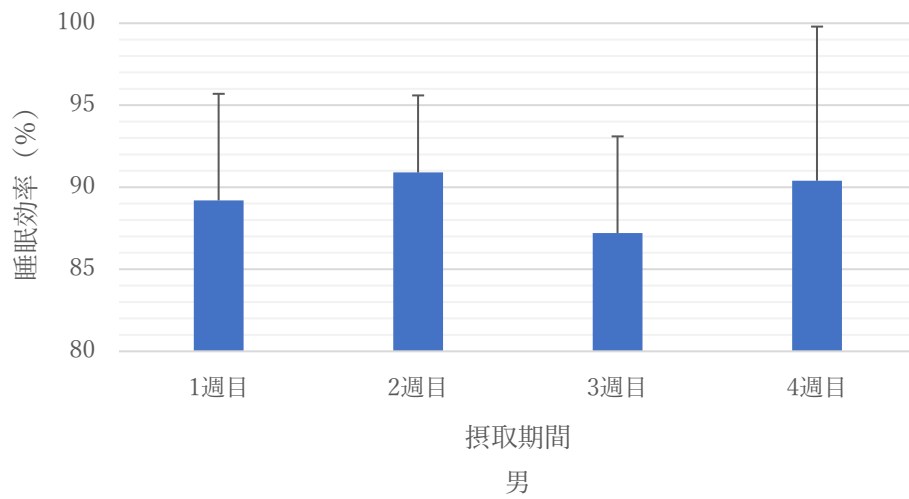


図 11 睡眠効率 (男)

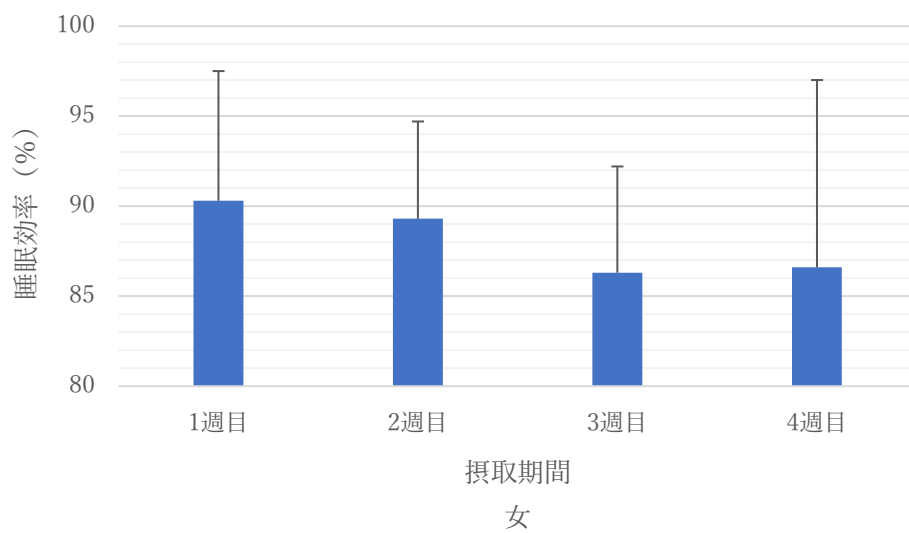


図 12 睡眠効率 (女)

睡眠日誌アンケートから、起床時眠気・入眠と睡眠維持・夢見・疲労回復・睡眠時間を標準化得点化させたものが図13,14,15である。これらも1か月を4週に分け、男女別と合計を算出した。結果、起床時眠気は低減され夢見もよくなる傾向にあった。疲労回復や睡眠時間は男性のほうが向上しているが、統計的に有意な差は見られなかった。

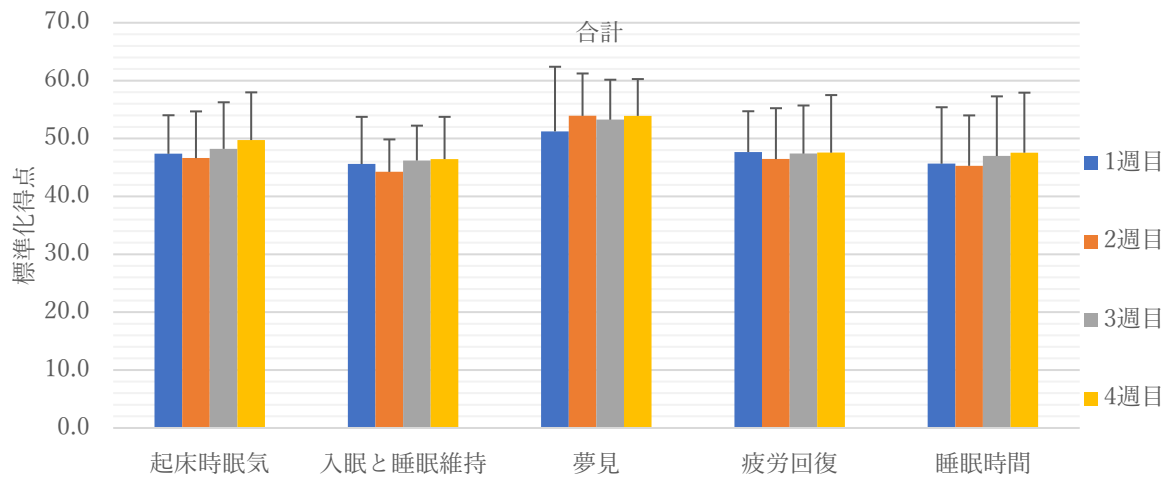


図13 標準化得点 (合計)

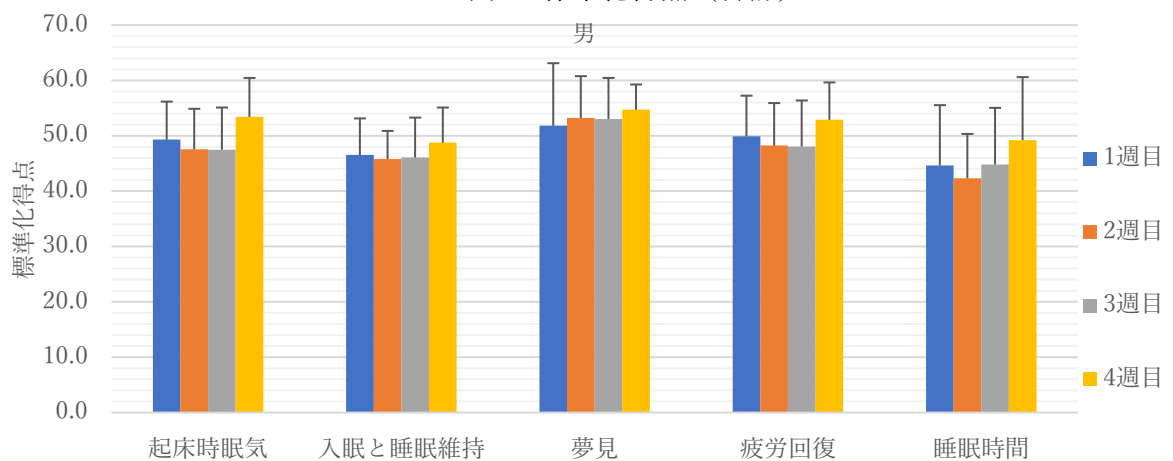


図14 標準化得点 (男)

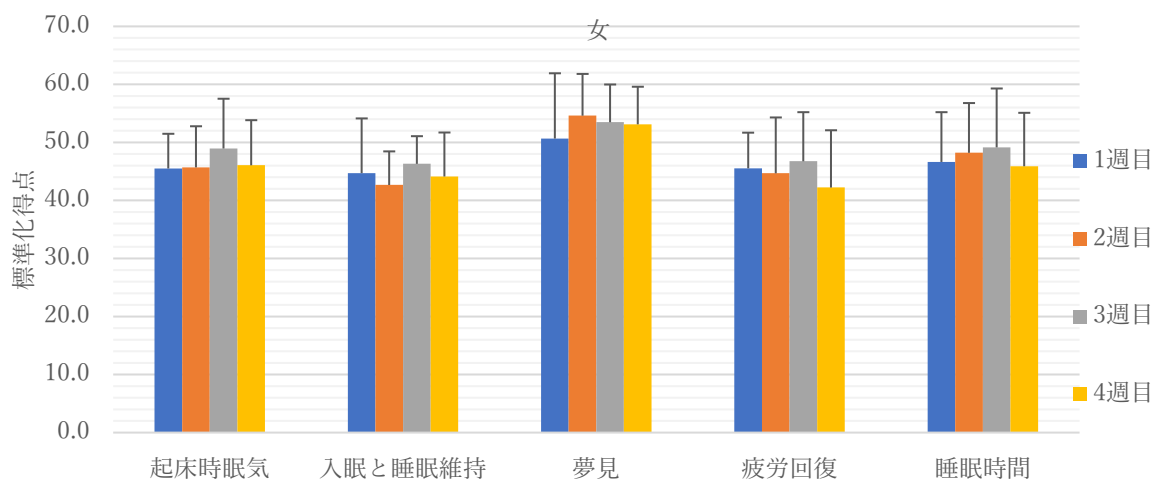


図15 標準化得点 (女)

図 16 から 21 は活動量計のグラフを解析ソフトであるアクチライフを用いて手動で睡眠量を計測したものである。判定を一定にするため計測は同じヒトが行った。

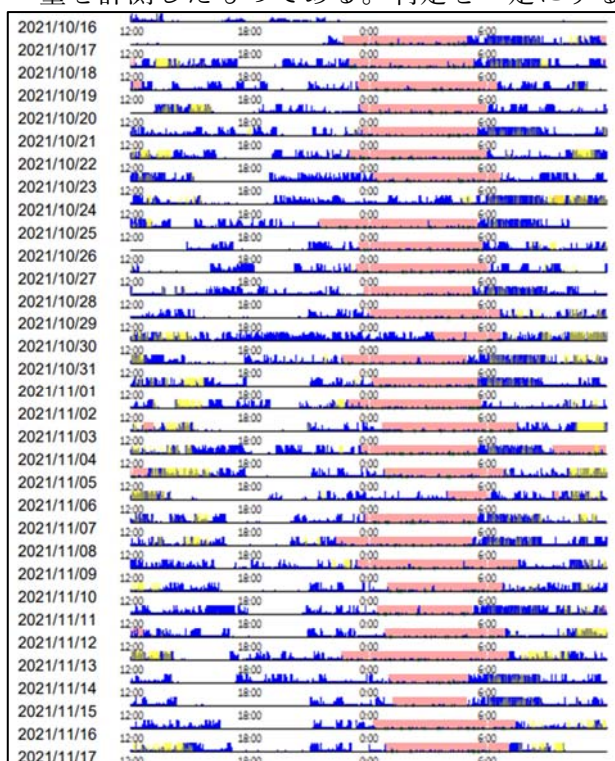


図 16 活動量計・睡眠量の結果 Sub1

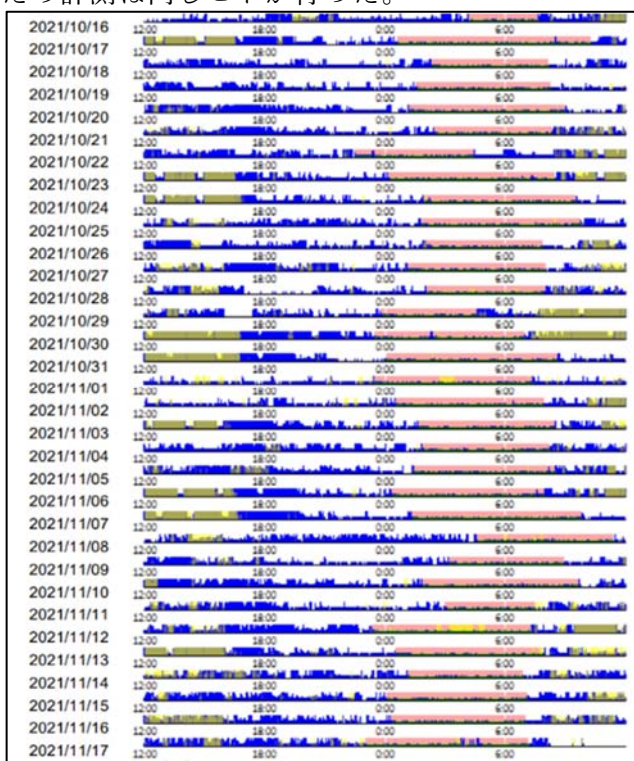


図 17 活動量計・睡眠量の結果 Sub2

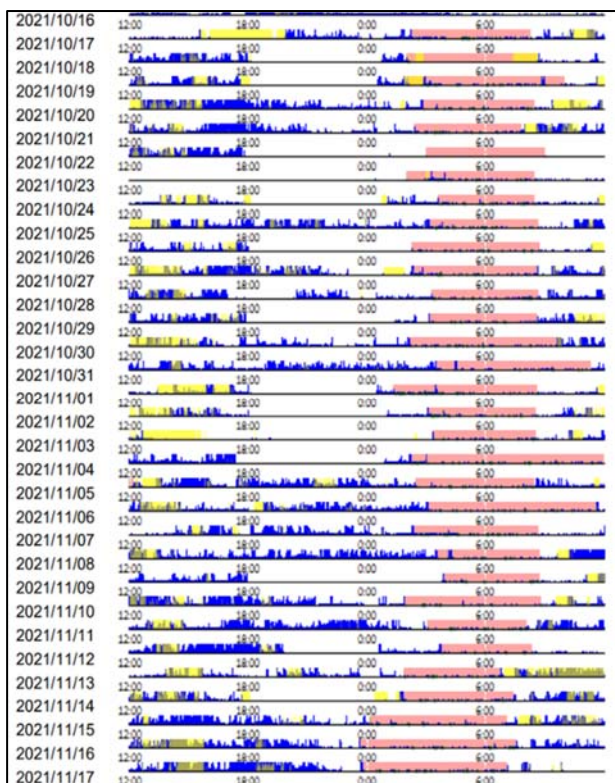


図 18 活動量計・睡眠量の結果 Sub3

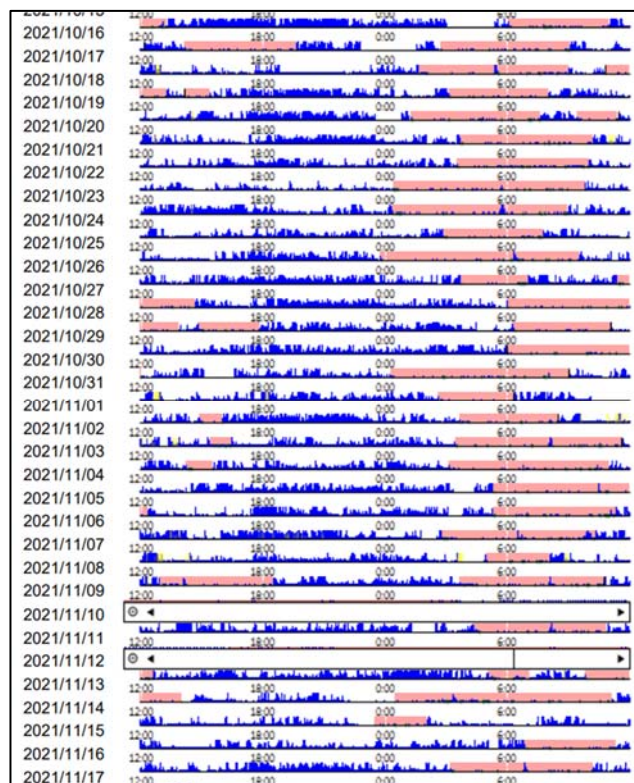


図 19 活動量計・睡眠量の結果 Sub4

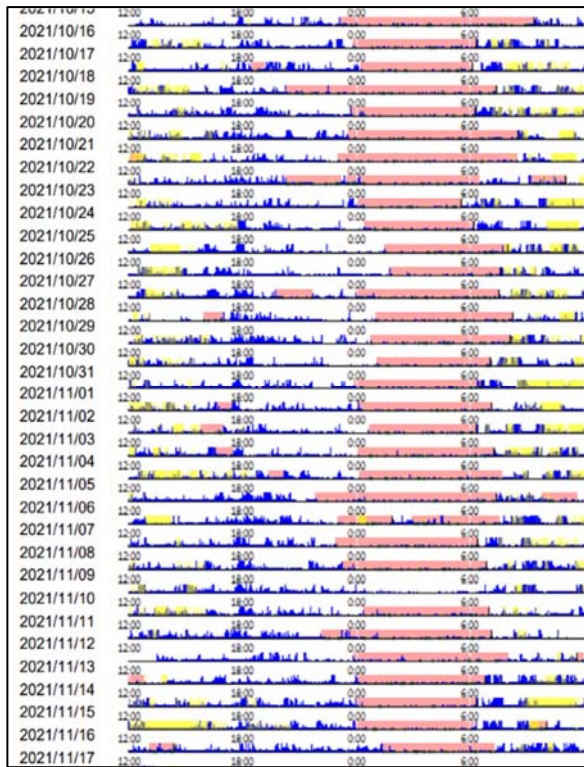


図 20 活動量計・睡眠量の結果 Sub5

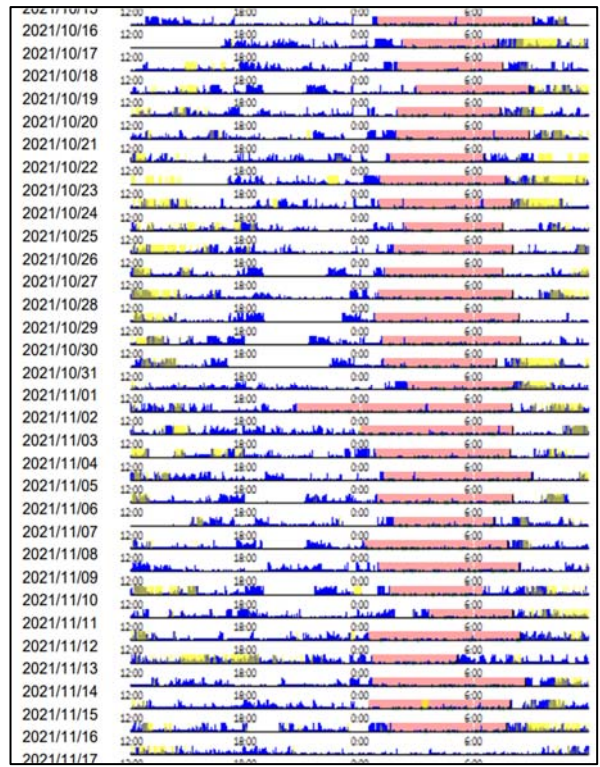


図 21 活動量計・睡眠量の結果 Sub6

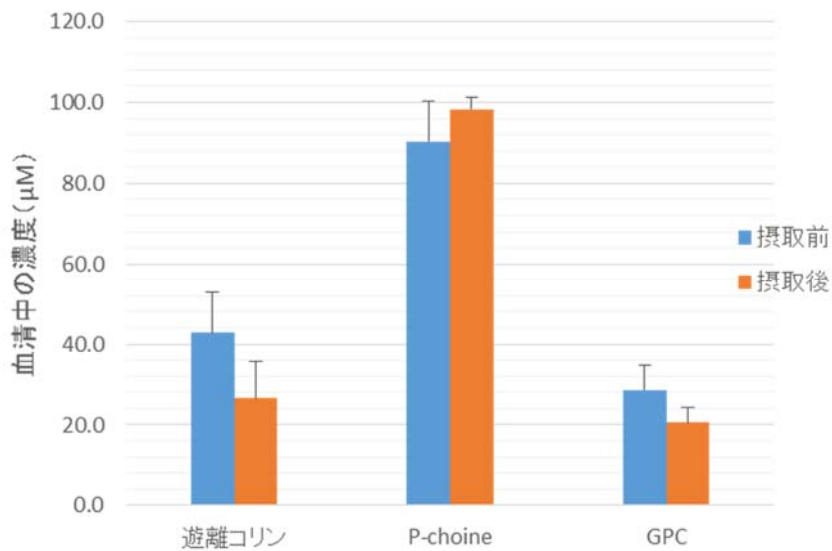


図 22 長期牛乳摂取試験前後での水溶性コリン化合物の変化

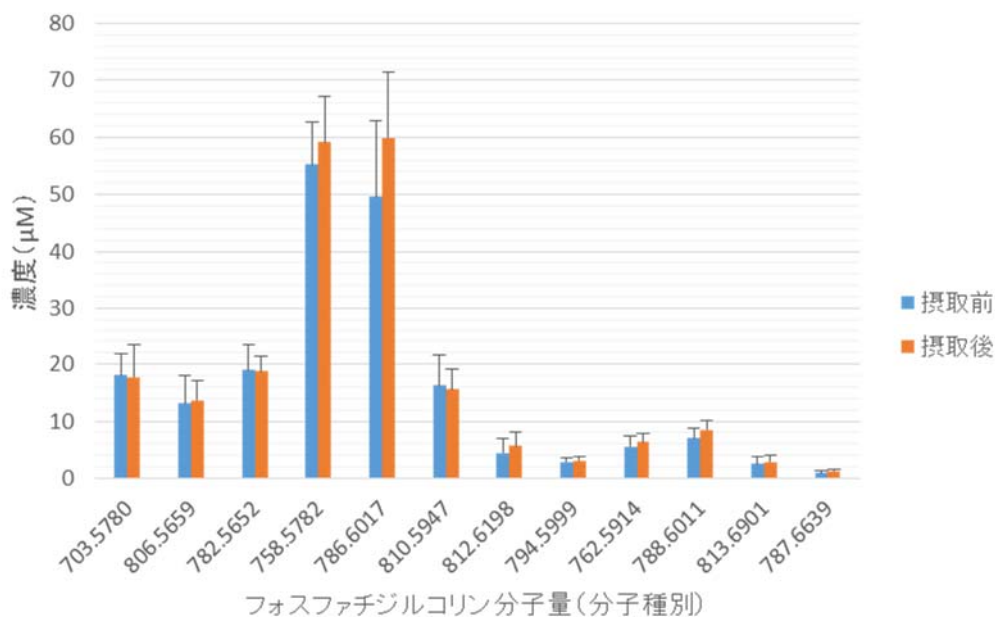


図 23 長期牛乳摂取試験前後での脂溶性コリン化合物の変化

図 22,23 より長期に牛乳を摂取した時の血中コリン化合物の濃度への影響を見た結果、水溶性コリン化合物ではあまり影響が見られず、脂溶性コリン化合物では含油量の多い分子量 758、786 のホスファチジルコリンが有意差は認められなかったが、上昇傾向にあった。

#### IV 考察

乳製品を摂取することで一過的に  $5\mu\text{M}$  程度と僅かではあるが、血中の水溶性コリン化合物の濃度が上昇した。また、牛乳を長期摂取した場合も、脂溶性コリン化合物の血中濃度が有意差は認められなかったが増加傾向を示した。このことは、日常的に乳製品を取り続けると、コリン化合物補給には一つの有効な食材である可能性が示唆された。

一方、牛乳を継続的に長期摂取している人と摂取していない人では、睡眠の質が異なるのではないかと考えた。長期摂取している人のほうが睡眠の質が良いのではないかと考えた。巷では、ホットミルクを摂取すると、睡眠に良いとも言われている。

今回の結果では、牛乳に含まれるコリン化合物の長期的摂取における睡眠効率に有意な差は見られなかったため、牛乳の長期摂取が睡眠効率を上げる直接的な原因になるという結論は得られなかった。しかし、前述の通り、牛乳を摂取すると僅かな変化ではあるが、血中のコリン化合物濃度が上昇する傾向が確認されている。

牛乳は食品であるため、医薬品のような薬効は認められない。このことは、牛乳の長期摂取よりも普段の生活リズムの影響の方が大きいことが示唆される。故に、今回のように学生を被験者にするよりも、ある程度生活リズムの乱れが少ない被験者で実験を行うと異なる結果が得られる可能性がある。更に、昼寝などの短時間の睡眠効率は低いため、昼寝

時の睡眠効率と就寝時の睡眠効率を平均すると値が低くなる傾向にあったことから、昼寝時の睡眠効率を含めない場合では結果が変わる可能性が考えられた。

睡眠日誌アンケートからは、起床時眠気は低減され夢見もよくなる傾向にあった。一方、疲労回復や睡眠時間は統計的に有意な差は見られなかった。そして、明確ではないが性差があるように感じられた。男性のほうが睡眠の改善を体感していることから女性よりコリン化合物摂取の影響を受けやすいのではないかと考えた。もしくは、女性は産褥期にコリン化合物を必要とするため、男性よりも必要量が多く今回の牛乳だけでは十分にコリン化合物を摂取できなかつたとも考えられる。このことから、睡眠効率の性差とコリン化合物の摂取について今後も引き続き検証する必要があると考える。

今回は、睡眠効率（生理的な変化）に着目したところ有意な差は見られなかった。しかし、特に牛乳は一過的な摂取でも長期摂取でも血中のコリン化合物濃度を上昇させる可能性がある。そして、アンケート結果から寝起きや夢見などの改善効果が体感されているため、コリン化合物を普段の食事から摂取することで活動的になり、健康維持のためにも大切である可能性が示唆される。

本実験の限界点として、被験者が少ないためn数を増やすことが今後の課題になる。今後も被験者数を増やすことにより詳細な睡眠解析とコリン化合物摂取との関係性を統計的に検証していく必要がある。

## V 謝辞

本研究を進めるにあたり、東北工業大学の辛島彰洋先生と大堀萌奈さんには、睡眠の解析ソフトや解析方法などでお世話になりました。採血では仙台大学の福田伸雄先生にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。最後に被験者としてご協力いただいた皆様にも、心より感謝の意を表します。

## VI 参考文献

- 1) *Nutr Rev.*2006,64(4),p197-203.
- 2) *FASEB J.*1991,5(7),p2093-8.
- 3) 脳と精神の医学 1999,10,p401-409