

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

6. 葉酸の体内動態の評価についての基礎的研究

分担協力者 渡邊敏明 兵庫県立大学 教授
研究協力者 榎原周平 兵庫県立大学 助手
研究協力者 福井 徹 病体生理研究所 研究員

研究要旨

ヒトの健康と密接に関係している水溶性ビタミンの一つである葉酸が、近年、胎児の神経管閉鎖障害や中高齢者の動脈硬化症の発症とかかわりのあることが明らかになりつつある。このため、生体内での葉酸状態を知ることは、健康の維持および生活習慣病などを予防する上で重要であると考えられる。

本研究は、臨床検査において使用されている葉酸定量法について比較検討し、葉酸の定量法を確立した後、葉酸摂取量と血清葉酸量との関連および葉酸化合物の生体内での存在形態についての基礎的な検討を行ったものである。また、葉酸欠乏動物を作成し、血液中の葉酸動態とアミノ酸代謝について解析し、葉酸の体内動態について考察を行った。

まず、微生物学的定量法と化学発光法におけるヒト血清葉酸量の測定結果を比較検討したところ、複数の葉酸化合物が存在する生体試料を測定するには、微生物学的定量法が有効であることを示した。この測定法を利用して、ヒト血液中の葉酸化合物の存在を検討したところ、赤血球では、血清などの液体成分に多量に存在するメチル葉酸の取り込みが行われている可能性のあることを明らかにした。血清葉酸量が一時的な葉酸の摂取状態を表す鋭敏な指標となるが、葉酸摂取量が普通程度の場合には、よい指標とならなかった。しかし、血清葉酸量とホモシステイン量の関係を見たところ、血清葉酸量が基準値以下ではホモシステイン量が多いという傾向が見られた。このことから、ホモシステインが生体内の葉酸の栄養状態を表す指標として用いることが可能であることを明らかにした。これらの知見を基に、実験動物を利用して、血清の葉酸量とアミノ酸量の関係を詳細に検討したところ、葉酸が欠乏すると、血清葉酸量の低下とともに、アミノ酸代謝が影響を受け、セリン濃度が高くなり、グリシン濃度が低下した。このことから、葉酸欠乏状態では、血清ホモシステイン量に加え、血清アミノ酸のセリンとグリシン比から生体内の葉酸の栄養状態を示す明白な指標となることが明らかした。

A. 目的

古来から医食同源といわれているように、私たちの健康は、食生活と深い関連を持っている。近年、食生活の変化にともない、生活習慣病が増加しつつある。一方、サプリメントの普及により、ビタミンの欠乏症は少なくなってきたが、食生活のアンバランスによる潜在性欠乏症が問題となっている。また、ビタミンが遺伝的疾患や生活習慣病と関わりがあることなどが明らかにされ、これまで知られていなかったビタミンの新しい機能が注目されている。

水溶性ビタミンの1つである葉酸は、N-ヘテロ環のプテリンと p-アミノ安息香酸からなるプテロイン酸に1から7個のグルタミン酸が結合したプテロイル（ポリ）グルタミン酸（プテロイル葉酸）である。天然型の葉酸は、還元型でジヒドロ体かテトラヒドロ体に種々の一炭素単位が結合した形、およびこれらのポリグルタミン酸塩として、すべての動植物の組織中に葉酸化合物として分布する。

還元型葉酸は、補酵素型と呼ばれ、ヌクレオチド類の生合成や分解、グリシンやセリンなどのアミノ酸の代謝、メチル基転移反応、ヒスチジン代謝などに関与していることが明らかにされている。また、モノグルタミン酸型は血漿、尿、脳脊髄液などの体液循環型として機能し、組織内に存在するポリグルタミン酸型はタンパク質に結合して機能している。これらの化合物は、核酸の成分であるプリンやピリミジンの生成に不可欠であることから、細胞の分裂や機能を正常に保つために重要な役割を果たしている（図1）。

食品に含まれる葉酸は、主にポリグルタミン酸型であり、小腸粘膜上で、コンジュガーゼによって、モノグルタミン酸型へ速やかに分解される。その後、葉酸レセプターと結合して小腸粘膜を通過し、小腸細胞内で還元され、テトラヒドロ型に変換される。テトラヒドロ型は、さらにメチル化されてメチルテトラヒドロ葉酸（メチル葉酸）となり小腸粘膜を透過して、血液により末梢組織に運ばれる。肝臓や組織に取り込まれたメチルテトラヒドロ葉酸は、メチオニン生合成系においてメチル基供与体として関与する。この反応には、メチオニンシン

ターゼと補酵素としてビタミン B₁₂ が関与している。またプテロイルポリグルタミンシンターゼなどによりメチルテトラヒドロポリグルタミン酸型として貯蔵される。

葉酸はヒトの健康と密接に関係し、様々な研究が進められている。妊婦において葉酸が不足すると、出産児に神経管閉鎖障害 (neural tube defects:NTDs)を発症することが報告されている。しかし、受胎前後に十分に葉酸を摂取することによって、神経管閉鎖障害の発症リスクを低減することができる¹⁻⁴⁾。このため、米国ではすでに穀類に葉酸が添加されている。また、わが国でも、妊娠前から 400μg/日の葉酸を摂取することが推奨されている。

最近、高ホモシステイン血症が、脳血管疾患や心疾患のリスクファクターとして注目されている。葉酸はホモシステインからメチオニンの転移に不可欠であるため、葉酸の摂取量が低下すると、血漿ホモシステインの上昇がみられることから、ホモシステインが血管内皮細胞や血液凝固因子に影響していると考えられている⁵⁾。このように、葉酸は、神経管閉鎖障害や動脈硬化症、癌の発症とも関わっており、生体内での葉酸状態を知ることは、健康の維持および生活習慣病や他の疾患を予防する上で重要である⁶⁻⁸⁾。

葉酸測定法には、微生物学的定量法 (Bioassay) や化学発光酵素免疫測定法 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay, CLEIA: 化学発光法)、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) などがある。しかし、これら測定法の基準値 (正常値) や測定結果に違いが見られている。

そこで、本研究では、1) 臨床検査において使用されている化学発光法と微生物学的定量法の測定結果について比較検討した。2) 女子学生を対象に血清葉酸量の測定および食事調査を行い、葉酸摂取量と血清葉酸量との関連を検討した。3) 生体内の葉酸化合物の存在形態について検討した。4) 葉酸欠乏動物を作成し、血液中の葉酸動態とアミノ酸代謝について検討した。そして、これらの結果から、葉酸の体内動態の評価について考察を行った。

B. 実験方法

実験 1. 葉酸測定法の違いによる血清葉酸量の比較検討

様々な葉酸測定法がある中で、一般的に微生物学的定量法や化学発光法が臨床検査において用いられる。しかし、これら測定法の基準値（正常値）や測定結果に違いが見られるなどの問題がある。そこで、これら葉酸測定法について比較検討した。

健康な女子学生 58 名の血清を測定試料とした。被験者から採血し、血清を分離後、凍結保存した。この血清を微生物学的定量法および化学発光法により測定し、これらの測定結果について比較検討した。化学発光法による分析には、全自動免疫測定システム（イムライズ、三菱化学ヤトロン社）を用いた。

統計解析はエクセル統計 2000 を用い、無相関の検定により相関係数を求めた。

微生物学的定量法^{9,10)}

2 種の乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC27773(*L.casei*) および、*Streptococcus faecalis* ATCC8043(*S.faecalis*) を定量菌とした（表 3）。*L.casei* は、プテロイル葉酸、メチル葉酸など全ての化合物に活性を持っているが、*S.faecalis* はメチル葉酸に対する活性を持たない。そこで、これらの測定法の特徴を利用し、サンプル中の総葉酸とメチル葉酸の定量を行った。

定量菌を MRS 培地に接種し、37℃、24 時間培養し、菌体を滅菌生理食塩水で洗浄した。*S.faecalis* は 10 倍に希釈し、20 μ l/ml の割合で葉酸定量用培地に懸濁した。*L.casei* は 500 倍に希釈し、100 μ l/ml の割合で葉酸定量用培地に懸濁した。それぞれの培地を 96 穴マイクロプレートに 200 μ l ずつ分注した（表 4）。14.0 mg のプテロイル葉酸を 0.1M NaOH 2.8 ml により溶解後、超純水で 100ml に定容量したもの標準液とした。この標準液を 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で 0.5 ng/ml に希釈し、プレートに（0.5,10,15,20,25,30,40 μ l）添加した。測定試料は、0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で希釈し、フィルター（孔径 0.45 μ m）により不純物を取り除き、50 μ l ずつ添加し、37℃、*S.faecalis* では 24 時間、*L.casei* では 72 時間培養した。その後、それぞれの定量菌の検量線から試料中の葉酸量を測定した。

化学発光法

葉酸化合物は、DPC 社のイムライズ葉酸測定キットを用いて、測定を行った。プテロイル葉酸を標準物質とし、プテロイル葉酸に対する抗体を固相としたビーズに、サンプル、酵素標識抗体、発光基質を加えて反応させ、その発光量を測定し、検体中の葉酸濃度を求めた。

実験 2. 健康成人における血液中の葉酸化合物の形態

実験 2 から、葉酸摂取量や血清葉酸量では生体内での葉酸の栄養状態を把握することが出来なかった。そこで、実験 3 では、血液中の葉酸量およびその化合物を測定し、葉酸化合物の存在形態から、血液中の葉酸状態の基礎的な検討を行った。

健康な成人男女 30 名の全血液および血漿を採取した。全血液は 1%アスコルビン酸溶液で 10 倍に希釈し、血漿は 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で 2 倍に希釈し、-40℃で保存した。これらを測定試料とし、微生物学的定量法により全血液および血漿中の総葉酸量、メチル葉酸量を測定した。また、全血液と血漿葉酸量の差から、赤血球中の総葉酸量、メチル葉酸量を求めた。統計解析はエクセル統計 2000 を用い、無相関の検定により相関係数を求めた。

実験 3. 成人女性における血清葉酸量と葉酸摂取量の関係

葉酸は生体内で生成することがほとんど出来ないため、食事やサプリメントから摂取しなければならない。しかしながら、摂取された葉酸の生体内での吸収や排泄などの動態はよくわかっていない。そこで、食事からの葉酸摂取量と血清葉酸量の関係から、葉酸の生体利用率を考察した。さらに、血清葉酸量とホモシステイン量の関連について検討した。

実験 1 の被験者のうち、55 名の血清を測定試料とし、血清葉酸量を微生物学的定量法により測定した。また、葉酸摂取量は、採血前の 3 日間の食事記録調査を行い、葉酸摂取量をエクセル栄養君 Ver.3.0 を用いて算出した。ホモシステイン量は化学発光法により測定した。

統計解析はエクセル統計 2000 を用い、無相関の検定により相関係数を求めた。

実験 4. 葉酸欠乏動物における血液中の葉酸動態とアミノ酸代謝

これまで、血液中の葉酸量およびその化合物を測定し、葉酸化合物の存在形態から、血液中の葉酸状態について検討を行い、葉酸摂取量との関連を考察した。そこで葉酸欠乏動物を用い、その血液中の葉酸量を調べ、生体内での葉酸動態について検討を行った。

実験には、8 週齢の雌マウス（平均体重 30.9 g, n=11）を使用した。この雌マウスを一般試料で飼育し、12 週齢で雄マウスと交配させ、妊娠動物を得た。そして、妊娠マウスに葉酸欠乏飼料を与えた。このマウスから得られた出生児を 3 週で離乳させ、欠乏飼料群（n=10）および対照飼料群（n=7）に分けて、6 週間飼育した。飲料水には蒸留水を使用し、飲料水と飼料は自由に摂取させた。なお、葉酸対照飼料は、葉酸欠乏飼料 100g に対して 20mg の葉酸を添加したものをを用いた。

雄マウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、心臓から採血し、血清を分離した。その全血液および血清を微生物学的定量法により測定した。また、全血液の葉酸量と血清葉酸量の差から、赤血球葉酸量を求めた。

血清アミノ酸量は、血清を除いた後、アミノ酸分析システム（高速液体クロマトグラフィ(HPLC)）により測定し、血清葉酸量との関係について検討した。

統計解析はエクセル統計を用い、対応のない 2 群間の差をウェルチの t 検定およびマン・ホイットニ検定により解析を行った。

アミノ酸分析法

カラムは Li 型イオン交換カラム Shim-pack Amino-Li、移動相は島津アミノ酸移動相キット Li 型を用いて分析を行った。検出は o-フタルアルデヒド(OPA)溶液を用いたポストカラム誘導体化法により、分光蛍光検出器で行った。

C. 結果および考察

実験 1

女子学生 58 名の血清葉酸量は、微生物学的

定量法では平均 17.6 ± 9.5 ng/ml、化学発光法では平均 5.4 ± 2.1 ng/ml と有意な差があった。しかし、両測定法で得られた血清葉酸量には非常に強い関連が見られた ($r=0.85, p<0.01$) (図 2)。

血清葉酸量は、文献的には、微生物学的定量法(*L.casei*)で 16.8 ± 12.6 ng/ml、化学発光法で 5.8 ± 1.8 ng/ml との報告がある^{11,12)}。今回の測定結果は、微生物学的定量法および化学発光法ともこれらの値に近似していることから、真値を示すものと考えられた。両測定法の測定結果の違いについては、微生物学的定量法では全ての葉酸化合物を測定しているのに対して、化学発光法はプテロイル葉酸しか測定していないためと考えられる。

次に、今回の微生物学的定量法で求めた総葉酸量とメチル葉酸量を比較したところ、血清にはメチル葉酸が平均 15.5 ± 9.3 ng/ml 含まれており、これは総葉酸量の 83.7 ± 10.8 %にあたる。葉酸は、血漿では、活性型のメチル葉酸として存在しているのに対して¹³⁾、細胞内では脱メチル化されたテトラヒドロ葉酸として存在している¹⁴⁾。なお、血清メチル葉酸の割合は、これまでの報告と一致している。

化学発光法は、一般に化合物に対する特異性が高く、再現性があるため、臨床検査に使われている。血清葉酸の測定には、血液中の主成分であるメチル葉酸を標準物質として測定する必要がある。しかし、安定性の高いプテロイル葉酸に比べ、メチル葉酸は不安定で標準物質として用いることが難しい。そのためプテロイル葉酸を標準物質として用いる場合、メチル葉酸の測定に対する信頼性は低い⁹⁾。また試料中にタンパク質やホルモンなどの夾雑物が含まれていると正確な測定が出来ない¹⁵⁾。そのため、同時に総葉酸量とメチル葉酸量の測定が可能である微生物学的定量法は、複数の葉酸化合物や夾雑物が含まれる血液などの生体試料の測定に有効であると考えられる。そこで、以下の実験では葉酸測定を微生物学的定量法で行った。

実験 2

血液中の総葉酸量は、平均 286.1 ± 75.5 ng/ml であり、赤血球では平均 261.2 ± 77.1 ng/ml であり、赤血球に全体の 90%が含まれてい

た。また、葉酸化合物についてみると、赤血球ではメチル葉酸が平均 240.3 ± 79.5 ng/ml であり、赤血球葉酸量の 90% がメチル葉酸型であった。血漿葉酸量は平均 25.0 ± 11.2 ng/ml であり、メチル葉酸量は平均 20.1 ± 10.6 ng/ml と、血漿葉酸量の 78% がメチル葉酸型であった (図 3)。

これまでの報告では、血漿では主にメチル葉酸、細胞内ではテトラヒドロ葉酸として存在し^{13,14)}、赤血球では 74% がメチル葉酸として存在するとされている¹⁵⁾。化学発光法は、タンパク質やホルモンなどの夾雑物が含まれていると正確な測定が出来ない。このため、この測定法は、赤血球のように膜タンパクが含まれている試料の測定には適さない。そこで、赤血球葉酸量を測定する方法としては、微生物学的定量法が有用である¹⁶⁾。赤血球は血清とは異なり、一時的な葉酸摂取量の変化に左右されず、葉酸の蓄積もしくは減少などの変化は緩やかである^{17,18)}。今回の赤血球メチル葉酸量の割合が文献と異なったことは、一時的な葉酸摂取量の増加により上昇したとは考えにくい。このことから、赤血球では、血清などの液体成分に多量に存在するメチル葉酸の取り込みが行われている可能性が考えられた。

実験 3

微生物学的定量法により測定した血清葉酸量は平均 18.0 ± 9.6 ng/ml であった。女子学生の連続 3 日間の葉酸摂取量は平均 264.1 ± 109.2 ng/ml/日 であった。また、図示しないが、摂取エネルギーが多いほど葉酸摂取量が多い傾向にあり、葉酸とエネルギー摂取量には相関が見られた ($r=0.633, p<0.01$)。

血清葉酸量と葉酸摂取量の関連を見たところ、葉酸摂取量が $400 \mu\text{g}/\text{日}$ 以下である大多数の被験者については両者に関連が見られなかった ($r=0.075$)。しかし、葉酸を $700 \mu\text{g}/\text{日}$ 以上と過剰に摂取した被験者については、1 名のみであるが血清葉酸量の増加が見られた (図 4)。一般的に血清葉酸量は短期間の葉酸の摂取状態を表すといわれている¹⁶⁾。今回の結果から、葉酸を過剰に摂取する人については、血清葉酸量が一時的な葉酸の摂取状態を表す鋭敏な指標となっている。しかし、葉酸摂取量が $400 \mu\text{g}/\text{日}$ 以下

の場合ではよい指標であるとは考えられない。

血清葉酸量とホモシステイン量の関係を見たところ、血清葉酸量が基準値 3.09 ng/ml (化学発光法) 以上ではホモシステイン量は平均 5.47 ± 1.5 n mol/ml、 3.09 ng/ml 以下では平均 8.95 ± 3.5 n mol/ml と、基準値以下ではホモシステイン量が多いという傾向が見られた (図 5)。ホモシステインは、葉酸や B_{12} などのビタミンと関連して必須アミノ酸であるメチオニンへ代謝される¹⁹⁻²¹⁾。これらのことから、葉酸の不足においては、ホモシステインからメチオニンへの代謝が正常に行われず、血清中のホモシステイン量が上昇したものと考えられる。そして、生体内での葉酸の欠乏および不足などの状態を示す指標として、血中ホモシステインを用いることが可能であることが示唆された。

実験 4

対照群と欠乏群の血中葉酸量を比較したところ、全血液中の総葉酸量については、対照群では平均 239.9 ± 13.2 ng/ml、欠乏群では平均 100.1 ± 21.2 ng/ml であり、欠乏群は対照群の葉酸量の約 41% と、有意に低値を示した ($p<0.01$) (図 6)。そこで、赤血球と血清に分けてみると、赤血球の葉酸量については、対照群では平均 182.2 ± 10.1 ng/ml、欠乏群では平均 83.5 ± 22.6 ng/ml と、約 45% に有意に減少した ($p<0.01$)。一方、血清葉酸量については、対照群では平均 57.7 ± 8.7 ng/ml、欠乏群では平均 16.6 ± 3.6 ng/ml と、欠乏群は対照群の約 28% に有意に減少した ($p<0.01$)。このように、欠乏群の血清葉酸量は、赤血球葉酸量に比べ、著しく減少していた。これまでに、マウスに葉酸欠乏飼料を 17 週間投与すると、その血清葉酸量は 8.33 ± 0.99 ng/ml と、対照群の 63.45 ± 2.05 ng/ml の 13.1% に低下したとする報告がある²²⁾。このように血清葉酸量は食事による葉酸摂取に影響されやすく、赤血球葉酸量は食事による影響を受けにくいといわれている¹⁵⁾。

このことから、血清葉酸量は葉酸欠乏や葉酸の摂取状態の鋭敏な指標となるが、葉酸摂取量に影響を受けやすいために、生体内の葉酸の栄養状態を表す指標に適さないのかもしれない。これに対し、赤血球の葉酸量は葉酸摂取量の影響を受けにくく、緩や

かに変化する。したがって、赤血球の葉酸量は、生体内の葉酸の栄養状態を示す、より有効な指標となると考えられている^{23,24)}。今回の結果からも、生体内の葉酸の栄養状態を知るには、従来の血清葉酸量ではなく、赤血球葉酸量を指標とすることが重要であることが示唆された。

次に、葉酸欠乏によるアミノ酸代謝に及ぼす影響について検討した。図 7 に示すように、対照群と欠乏群の間に有意な差が見られなかった。そこで、一炭素単位代謝系で葉酸代謝に関係する、セリンとグリシンについて検討した。セリンは、対照群では平均 198.9 ± 42.1 n mol/ml、欠乏群では平均 227.2 ± 33.9 n mol/ml と、欠乏群で高値を示した。一方グリシンは、対照群では平均 255.5 ± 19.7 n mol/ml、欠乏群では平均 203.5 ± 48.9 n mol/ml と対照群が有意に高値を示し、セリンと相反する結果となった ($p=0.029$)。

そこで、セリンおよびグリシンと血清葉酸量との関係について解析した。セリンは、血清葉酸量の増加に伴い減少する傾向が見られた ($y=-0.86x+243.3, r=-0.5$)。一方グリシンは、血清葉酸量の増加に伴い増加する傾向が見られた ($y=1.15x+189.2, r=0.58$) (図 8)。セリン、グリシン比と血清葉酸量を比較するとその傾向は顕著である ($y=0.01x+0.7, r=0.83, p<0.01$) (図 9)。一炭素単位代謝系の中でセリンは、テトラヒドロ葉酸によってグリシンへ代謝される。対照群ではセリンよりもグリシンが多くなる。よって、葉酸が欠乏するとセリンからグリシンへの代謝が正常に行われず、セリンの血中濃度が上昇し、グリシンの血中濃度が低下する²⁵⁾。このことから、血清中アミノ酸のセリンとグリシンの関係から生体内の葉酸状態を把握することが出来ることを示唆している。

まとめ

本研究は、葉酸の定量法を確立し、血液中の葉酸化合物の存在形態および葉酸の体内動態についての基礎的な検討を行った。また、葉酸摂取量と血清葉酸量との関連を検討した。

1. 葉酸測定法の違いによる血清葉酸量の比較検討

微生物学的定量法と化学発光法における

ヒト血清葉酸量の測定結果を比較検討したところ、微生物学的量法では平均 17.6 ± 9.5 ng/ml、化学発光法では平均 5.4 ± 2.1 ng/ml と差異があったが、両測定法には非常に強い相関が見られた ($r=0.85, p<0.01$)。この差は、全ての葉酸化合物を測定する微生物学的定量法と、特定の葉酸化合物（プテロイル葉酸）のみを測定する化学発光法の違いによるものと考えられる。そのため、複数の葉酸化合物が存在する生体試料を測定するには、微生物学的定量法が有効であると考えられた。

2. 血清葉酸量と葉酸摂取量の関係

血清葉酸量と葉酸摂取量の関連を見たところ、葉酸の摂取量が $400 \mu\text{g}/\text{日}$ 以下である被験者については関連が見られなかった。しかし、葉酸を $700 \mu\text{g}/\text{日}$ 以上と過剰に摂取した被験者については、血清葉酸量の増加が見られた。このことから、葉酸を過剰に摂取する人については、血清葉酸量が一時的な葉酸の摂取状態を表す鋭敏な指標となるが、葉酸摂取量が普通程度 ($400 \mu\text{g}/\text{日}$) の場合には、よい指標とならないことが考えられた。

血清葉酸量とホモシステイン量の間関係を見たところ、血清葉酸量が基準値 3.09 ng/ml (化学発光法) 以下ではホモシステイン量が多いという傾向が見られた。このことから、ホモシステインが生体内の葉酸の栄養状態を表す指標として用いることが可能であると考えられた。

3. 血液中の葉酸化合物の形態

ヒト血液中の葉酸化合物の存在について検討したところ、全血液に含まれる総葉酸量の 90% が赤血球に含まれ、さらに赤血球では 90% がメチル葉酸型で存在していた。このことから、赤血球では、血清などの液体成分に多量に存在するメチル葉酸の取り込みが行われている可能性が考えられた。

4. 葉酸欠乏動物における血液中の葉酸動態とアミノ酸代謝

葉酸対照群と欠乏群の血中葉酸量を比較したところ、欠乏群の赤血球葉酸量は、対照群の 45% 程度であった。しかし、欠乏群の血清葉酸量は、対照群の 28% 程度とさらに低値を示した。そのため、生体内の葉酸の栄養状態を知るには、葉酸摂取量の影響を受けにくい赤血球の葉酸量を指標とするこ

とが重要であるということが示唆された。血清の葉酸量とアミノ酸量の関係について検討したところ、葉酸が欠乏するとセリン濃度が高く、グリシン濃度が低い傾向が見られた。このことから、血清アミノ酸のセリンとグリシン比から生体内の葉酸の栄養状態を示す明白な指標となることが示唆された。

D. 健康危機情報

特記する情報なし

E. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 引用文献

1. Finnell RH, Spiegelstein O, Wlodarczyk B, Triplett A, Pogribny IP, Melnyk S, James JS. DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J. Nutr.* 132: 2457-2461, 2002.
2. Brown JE, Jacobs DR, Hartman TJ, Barosso GM, Stang JS, Gross MD, Zeuske MA. Predictors of red cell folate level in women attempting pregnancy. *J. Am. Med. Assoc.* 277: 548-552, 1997.
3. Czeizel AE, Dudas I, Metneki J. Pregnancy outcomes in a randomized controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch. Gynecol. Obstet.* 255: 131-139, 1994.
4. Anonymous. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 338: 131-137, 1991.
5. Jacob A, Wu M, Henning SM, Swendseid ME. Homocysteine increases as folate

decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J. Nutr.* 124: 1072-1080, 1994.

6. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J. Am. Med. Assoc.* 274: 1049-1057, 1995.
7. Fohr IP, Langenohl RP, Bronstrup A, Bohlman AM, Nau H, Berthold HK, Pietrzik K. 5,10 -Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 275-282, 2002.
8. Jennings E. Folic acid as a cancer-preventing agent. *Med. Hypotheses.* 45: 297-303, 1995.
9. Tamura T. Microbiological assay of folates. *Health Disease* 121-137, 1990.
10. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods in Enzymology* 281: 43-53, 1997.
11. 田中信夫, 山崎泰範, 山田尚ほか ビタミン B12・葉酸の測定とその臨床的意義. *臨床病理* 26: 554-563, 1981.
12. 石渡幸久, 遠藤紀子, 池田律子, 安田和人 新標準試料を用いた Non boil radioassay による血清ビタミン B12・葉酸の測定. *核医学* 31: 619-627, 1994.
13. Stokstad EL. New York: Wiley-Liss pp.1-5. 1990.
14. Shane B. Folylpolylglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam. Horm.* 45: 263-335, 1989.
15. Venn BJ, Green TJ, Moser R, McKenzie JE, Skeaff CM, Mann J. Increases in blood folate indices are similar in women of childbearing age supplemented with (6S)-5-methyltetrahydrofolate and folic acid. *J. Nutr.* 132: 3353-3355, 2002.
16. Clifford AJ, Noceti EM, Block-Joy A, Block TG. Erythrocyte folate and its response to folic acid supplementation is assay dependent in women. *J. Nutr.* 135: 137-143, 2005.

17. Quere I, Zittoun J, Gris JC, Janbon C, Moerloose P. Measurement of red blood cell methylfolate. *Lancet* 360: 1021-1022, 2002.
18. Milne DB, Johnson LAK, Mahalko JR, Sandstead HH. Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutriture. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 768-773, 1983.
19. Klee G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. *Clin. Chem.* 46: 1277-1283, 2000.
20. Ray JK, Cole DEC, Boss SC. An Ontario-wide study of vitamin B12, serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: Is a preventable public health issue on the rise? *Clin. Bio.* 33: 337-343, 2002.
21. O'keefe CA, Bailey LB, Thomas EA, Hofler SA, Davis BA, Cerda JJ, Gregory JF. Controlled dietary folate affects folate status in nonpregnant women. *J. Nutr.* 125: 2717-2725, 1995.
22. Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J. Nutr.* 134: 162-166, 2004.
23. Haltmayer M, Mueller T, Poelz W. Erythrocyte mean cellular volume and its relation to serum homocysteine, vitamin B12 and folate. *Acta Med. Austriaca* 29: 57-60, 2002.
24. 渭原博 葉酸ならびにビタミン B12 の栄養生化学と臨床検査 日本臨床栄養学会雑誌 25(4):273-279, 2004.
25. Stam F, Smulders YM, van Guldener C, Jakobs C, Stehouwer CD, de Meer K. Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects. *Clin. Sci.* 2005.

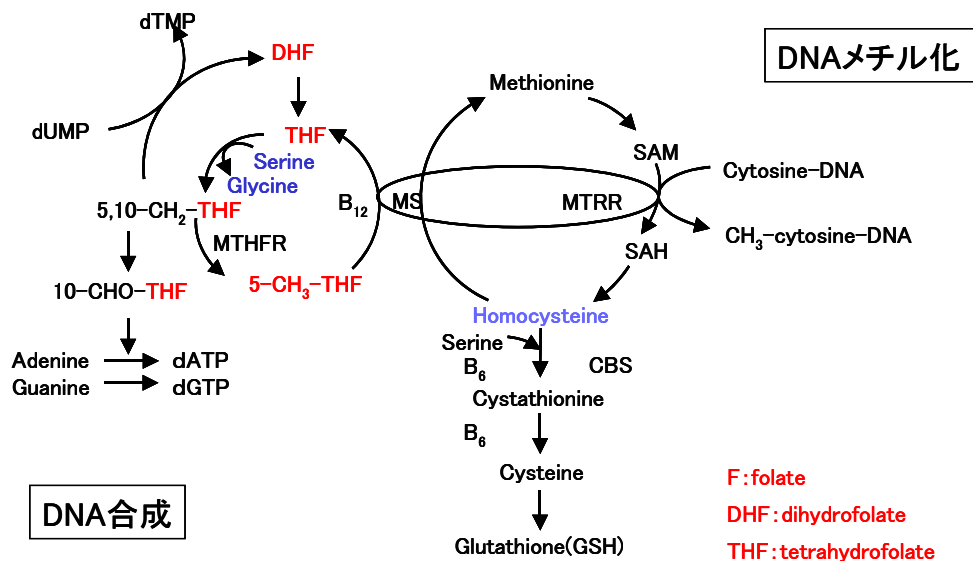


図 1. 葉酸の関連する一炭素単位代謝系

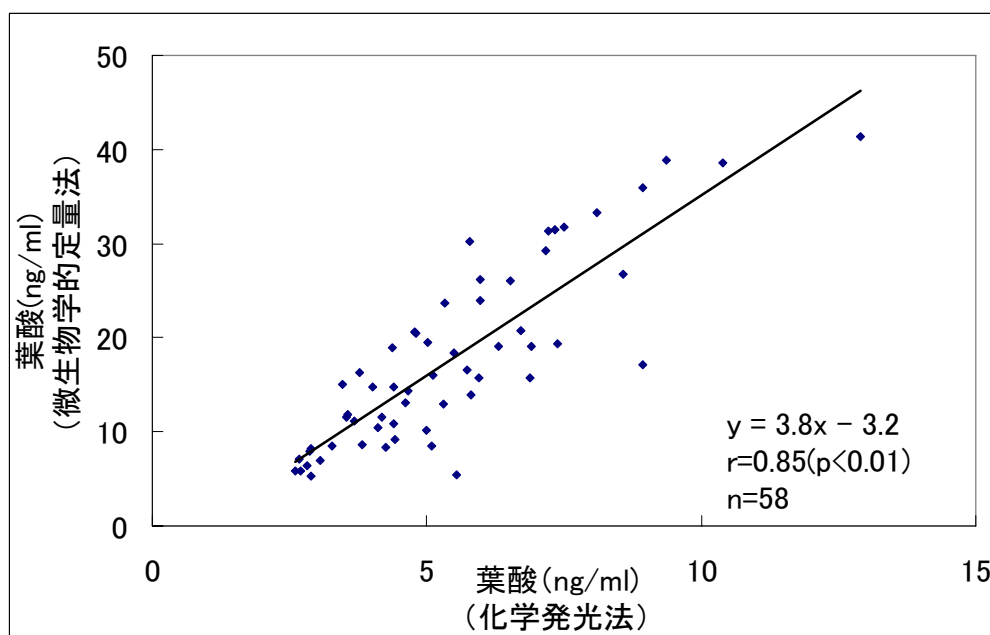


図 2. 微生物学的定量法と化学発光法によるヒト血清葉酸量の比較

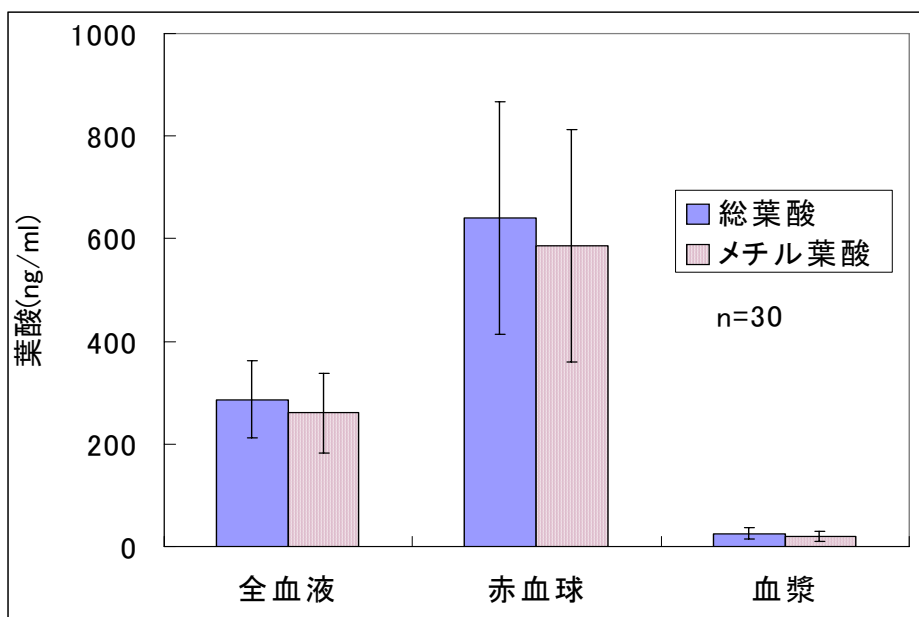


図 3. 血液中の葉酸化合物の形態

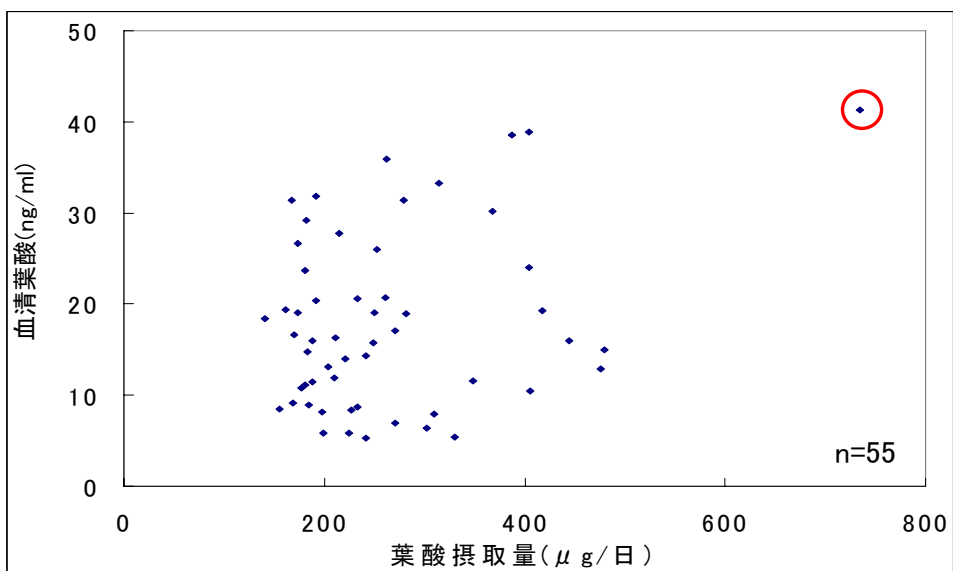


図 4. 血清葉酸量と葉酸摂取量の関係

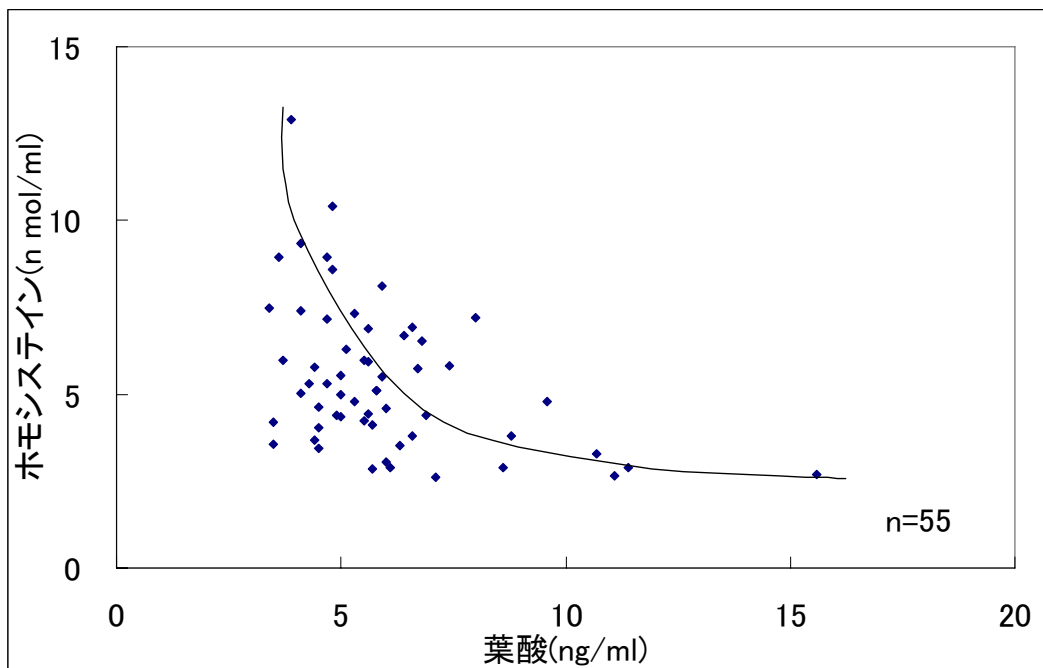


図 5. 血清葉酸量とホモシステイン量の関係

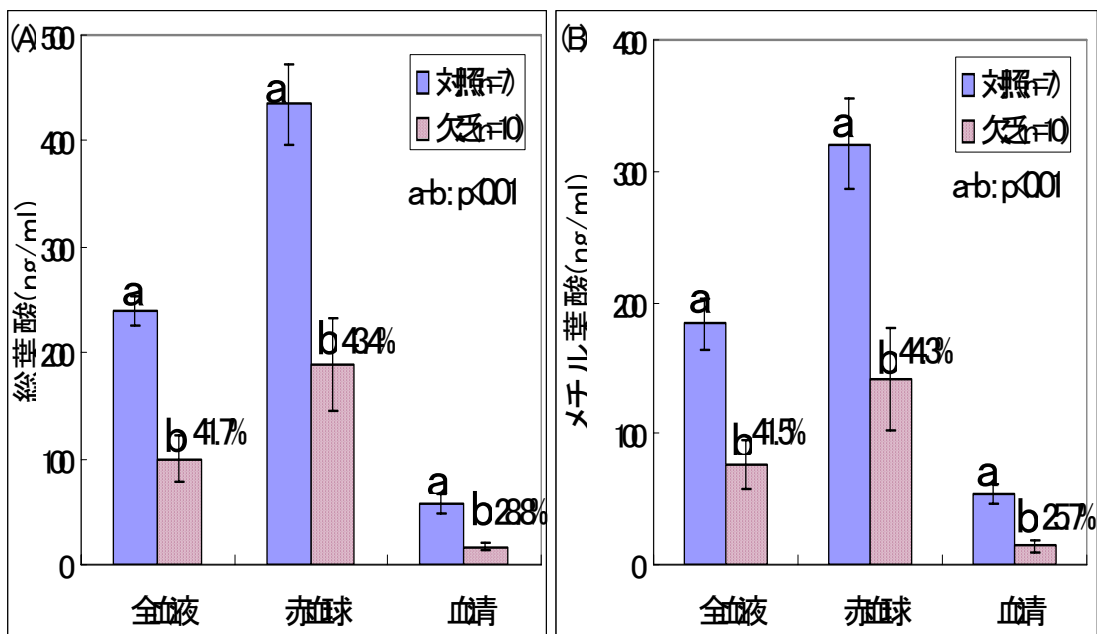


図 6. 血液中の葉酸動態

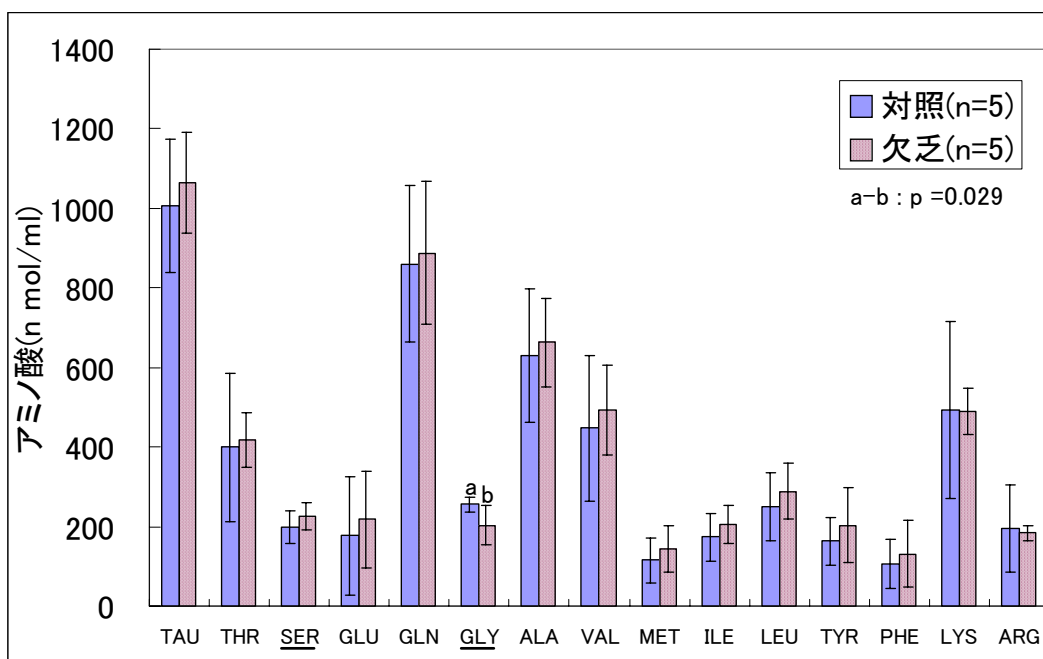


図 7. 血清アミノ酸量の変化

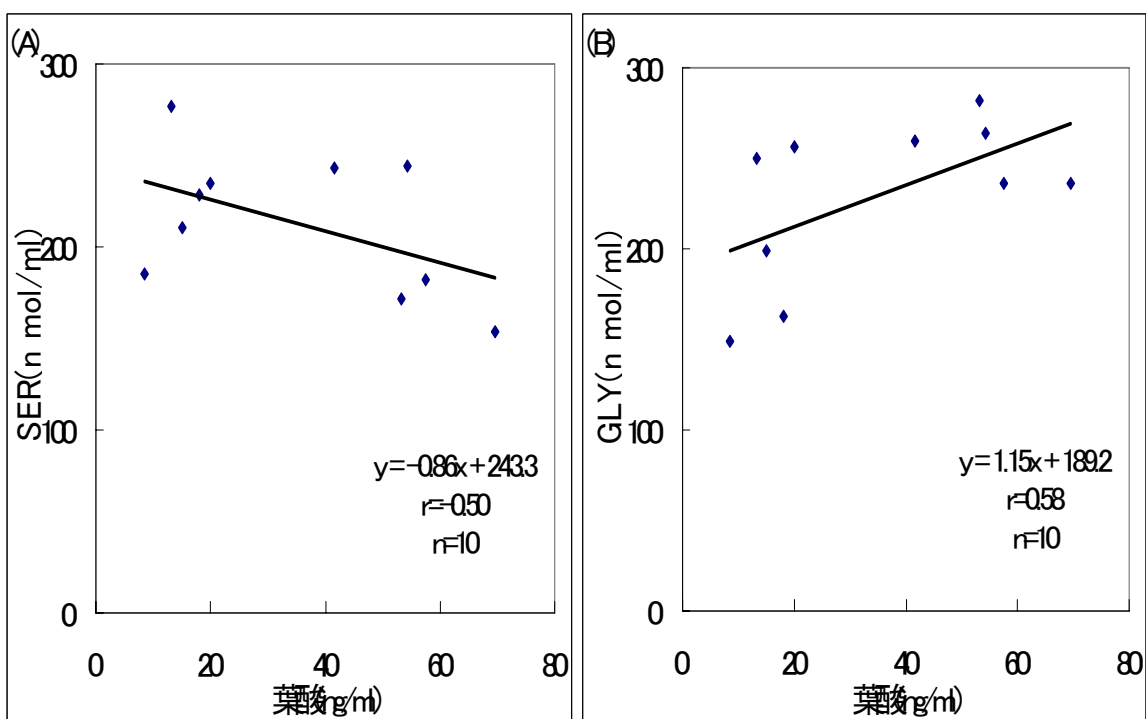


図 8. セリンおよびグリシンの血清葉酸量の関係

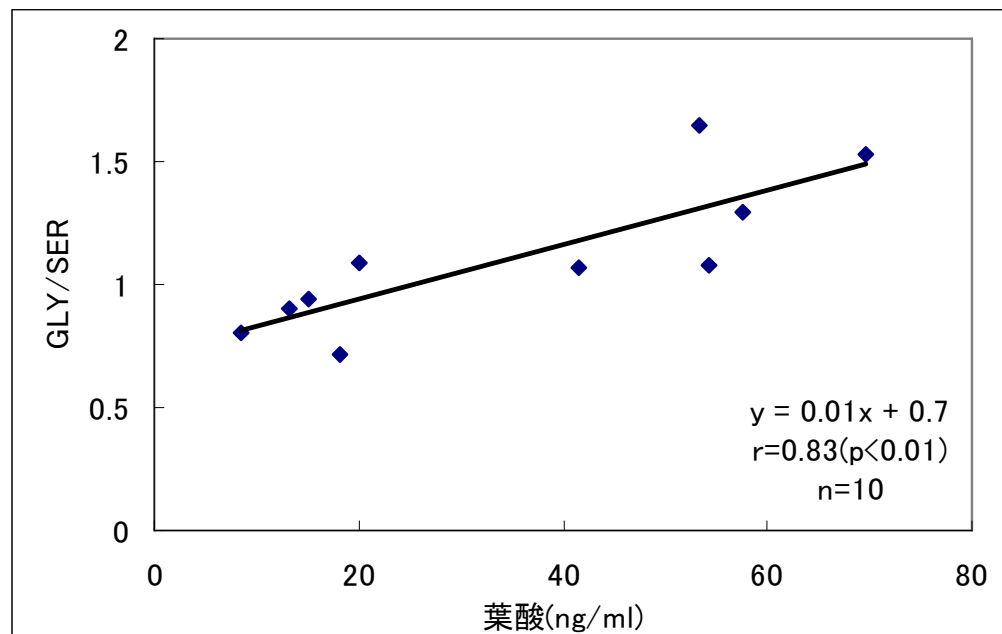


図 9. セリン/グリシン比と血清葉酸