

平成 17 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

7. 葉酸の分析ならびに生体利用率に関する検討

分担研究者 梅垣敬三 国立健康・栄養研究所 室長

研究要旨

食事からのビタミン摂取量ならびに許容上限摂取量の策定には、ビタミンの信頼できる分析方法の開発、摂取量を反映する適切な生体指標の選定が要求される。本研究では葉酸の分析方法として、先ず *Lactobacillus rhamnosus* を用いた簡便な微生物学的測定法を設定した。次にその方法を用いて葉酸の摂取量を反映する適切な生体指標の検索をラットのモデルで検討し、短期的ならびに中期的な摂取量の評価に血漿葉酸濃度の変動がよいという結果、また低葉酸食を摂取させラットのモデルに検討する飼料を投与し、その後の血漿と血球、肝臓の葉酸濃度の変動、血漿ホモシステイン濃度の変動を把握することにより食品中の葉酸の生体利用率が評価できるという結果を得た。このモデルを利用して実際に緑茶中の葉酸の生体利用率を評価したところ、緑茶中の葉酸の生体利用率は Folic acid に比べてかなり低いという結果であった。

A. 研究目的

食事からのビタミン摂取量と体内レベルを把握することは食事摂取基準策定において重要である。そのためには食品ならびに生体試料のビタミンが迅速かつ適切に分析できる方法・条件の設定、ビタミンの生体内レベルを適切に評価できる生体指標の選定が要求される。葉酸は核酸とアミノ酸の一炭素転位の補酵素としての働きを持つため、葉酸が慢性的に著しく欠乏すると赤血球に分化するのに必要な DNA が不足し、巨赤芽球性貧血を引き起こすことが知られている。また、葉酸欠乏によりホモシステインがメチオニンに再メチル化されず、体内のホモシステインレベルが上昇する。ホモシステインは心血管疾患、脳血管疾患などのリスクファクターであるため、これらの疾患に対する葉酸投与効果が注目されている。葉酸は Folic acid(図 1) と Folate の 2 つに分類され、Folic acid は PteGlu₁ (Pteroylmonoglutamic Acid) を指し、Folate は Folic acid に類似した化学構造と栄養活性を持つ化合物の総称で、一般には天然の食品中に存在するものを指している。葉酸には様々な誘導体が存在するため一つの化学物質として個別に測定することは難しい。例えば、食品中の葉酸含量の測定法として ELISA 法があるが、その方法では限られた誘導体しか測定できない。そのため、食品中および生体内の葉酸測定法として、生育に葉酸を必要とする乳酸菌を用いた微生物学的測定法があり、その方法では多種類の葉酸が測定可能である。

食品中の葉酸の生体利用率は Folic acid に比べて低いことが示されている。通常の栄養実験で利用されるラットやマウスとヒトでは葉酸の代謝が異なることも示唆されているが、多く食品中の葉酸の生体利用率をヒト

において評価する事は現実的には困難である。そのため実験動物を用い、ある程度の葉酸の生体利用率の評価が行える条件を設定し、その基礎的検討結果をヒト試験に適用して葉酸の生体利用率を確認することが適切と考えられる。

本研究では多種類の葉酸が測定できるクロラムフェニコール耐性 *Lactobacillus rhamnosus* を用いた微生物学的測定法の設定を行い、次にラットを利用した食事の葉酸を評価するための基礎的検討を行った。次にその条件を応用して日本人が摂取している葉酸の供給源として大きな割合を占めている緑茶葉酸¹⁾の生体利用率を検討した。

B. 研究方法

1. 葉酸の分析方法に関する検討

1-1 保存用菌体培養方法²⁾

Lactobacillus rhamnosus (ATCC 27773)の凍結乾燥菌体に菌体保存培地(葉酸定量用培地 9.4g、水 200mL、1mg/mL クロラムフェニコール 4mL、250mg/mL アスコルビン酸 400μL、葉酸 120ng)を 1 mL 加えて再水和し、これを菌体保存培地 5mL に移し、37℃で 42 時間培養した。この培養液 10μL をとり、新しい菌体保存培地(5mL)に入れて 37℃で 24 時間培養した。同様の操作をさらに 2 回行ない、生育のよい菌体を調製し、最終的にグリセロール溶液として分注して-80℃にて凍結保存した。

1-2 葉酸の微生物学的測定方法

1)葉酸標準液の調製

Folinic acid calcium salt pentahydrate を 20mg 前後秤量し、25mL にメスアップした。ここから 400μL とり、0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で 50mL に希釈し、285nm で吸光度

を測定して分子吸光係数 (37.2×10^3) より、標準液の濃度を算出した。この標準液は S 体と R 体の両方を含むラセミ体であり、菌体は S 体のみを利用するのでこの半分の濃度を標準液の濃度とした。

2) 葉酸の測定方法³⁾

葉酸定量用培地 4.7g に蒸留水 100mL を加えて加熱溶解し、冷却後に滅菌フィルター処理したクロラムフェニコール (1mg/mL) 溶液 3mL を加えて使用培地とした。この使用培地に滅菌フィルター処理アスコルビン酸溶液 (250mg/mL) 300 μ L、凍結保存しておいた菌体のグリセロール懸濁液を 200 μ L それぞれ加え、培地・菌体混液を調製した。96-well マイクロプレート (Nunc 社製) に標準液または試料を 100 μ L 分注し、次に各 well に培地・菌体混液を 200 μ L ずつ分注した。プレートにプレートシール (住友ベークライト社製) を貼り、37°C で 42 時間培養し、570nm にて吸光度を測定した。

2. 体内葉酸レベルの評価方法についての基礎的検討と生体利用率の評価系設定

2-1 実験動物

1) 実験 1 (短時間の葉酸摂取の影響評価に関する検討)

日本 SLC (静岡) から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢) を栄研 6 連ステンレスケージにいれ、常温 (23 $\pm$ 1°C)、12 時間明暗サイクル (明期: 7:00-19:00) の動物室内で飼育した。ラットは市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株)) を自由摂取させた。ラットには 0.1M 重炭酸ナトリウムに溶解した葉酸 0.33mg/kg 体重 (0.1mg/0.4mL/300g 体重) をゾンデを用いて胃内投与した。対照群には同量の 0.1M 重炭酸ナトリウムを投与した。投与開始直前 (0 時間)、投与 0.5、1、2、3、4、6、8 時間後にラ

ットの尾より予め Heparin を入れておいたマイクロチューブに血液を採取した。なお、全てのラットは投与開始から絶食させた。採取した血液の一部はヘマトクリット管に採取し、ヘマトクリット値の算出に利用した。また、全血と遠心分離 (1,500 $\times g$ で 15min 遠心) により得た血漿をそれぞれ 0.5% アスコルビン酸溶液で 10 倍に希釈し、葉酸測定用の試料とした。

2) 実験 2 (数日間の葉酸摂取の影響評価に関する検討 1)

日本 SLC (静岡) から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢) を実験 1 と同様に市販固形試料 CE-2 (日本クレア(株)) で飼育し、また実験 1 と同量の葉酸を 7 日間胃内投与した。投与開始の 3 日前および投与直前 (0 日)、投与 1、3、5、7 日後に実験 1 と同様の方法で採血した。なお、投与期間中の採血は、各投与直前に行った。ヘマトクリット値の算出、葉酸測定用の全血ならびに血漿の試料は実験 1 と同様の方法で調製した。

3) 実験 3 (数日間の葉酸摂取の影響評価に関する検討 2)

日本 SLC (静岡) から購入した Wistar 系雄ラット (7 週齢) に AIN-93G⁴⁾ 組成を基本に調製した低葉酸食 (葉酸無添加)、もしくは基本食 (葉酸 2mg/kg 飼料) を 3 週間自由摂取させた (表 1)。飼料の組成は表 2 に示した。実験 2 と同様の方法で葉酸 0.33mg/kg 体重 (0.1mg/0.4mL/300g 体重) を 7 日間連続投与した。採血および葉酸測定用の試料の処理は実験 1 と同様の方法で行った。

2-2 分析方法

1) 葉酸濃度の測定⁵⁾

血漿は 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。全血はポリグルタミン酸鎖を切断するため 37℃、30 分インキュベートし、その後 0.5%アスコルビン酸ナトリウム溶液で適宜希釈した。臓器は 9 倍量の 50mM リン酸緩衝液 (pH6.1、0.5%アスコルビン酸)を加えてホモジナイズした後、オートクレーブで 121℃、30 分間加熱し、葉酸を抽出し、すぐに氷冷した後、2500×g、15min、4℃で遠心分離した。その上清 150μL にラット血清由来のコンジュガーゼ 100μL、50mM リン酸緩衝液 (pH6.1、0.5%アスコルビン酸) 2.79mL を加え遮光下で 37℃、6 時間インキュベートし、葉酸測定試料とした。なお、ラット血清由来のコンジュガーゼは、活性炭処理して混在する葉酸を除去して利用した。血液、血球、臓器中の葉酸は微生物学的方法により定量した。

2) 血漿ホモシステイン濃度⁶⁾

血漿 60μL に PBS(pH7.3)30μL と 10%Tris-(2-carboxylethyl)-phosphine 10μL を加えて 37℃にて 15 分間インキュベートした。10%Trichloroacetic acid(1mM EDTA)90μL 添加し、すぐに 7000×g で 10min 間遠心分離し、得られた上清 40μL に 0.125 M ホウ酸緩衝液 (pH9.5、4mM EDTA) 125μL、1.55M 水酸化ナトリウム 10μL、1mg/mL 7-Fluorobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole-4-Sulfonic Acid ammonium Salt 150μL を加え遮光下で 60℃にて 60 分インキュベートし、冷却した液を HPLC 用試料とした。HPLC は蛍光検出器を装着し、カラムに Capcell Pack UG120 (3μm、100×4.6mm)、移動相に 0.1M リン酸二水素カリウム (4%メタノール、pH2.7)、流速 1.0mL/min、励起波長 385nm、発光波長 515nm、試料注入量 20μL とした。

3. 茶中の葉酸の生体利用率の検討

日本クレア(東京)から購入した Wistar 系雄ラット 4 週齢を用いた。実験 1 に利用した AIN-93G にはビタミンフリーカゼインに葉酸が 0.3μg/g⁷⁾ 以上含まれている。またラットやマウスでは腸内細菌によって合成される葉酸も影響する。そこで遊離アミノ酸から調製し、腸内細菌の増殖を阻止するために Succinyl Sulfathiazole を添加した Dyets 社(PA、USA)製飼料を用いた(表 2)。体内の葉酸レベルを減少させるため、ラットに低葉酸食(葉酸無添加)を 4 週間摂取させた後、①コントロール群 水、②カテキン群 EGCg 29.3mg/kg BW、③葉酸群 Folic acid 116.7μg/kg BW、④葉酸+ カテキン群 Folic acid 116.7μg/kg BW + EGCg 29.3mg/kg BW、⑤緑茶群 208.6mg/kg BW (Folic acid 116.7μg/kg BW、EGCg29.3mg/kg BW 含有)の 5 群に分け、該当するカテキン、茶抽出物、または葉酸をそれぞれ 1 週間胃内投与した。採血および葉酸の測定は 2 と同様の方法で行った。

C. 結果

1. 葉酸の分析方法に関する検討

葉酸標準液を菌体入りの培地で 37℃、42 時間培養して 570nm の吸光度を測定した。葉酸濃度と吸光度の関係を図 2 に示したように 20pM から 400pM の範囲内では葉酸定量に使用できる菌体の生育反応曲線を得ることができた。この結果は文献 3) とよく一致していた。今回検討した微生物学的定量法による検出は極めて検出感度が高く(検出限界はおおよそ 5pM)、濃い標準液を調製した器具からわずかでも葉酸が混入すると定量曲線が作成できないことから、葉酸定量に使用する器具類等は、葉酸が混入しないように十分注意する必要があった。

2. 体内葉酸レベルの評価方法についての基礎的検討

葉酸 0.33mg/kg 体重(0.1mg/0.4mL/300g 体重)を経口投与したラットの血漿葉酸濃度は0.5時間後に投与前の1.5倍に増加し、3時間後に1.6倍と最も高くなり、その後減少し、8時間後には投与前のレベルにもどった。一方、赤血球の葉酸濃度は葉酸投与による有意な変化を示さなかった。

次にラットに葉酸を0.33mg/kg 体重の投与量で7日間連続胃内投与した条件で検討したところ、採血は葉酸投与24時間後に実施しているため、投与1日目と3日目では血漿においても有意な濃度の増加を検出することができなかった。しかし、投与5日目からは有意な増加を検出することができた。一方、赤血球の葉酸濃度は投与7日まで有意な増加を示さなかった。

葉酸を投与しても特に赤血球では、葉酸濃度の増加を検出することができなかった原因として、既に市販固形飼料 CE-2 には十分な葉酸が含まれていることから(2.8mg/kg diet)、赤血球内の葉酸濃度が飽和しており、別途葉酸を投与しても赤血球には取り込まれない可能性が考えられた。そこで、ラットを低葉酸食で飼育し、体内の葉酸濃度を低下させた状態での葉酸投与の影響を検討した。対照には通常の葉酸濃度が含まれる飼料を与えたラットを用いた。低葉酸食を3週間与えることにより葉酸濃度は血漿では著しく低下していたが、赤血球ではそれほど低下しなかった。これらのラットに葉酸を胃内投与したところ、対照とした通常飼料群の血漿葉酸濃度は有意に増加しなかった。しかし、葉酸欠乏食で飼育したラットに葉酸を投与すると血漿葉酸濃度は5日目に1.6倍、7日目

には3.7倍に増加した。一方、赤血球の葉酸濃度はいずれの食餌群においても葉酸投与による大きな変化は見られなかった。葉酸投与の影響を示す他のパラメーターとして、血漿ホモシステイン濃度、肝臓葉酸濃度を測定したところ、血漿ホモシステイン濃度は、欠乏食群では1.9倍に増加したが、葉酸投与により基本食群と同程度に減少した。肝臓葉酸濃度は葉酸欠乏食により、基本食よりも減少し、葉酸投与により基本食群の1/2程度にまで回復した。

3. 茶の葉酸の生体利用性についての検討

血漿葉酸濃度は葉酸および葉酸+カテキン投与群では1.3倍に増加したが、緑茶投与群では増加しなかった。肝臓葉酸濃度も葉酸および葉酸+カテキン投与群では2.1~2.2倍に増加したが、緑茶投与群では1.2倍程度しか増加しなかった。骨髄中の葉酸濃度も血漿や肝臓と同様であった。また、血漿ホモシステイン濃度は葉酸および葉酸+カテキン投与群では50~60%程度減少したが、緑茶投与群ではわずか7%しか減少しなかった。

D. 考察

食品中の葉酸の生体利用率を評価する上で基本となる化合物のFolic acidをラットに投与し、その体内レベルの変化について検討した。通常市販固形飼料で飼育したラットに葉酸を1回投与、また7日間連続投与したとき葉酸濃度は赤血球では変化しないが、血漿では有意な変化を検出することが明らかとなった。通常、体内の葉酸濃度が十分に高い条件では葉酸投与の影響を検出することは難しい。そこで低葉酸食を3週間与えて体内の葉酸レベルを減少させた条件で葉酸投与の影響を調べた。そのような実験条件においても血漿葉酸濃度は、葉酸投与によっ

て増加したが、赤血球の葉酸濃度の増加は明確には検出できなかった。以上の結果は特定の食品中の葉酸の消化管からの吸収性を評価する場合には血漿が適していることを示唆した。赤血球の葉酸濃度の変化が検出できない理由には約 120 日間という赤血球の寿命が関連していると考えられた。ヒトを対象とした調査では測定の簡便さから血漿葉酸濃度を体内葉酸レベルの指標として用いることが多いが、食事などの影響により血漿葉酸濃度が変動しやすく長期的な評価には赤血球が適しているとされてきた。今回の実験結果から摂取直後に測定せず、一定時間を空ければ血漿葉酸濃度を中期的な葉酸摂取状態の評価に利用しても問題ないことが示唆された。今回検討した低葉酸食の摂取の条件において、赤血球よりもむしろ肝臓において葉酸投与の影響を明確に検出できた。肝臓は体内で最も葉酸貯蔵量の多い臓器であることを考慮すると、動物を利用した予備的検討において肝臓の葉酸濃度の変化は葉酸摂取の影響を評価する良い指標になりうると考えられた。低葉酸食群の血漿ホモシステイン濃度は葉酸投与によりコントロール食と同程度のレベルにまで回復した。この結果より、体内の葉酸レベルと葉酸投与の影響を調べるマーカーとして血漿ホモシステイン濃度は優れていると考えられる。

今回検討したラットにおける食品中葉酸の生体利用率の評価系で、緑茶中の葉酸の生体利用率を評価したところ、緑茶中の葉酸は生体利用率が低いことが、血漿、肝臓、骨髓の葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度の変化から示唆された。この点をさらに明確にするためには緑茶中の葉酸の形態を踏まえたさらなる検討が必要である。

E. 結論

葉酸の微生物学的測定法により、体内葉酸レベルの評価系を構築した。短期的ならびに中長期的な葉酸摂取状態の評価には血漿が適していると考えられた。食品中の多様な形態の葉酸の生体利用率を評価する実験系としてラットに低葉酸食を摂取させる実験系を設定し、緑茶中の葉酸の生体利用率を評価したところ、緑茶中の葉酸の生体利用率は低いことが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

遠藤香、村上昌弘、杉澤彩子、木村典代、山田和彦、梅垣敬三：ラットにおける体内葉酸レベルの評価方法に関する検討、第 52 回日本栄養改善学会学術総会(徳島)、平成 17 年 9 月 29 日。

H. 知的財産件の出願・特許状況(予定を含む)

なし

I. 引用文献

1. Imaeda N, Goto C, Tokudome Y, Ikeda M, Maki S, Tokudome S. Folate intake and food sources in Japanese female dietitians. *Environ Health Prev Med.* 7:156-161. 2002
2. Wilson SD and Horne DW, Use of glycerol-cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid. *Clin Chem.* 28:1198-1200. 1982
3. O'Broin S and Kelleher B. Microbiological

- assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. *J Clin Pathol*, 45:344-347. 1992
4. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*. 127:838S-841S. 1997
5. O'Leary K, and Sheehy PJ. Effects of preparation and cooking of folic acid-fortified foods on the availability of folic acid in a folate depletion/repletion rat model. *J Agric Food Chem*. 49:4508-4512. 2001
6. Frick B, Schrocksnadel K, Neurauter G, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, and Fuchs D. Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clin Chim Acta*. 331: 19-23. 2003
7. 岩井和夫, 小橋昌裕, 沖中靖, 外林秀紀, 谷昌子, 成沢邦明, ビタミン学実験法Ⅱ(水溶性ビタミン日本ビタミン学会編), 東京化学同人, 東京, pp297-354 1985.

表 1 AIN-93G 組成を基本に調製した低葉酸食、基本食、高葉酸食の組成)

	g/kg 飼料		
	低葉酸食	基本食	高葉酸食
コーンスターチ	397.486	397.49	397.486
ビタミンフリーカゼイン(蛋白 85%以上)	200	200	200
糊化コーンスターチ(90～94% 六炭糖)	132	132	132
ショ糖	100	100	100
大豆油(無添加物)	70	70	70
繊維(ソルカーブロック)	50	50	50
ミネラルミックス(AIN-93G-MIX)	35	35	35
葉酸を除いた AIN93G のビタミンミックス (AIN-93-VX)	10	10	10
L-シスチン	3	3	3
重酒石酸コリン(41.1%コリン)	2.5	2.5	2.5
第三ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014
葉酸	0	0.002	0.04

表 2 Dyets 社製の低葉酸食、基本食、高葉酸食の組成

	Dietary folate level		
	Low (0mg/kg diet)	Basal (2mg/kg diet)	High (8mg/kg diet)
	g/kg		
L-Alanine	3.5	3.5	3.5
L-Arginine (free base)	11.2	11.2	11.2
L-Asparagine • H ₂ O	6.82	6.82	6.82
L-Aspartic Acid	3.5	3.5	3.5
L-Cystine	3.5	3.5	3.5
L-Glutamic Acid	35	35	35
Glycine	23.3	23.3	23.3
L-Histidine (free base)	3.3	3.3	3.3
L-Isoleucine	8.2	8.2	8.2
L-Leucine	11.1	11.1	11.1
L-Lysine HCl	18	18	18
L-Methionine	8.2	8.2	8.2
L-Phenylalanine	11.6	11.6	11.6
L-Proline	3.5	3.5	3.5
L-Serine	3.5	3.5	3.5
L-Threonine	8.2	8.2	8.2
L-Tryptophan	1.74	1.74	1.74
L-Tyrosine	3.5	3.5	3.5
L-Valine	8.2	8.2	8.2
Total Amino Acids	175.86	175.86	175.86
Dextrin	397	397	397
Sucrose	197.04	196.64	189.04
Cellulose	50	50	50
Corn Oil (stab. 0.15% BHT)	100	100	100
Salt Mix	50	50	50
Vitamin Mix (Folate Free)	10	10	10
Choline Chloride	2	2	2
Sodium Acetate	8.1	8.1	8.1
Folic Acid/Sucrose Premix(5mg/g)	0	0.4	0
Folic Acid/Sucrose Premix(1mg/Kg)	0	0	8
Succinyl Sulfathiazole	10	10	10

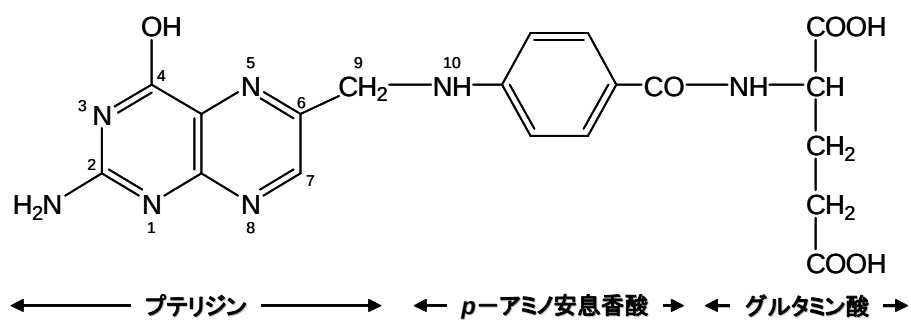


図 1 . Folic Acid (PteGlu1 : Pteroylmonoglutamic Acid) の構造式

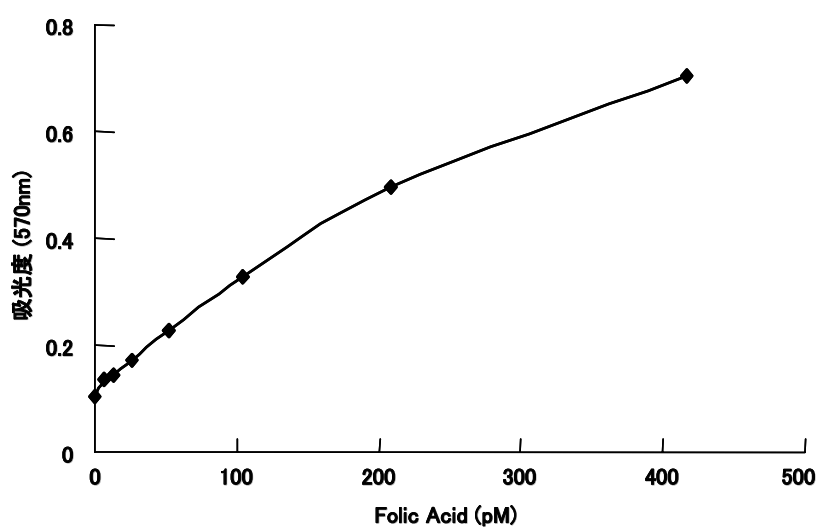


図 2 . バイオアッセイによる葉酸定量法の検量線