


5-CH<sub>3</sub>-THF-G となり、生物由来の 5-CH<sub>3</sub>-THF-G と区別なく、同じ代謝系に入る。一方、残りの一部は、F-G のままの形で細胞内に取り込まれ、THF-G となるため、メチオニンシンターゼを介することなく、ポリグリタミン酸化され、THF-Gn となる。そして、葉酸補酵素としての利用系に入る。

### 3. 吸収効率

F-G は生物系食料中のビタミン B<sub>9</sub> よりも 2 倍ほど、消化・吸収率が高い。詳細に述べると、空腹時に F-G を摂取した時の消化・吸収率は生物系食料ビタミン B<sub>9</sub> の 2 倍となる。食事と一緒に F-G を摂取すると、消化・吸収率は 1.7 倍と下がる。海外の食事摂取基準では DFE (dietary folate equivalent) という概念が使われている。1 μg の生物系食料葉酸を 1 とし、空腹時に F-G を 1 μg 摂取した時には 2 μg DFE に、食事と一緒に F-G を 1 μg 摂取した時には 1.7 μg DFE となる。

### 4. 毒性試験

F-G の毒性に関して、以下の七つの項目が上げられている。

①**ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏のマスキング**。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態である場合、F-G を大量 (数 mg 程度) に投与するとビタミン B<sub>12</sub> 酵素であるメチオニンシンターゼを介さずに、チミジレートシンターゼの補酵素である 5、10-メテニル THF-Gn が F-G から合成されるため、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏による悪性貧血 (巨大赤血球性貧血、 図 7) が現れずに、より深刻なビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の神経疾患の発見が遅れることになる。しかしながら、”Does folic acid harm people with vitamin B<sub>12</sub> deficiency?” という総説<sup>9)</sup>において、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏患者に対して F-G 投与の影響を詳細に調べた上で、彼自身の見解を述べている。彼は、健康人に対しては、20mg/日までの F-G の投与は何ら悪影響を与えないとしている。彼は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏患者に対する F-G 投与の報告には大きな誤りがあったと指摘している。1947 年より前では、悪性貧血の患者に対する F-G の治療により、急速な神経変性が生じたという多くの報告がある。これは、肝臓やビタミン B<sub>12</sub> を用いる悪性貧血の治療法が導入される前のことである。確かに、F-G の投与は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏による悪性貧血 (巨大赤血球性貧血) の症状を良くする。従って、医師の診断が貧血のみを重要視すると、神経変性の発見が遅れることになる。彼は、しかしなが

ら、これは医師を教育することで、容易に克服できるとしている。

赤血球の大きさが大きくなり 1 つ 1 つに含まれるヘモグロビンの量が増加するにもかかわらず赤血球数の減少が著しく結果としてヘモグロビン濃度が下がる

②**てんかん誘発作用と神経毒作用**。脳内に能動輸送されるビタミン B<sub>9</sub> の形は 5-CH<sub>3</sub>-THF-G であるとされている<sup>7)</sup>。そして、脳脊髄液に貯蔵される<sup>8)</sup>。ビタミン B<sub>9</sub> が不足すると、脳脊髄液中のビタミン B<sub>9</sub> 量が低下してくる<sup>9)</sup>。以下に述べる F-G の神経毒作用に記載したように、F-G は分子内にグルタミン酸を含むために、神経毒作用があるといわれていたが、その程度はきわめて弱く、mg 単位の投与では考えられない。また、カイン酸やキノリン酸のような神経毒作用を有する物質に対して保護作用を有することも報告されており、mg 単位の経口投与では F-G の神経毒作用に対して、問題にする必要はない。

③**F-G とビタミン B<sub>9</sub> 代謝を妨害する薬剤との相互関係**。医師が関わる治療の問題である。

④**F-G と亜鉛との相互関係**。健康者において、F-G の投与により、亜鉛の糞便中への排泄の増加や亜鉛の吸収が阻害されるという報告がある、これは、F-G と亜鉛の結合体が非吸収性の化合物であるためであると考えられている)。この亜鉛の吸収阻害に関しては、ヒトに関しては否定的な実験結果が優勢である。信頼のおける研究では、非妊娠健康人に対して 5~15mg/日の F-G の投与は亜鉛の吸収を阻害しなかった。したがって、F-G による亜鉛吸収阻害はヒトにおいては認められない現象であると断定してよい。

⑤**F-G と腫瘍との関係**。発がん作用のある薬剤のスクリーニングの大規模疫学研究において、F-G の摂取量と中咽頭がん、下咽頭がん、およびすべてのがんの発生頻度と正の相関が認められたことを報告している<sup>10)</sup>。しかしながら、結腸直腸のアデノーマとビタミン B<sub>9</sub> の摂取量とは負の相関関係が認められたこと<sup>11)</sup>、ビタミン B<sub>9</sub> の摂取量と子宮頸部上皮異形成の発生との関係は負の相関関係が認められたこと<sup>12)</sup>、F-G の投与が喫煙家の肺の落屑正の異形成を改善したこと<sup>13)</sup>、Selby らの報告<sup>11)</sup> (F-G には腫瘍誘発作用がある) は、交絡因子の処理方法に問題があるものと考えられる。むしろ、他の論文はビタミン B<sub>9</sub>



には新生物の発生に対して予防効果があることを報告している。

⑥F-Gの添加がマラリアにおよぼす影響。ビタミンB<sub>9</sub>欠乏サルがマラリアに対して耐性を示した<sup>14)</sup>。しかしながら、ヒトでの報告はない。恐らく、マラリアの成長に必要な赤血球の数が少ないことに起因するものであろう。これも医師が関わる問題である。

⑦F-Gの薬品アレルギー。5報の論文がある<sup>15-19)</sup>。F-GアレルギーのヒトにはF-Gの使用を禁ずるべきである。

#### 4-1. 急性毒性試験

✚ 100 mg/kg.day の F-G 投与により、P388 lymphocytic leukaemia マウスでは死亡するものもいた<sup>20)</sup>。

✚ US Dept. of Health and Human Services (NIOSH Cincinnati, Ohio, 1979) にはF-Gに関する急性毒性試験の報告として、マウスに対して、LD<sub>50</sub>は、腹腔内投与で 100 mg/kg、静脈内投与で 239 mg/kg という記載があるのみで、きっちりした論文としての報告は見あたらない。

✚ 種々の系統のマウス (体重 18~22g) に F-G(2% NaHCO<sub>3</sub>に溶解)を腹腔内投与後7日間観察 (表2)<sup>21)</sup>。系統により大きく C は異なっていた。C57BL/Cri が最も低い LD<sub>50</sub> であり、F-G の感受性が高かった。逆に、S/RVCri が最も抵抗性を示した。DBA/2fNCri では、死亡する前、F-G 投与2日前にけいれんを起こした。他の系統のマウスでは運動失調や多動が認められた。すなわち、神経系の異常が認められた。しかしながら、CNS の急性的な変化は認められなかった。多くのマウスはF-G投与後3日ぐらいで死亡した。4日まで生存したマウスはそのまま生存し続けた。死亡したマウスの剖検では急性の尿細管壊死が認められた。DBA/2 マウスの1匹のみに大脳のプルキンエ細胞の2、3個に萎縮が認められた。

#### 4-2. 神経毒作用

✚ F-G と 5-MTHF-G は、神経毒であるカイニン酸と同じように、グルタミン酸レセプターに結合し、神経毒となる。ラットにおいては、神経毒としての強さはF-Gの方が、5-MTHF-G よりも高かった<sup>22)</sup>。

✚ F-G は脳内でカイニン酸と同じ受容体に結合して、神経毒作用を示すという仮説があるが、本実験では、カイニン酸の神経障害作用とF-Gの神経障害作用が異なっていたことから、異なる機構でF-Gが神経毒作用を示すものと思われた<sup>23)</sup>。

✚ ひよこの網膜を使用して、F-GあるいはF-G+神経毒の作用をin vitroで調べた<sup>24)</sup>。F-Gは10 mMまでは影響を与えなかった。10 mM F-G+2 μM のカイニン酸溶液でヒヨコの網膜をインキュベーションすると、カイニン酸のみで見られた神経毒作用を防御した。カイニン酸に対するF-Gの保護作用は非常に弱く、1000倍以上の濃度が必要であった。他の神経毒作用をもつ化合物N-メチル-D-アスパラギン酸、キノリン差の神経毒作用についてもF-Gは保護作用を示した。この中で、F-GはN-メチル-D-アスパラギン酸に対して最も有効な拮抗剤であった。

#### 4-3. 妊娠マウスに対するF-Gの影響

✚ ICR系雌マウスに妊娠0日から9.5日まで1日1回F-G (3 mg/kg) 腹腔内投与、妊娠8.5日に42°Cで15分間温浴させた。対照群としてF-Gを投与し、38°Cで15分間温浴させる群、溶媒 (コーンオイル) を妊娠0~9日に投与し42°Cで15分間温浴させる群をもうけて比較した (表3)。高温負荷群では早期吸収胚が23.5%であり、神経管奇形 (無脳症ならびに外脳症) が生存胎仔の38.6%に求められた。一方、F-G+高温負荷群では、早期吸収胚の頻度が15.1%、神経管奇形が26.6%であった。神経管奇形の頻度はF-Gの投与により、有意に低下し、F-Gの保護効果が認められた<sup>25)</sup>。

✚ 体重180gの妊娠雌Wistar系ラットを通常F-G含有食 (0.2 mg%食) あるいは高F-G含有食 (4 mg%食) を3週間投与した。また、非妊娠ラットを、同じく通常F-G含有食 (0.2 mg%食) あるいは高F-G含有食 (4 mg%食) を3週間投与した<sup>26)</sup>。妊娠期間は高F-G食群でも正常であったが、高F-G食群の胎仔の体重と頭頂から尾部の長さが、通常群に比して有意に短かった。これらの現象に関して、この論文の著者らは、現時点ではこれらのことをどのように判定するかについてわからないといっている、また、高F-G食群母ラットから生まれた仔の生育を行う



必要があろうとも考察している。高 F-G 食群の肝臓中の S-アデノシルメチオニン含量が、通常群よりも有意に高くなったが、肝臓の DNA メチル化能力、メチオニン含量には差異は認められなかった。血漿中のホモシステイン含量は、高 F-G 食群の方が低い値を示し、ビタミン B<sub>9</sub> 含量は高い値を示した。通常食群では妊娠により血漿中のビタミン B<sub>9</sub> 含量は低くなったが、高 F-G 食群では妊娠によっても低くならなかった。

#### 4-4. F-G が一炭素代謝におよぼす影響

↓ 18 か月齢の Wistar 系ラットを通常 F-G 含有食 (0.1 mg%食) あるいは高 F-G 含有食 (4 mg%食) を 29 日間投与し、タンパク質利用率、脂肪の消化能力、DNA メチル化能力や血漿中のビタミン B<sub>12</sub> とビタミン B<sub>6</sub> 濃度を比較した<sup>27)</sup>。その結果、高 F-G 含有食と通常 F-G 含有食群間ではなんら有意な差異は認められなかった。

↓ 離乳したての Wistar 系ラットを通常 F-G 含有食 (0.1 mg%食) あるいは高 F-G 含有食 (4 mg%食) を 3 週間投与したが、SAM/SAH 比、DNA メチル化能力、あるいはビタミン B<sub>9</sub> 代謝と関係の深いビタミン B<sub>12</sub> 及びビタミン B<sub>6</sub> の血漿中の含量には悪影響は認められなかった<sup>28)</sup>。

### 5. ヒト試験

ヒトにおいて、サプリメントとして過剰に摂取された FA によって生じる副作用としてあげられているものは以下の四つである。

①**悪性貧血のマスクング**<sup>6)</sup> (後外側脊髄偏性を進行させる。このマスクング効果が認められた論文の中で、信頼度の高い論文では 5 mg/日以上葉酸を投与でマスクングが報告されている。)、このことに関しては、診断未確定の場合に問題となるが、F-G を投与する前に、ビタミン B<sub>12</sub> 依存性のもう一つの酵素であるメチルマロニル CoA ムターゼの活性低下に起因するメチルマロン酸をモニターすれば、防げることである。しかしながら、ビタミン B<sub>12</sub> の診断を受けていないヒトに対する懸念は残ったままである。この点がビタミン B<sub>9</sub> の上限量算定の最も重要な論点である。

②**がん治療における抗ビタミン B<sub>9</sub> 剤との拮抗**<sup>29)</sup>。このことに関しては、治療上の問題である。医師が自らの判断によりビタミン B<sub>9</sub> 拮抗剤の抗ガン剤を投与している場合で

あり、完全に医師の管理下にある状態であるため、公衆衛生学上あるいは食品衛生学上の問題ではなく、医師が個別に対応する問題である。

③**亜鉛の吸収を阻害**<sup>29)</sup> (健常者において亜鉛の糞便中への排泄の増加や亜鉛の吸収阻害する、これは、F-G と亜鉛の結合体が非吸収性の化合物であるためであると考えられている)。この亜鉛の吸収阻害に関しては、ヒトに関しては否定的な実験結果が優勢である。信頼のおける研究では、非妊娠健常人に対して 5~15mg/日の F-G の投与は亜鉛の吸収を阻害しなかった。したがって、「③」の F-G による亜鉛吸収阻害はヒトにおいては認められない現象であると断定してよい。

④**F-G の神経毒作用としての可能性**<sup>29)</sup>。これは、F-G がグルタミン酸を含有していることに起因する。しかしながら、ヒトにおける神経毒作用の報告はない。

米国ナショナル・アカデミー・医学研究所 (Institute of Medicine、U.S. National Academy) の食品栄養評議会 (FNB: Food and Nutrition Board) は、LOAEL を 5mg に設定し、UF5 を選択し、葉酸の UL を 1mg としている。

欧州委員会 (EC: European Commission) の食品科学委員会 (SCF: Scientific Committee on Food) では、5mg 以上の投与量で副作用を認めたことに加えて、葉酸 1mg までの投与量は悪性貧血患者の血液学的兆候をマスクングすることはなさそうである、と結論し、UL を 1mg としている。

英国ビタミン・ミネラル専門家委員会 (EVM: UK: Expert Group on Vitamins and Minerals) は GL (Guidance Level=ガイダンスレベル) を 1mg に設定している。

アメリカ栄養評議会 (CRN: The Council for Responsible Nutrition) は、サプリメントとして使用される葉酸に対し、1mg という NOAEL は適切であり、ULS (Upper Level for Supplements=サプリメントに対する上限摂取量) を 1mg としている。

日本に食事摂取基準 (2005) では、葉酸の上限量に関する記述は以下の通りである。

ビタミン B<sub>9</sub> 活性をもつプテロイルモノグルタミン酸 (PGA=FA) の大量投与 (0.35~500mg/日) を悪性貧血患者に投与すると、神経障害、発熱、じんま疹、紅斑、そう痒症、呼吸困難などの悪影響の発生が、報告されている。一方において、神経管閉鎖障害の発生



および再発を予防するために、受胎前後の3か月間以上の間、0.36~5mg/日のF-Gが投与されているが、悪影響がみられたという報告はない(表4)。そこで、暫定的ではあるが、健康障害非発現量は5mg/日とされている。不確実性因子を5として、成人の上限量をプテロイルモノグルタミン酸として1mg/日と、日本人の食事摂取基準(2005年版)では策定されている。

### Ⅲ. L-5-メチルテトラヒドロ葉酸(L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G)カルシウム塩

#### 1. 化学的性質<sup>30)</sup>

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム塩は、明るい黄色味のある白い結晶であり、においはほとんどない。構造式は図8に示した。このL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム塩はF-Gの代替品として、食品などに添加する目的として使用するために出現してきた。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム塩は、葉酸をNaBH<sub>4</sub>を用いて還元して(6R, S)THF-Gにする。立体選択的に(6S)-THF-Gを得る。次に、ホルムアルデヒドと結合させ、5-ホルムTHF-Gとしたのち、NaBH<sub>4</sub>を用いて還元し、5、10-CH<sub>2</sub>-THF-G、さらにL-5-CH<sub>3</sub>-THF-G酸とする。そして、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム塩を得るために、水中でジアステレオマー選択的結晶化操作を行っている。

純度などに関しては、表5に示すものが使用されている。微細結晶化されたL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムは、食品加工処理、高温・高湿下における長期貯蔵においても安定である。また、ビタミン混合剤、マイクロカプセル包括、あるいは食品マトリックス系においても安定である。しかしながら、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムは水溶性ではあまり安定ではなく、温度が高くなると、酸化が進み、葉酸活性を持たない分解物も生じる。

#### 2. 代謝<sup>30)</sup>

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム(モノグルタミン酸型)は水溶液中では完全に、Ca<sup>2+</sup>とL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gに分離する。Ca<sup>2+</sup>の上限量は2.5g/日であるので、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムに由来する量(カルシウムは投与量の8%を占める)のカルシウムが全体のカルシウム代謝に影響を及ぼす量になることは考えられない。小腸細胞に吸収されたL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gは、血漿中にそのままの形で現れる。食物由来のビタミンB<sub>9</sub>は、

L-5-MTHF-Gnが主要であるが、消化され、血漿中にはL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gとなって現れる。したがって、血漿中のビタミンB<sub>9</sub>のほとんどはL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gであるので、生物系食料由来のビタミンB<sub>9</sub>と区別されることなく、以降の代謝が進行する。

#### 3. 吸収、分布

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-GはF-Gとほぼ同じがあるいは若干高い吸収効率を示す。

小腸でのL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gの輸送は、担体を介する受動拡散で行われる<sup>31)</sup>。[メチル<sup>14</sup>C]-D、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gを5、あるいは25 mg/kg経口投与すると、投与した放射能の18~30%が糞中に見いだされた。残りの放射能は吸収されたものであるので、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gは吸収されやすい化合物である。一方、尿中には14~23%の放射能が見いだされた<sup>32)</sup>。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gの血清中では60~80%がアルブミンと結合した状態で存在している<sup>32)</sup>。L-5-MTHF-Gは肝臓<sup>33)</sup>、血液<sup>34)</sup>、近位消化管<sup>35)</sup>においては、担体を介して輸送される。

イヌを用いた実験では、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gは中枢神経系に輸送され、3時間以内に血漿と脳脊髄液と平衡に達するが、F-GやホルミルTHF-Gの投与では脳脊髄液中の濃度が上昇しない。これらの事実から、生来の輸送系はL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gを優先的に輸送し、F-GやホルミルTHF-GはL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gに変換されたのち輸送されることを示している<sup>36)</sup>。

#### 4. 毒性試験

##### 4-1. 急性毒性試験<sup>30)</sup>

純度97.2%のL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムを7~8週のラット(Hsd Cpb:WU系)に、絶食した状態で強制的に2000mg/kg体重の量を投与した(3匹/sex)。処理したラットは投与4時間後から飼料の投与を再開し、以降15日間観察後、屠殺し、剖検をおこなった。すべてのラットは生存し、正常な体重増加量を示した。また、臓器重量に変化はなく、目視検査では異常は認められなかった。したがって、ラットにおけるL-5-CH<sub>3</sub>-THF-GカルシウムのLD<sub>50</sub>は2000 mg/kg体重以上であると判断されている。

D、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G(純度96.2%)カルシウム、D-5-CH<sub>3</sub>-THF-G(純度97.2%)カルシウム、L-Mefox-Ca(L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gのs-triazine oxidation product、純度97.5%)、L-MTHPA-Ca(L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gの加水分解物、純度98.6%)を使用して、上記と同じ実験を行ったが、



L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムと同じく、影響は認められなかったと報告している。したがって、これらの化合物のラットにおける LD<sub>50</sub> は 2000 mg/kg 体重以上であると判断されている。

#### 4-2. 中期毒性試験

- ✦ JECFA 資料<sup>30)</sup>: ラット (Wistar 系) に L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム (純度 97.1%) を (0、25、100、400 mg/kg 体重) を 13 週間投与した。各群 10 匹/sex とした。さらに、補足群として、二群 (0 群と 400 mg/kg 体重群、5 匹/sex) は 13 週間飼育後、さらに L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムの投与なしに、4 週間飼育した。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムは胃内に 1 日/回で強制経口投与した。なお、0 mg/kg 体重群には、溶解液のみを投与した。実験期間中、臨床症状、飼育ケージ外での観察、飼料摂取量、体重を定期的に観察した。実験開始前と後で検眼鏡検査を行った。一連の機能観察、自発運動量、握力を調べた。実験の最後にラットの血液を集め、血液学的検査と生化学的検査を行った。また、尿分析も行った。さらに、各種臓器の組織学的検査も行った。その結果、差異が観察されたのは、最高投与量の 400 mg/kg 体重の雄ラットにおいて、血漿中の Aspartate aminotransferase、Lactate dehydrogenase、creatinase 活性が有意に低い値をしめたことのみであった。しかし、雌ラットでは認められなかった。
- ✦ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: ラットに L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G を飼料に混餌して 26 週間投与した。その量は、0、40、120、360 mg/kg/day である。その間、死亡したラット、臨床検査、肉眼的な変化、血液学的変化は認められなかった。120 と 360 mg/kg/day の群において若干の飼料摂取量の低下と体重の増加量の遅延が認められた。360mg 群で血糖値の若干の増加 (雌雄)、120 と 360mg 群において血清有機リンの低下 (雌雄)、120 と 360mg 群において血清の GOT 活性の低下 (雌のみ)、360mg 群において尿の pH の低下 (雄のみ) が認められた。実験終了後の剖検において、臓器重量、肉眼的な病理検査、組織学的検査において、投与量に依存した変異は見られなかった。
- ✦ General Nutrition Corporation 社が FDA に

提出した資料<sup>37)</sup>: イヌに 0、20、60、180 mg/kg/day の 5-MTHF-G を 26 週間、餌に混餌した投与した。実験の間、死亡したイヌはいなかった。一般的な検査において、何ら異常は認められなかった。

#### 4-3. 妊娠毒性試験

- ✦ JECFA 資料<sup>31)</sup>: 妊娠 Wistar 系ラットに、妊娠 5~19 日の間、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを 0、100、300、1000 mg/kg 体重の量を投与した (各群 25 匹)。使用した L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムの純度は 99.4% である。母獣の妊娠の兆候、体重、飼料摂取量、水摂取量をモニターした。妊娠 20 日に母獣を剖検し、観察した。また、胎児を子宮から取り出し、発達毒性をみた。各群 22~24 匹が妊娠した。すべての動物が実験最後まで生存した。試験群の体重増加量と飼料摂取量は対照群と比較して差異は認められなかった。水の摂取量が 1000 mg/kg 体重群で高かった。繁殖能力は処理によって影響を受けなかった。一腹当たりのパーセント吸収、一腹当たりの生存胎仔数、一腹当たりの平均胎仔重量、一腹当たりの雌雄比は処理によって影響を受けなかった。母獣を剖検したが、処理による明らかな変化は認められなかった。胎仔の外観、内蔵、骨格の奇形と異常について調べた。その結果、胎児毒性、胚毒性、催奇形性毒性は認められなかった。つまり、使用した L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムでは胚毒性と催奇形成試験では 1000 mg/kg 体重でも影響は認められなかった。

#### 4-4. 繁殖毒性試験

- ✦ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: 雌雄のラットを 0、40、120、360 mg/kg/day になるように L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを混餌した飼料を投与した。F0 の雄は交配させる 60 日前から上記の実験食のどれかを投与した。F0 の雌は交配させる 14 日前から実験食を投与し続けた。妊娠した雌の一部は妊娠 19 日まで投与し、妊娠 20 日目に屠殺した。残りは授乳の終わる腫産後 21 日まで実験食を投与し続けた。臨床徴候、行動異常、出産に関して、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム投与による影響は認められなかった。同様に、交配や妊娠率にも影響



はなかった。雌において、120 と 360mg/kg 群において、交配前の2週目において体重が多くなった。また、授乳期において、360mg 群が少し体重が高くなった。胚毒性、形態学的異常や発達には影響は見られなかった。F1の生存率にも差異は認められなかった。F2において、ほんの少し 360mg 群の生存率が低かったが、用いたラットの系統では普通に見られる生存率の範囲内であった。

#### 4-5. 胚毒性

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: ラット: 妊娠6日から15日まで0、50、150、450 mg/kg/day の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを餌に混餌して投与した。卵着床後の損失、妊娠子宮の重量、生存胎仔の数、胎児重量、一腹当たりの重量、胎盤の重さには、影響をおよぼさなかった。つまり、胚毒性は認められなかった。

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: ウサギ: 妊娠6日から18日まで0、50、150、450 mg/kg/day の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを餌に混餌して投与した。臨床徴候、行動異常は認められなかった。450mg 群では体重の増加が少なかった。骨格と内臓の奇形、異常、変体は認められなかった。

#### 4-6. 周産期と出産後の毒性

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: 妊娠ラットに妊娠15日から授乳21日目まで、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを0、40、120、360 mg/kg/day となるような飼料を投与した。妊娠中は母獣には何ら影響はなかった。授乳中では、360mg 群において、体重の増加量が少し低かった。仔においては、体重の増加量には影響はなかった。形態学的、生理的、行動的なことに関しても、異常は認められなかった。

#### 4-7. 植物神経系への影響

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: マウス。① 行動変異の調査。マウスに25、50、100、200、400、800 mg/kg 体重の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを経口あるいは腹腔内投与し、Irvin's method によ

って、行動変異を調査した。その結果、経口投与では最高投与量でも行動変異は観察されなかった。しかし、400、800 mg/kg 体重の 5-MTHF-G 腹腔内投与では、弱い抑鬱状態が見られた。② 抗メトラゾール活性の評価。マウスに経口で 50 mg/kg の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを、あるいは皮下注射で 5-MTHF-G を投与したのち、130 mg/kg のメトラゾールを腹腔内投与して誘発した伸筋強直性のけいれんを評価した。③ 抗アンフェタミン活性の評価。マウスに経口あるいは皮下注射で 50、100mg/kg の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを投与したのち、10 mg/kg の d-アンフェタミンを腹腔内投与した。④ 抗レセルピン活性の評価。マウスに皮下注射あるいは腹腔で 50、100mg/kg の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを投与した。レセルピンを腹腔内投与で、2.5 mg/kg 投与した。②、③、④に関しては、経口投与、皮下注射では、各々の薬剤に対する効果に影響を与えなかったが、腹腔内投与では少し、悪い影響を与えた。

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: ネコ。麻酔したネコの動物神経失調の評価。麻酔したネコに 5、20 mg/kg の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを大腿静脈から注射し、心臓血管系のパラメータ、神経節伝達、筋肉伝達、子宮の調子と自発運動、消化管の調子と自発運動を調べた。その結果、調べたどのパラメータにも影響をおよぼさなかった。

↓ General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料<sup>37)</sup>: in vitro 試験。ウサギの空腸、ラットの胃全体、モルモットの胆嚢、ラットの腸管膜、モルモットの門脈、ラットの子宮、モルモットの気管、ラットの単離した動脈、ラットの環流させた尾動脈、ウサギの心房、モルモットの心房を 50、200 μg/mL の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム溶液につけて、各々のはらたきが影響を受けるか否かを調べた。その結果、これらの通常の機能を阻止することはなかった。

以上の実験結果から、5-MTHF-G には植物性神経作用には影響をおよぼさないことが明らかとなった



#### 4-8. 変異原性試験<sup>30)</sup>

S9 存在下あるいは非存在化でエームズ試験 (S. typhimurium strain TA98, TA100, TA102, TA1537, E. coli WP2 uvr A pKM101) を行った。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを 5~5000 μg/plate で試験を行った。500 と 5000 μg/plate では懸濁状態となった。細菌に対する毒性は認められなかった。したがって、変異原性は認められなかった。また、復帰突然変異体も認められなかった。D、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G (純度 96.2%) カルシウム、D-5-CH<sub>3</sub>-THF-G (純度 97.2%) カルシウム、L-Mefox-Ca (L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G の s-triazine oxidation product, 純度 97.5%)、L-MTHPA-Ca (L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G の加水分解物, 純度 08.6%) を使用して、上記と同じ実験を行ったが、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムと同じく、細菌に対する変異性は認められなかった。また、復帰突然変異体も認められなかった。

S9 存在下あるいは非存在化でマウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝変異試験 (Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay) を行った。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム (純度 97.2%) を用いて、濃度 5~5000 μg/ml で試験をおこなった。S9 存在下で3時間の暴露、2日間の表現では、最高濃度においても細胞毒性は生じなかった。また、TK 座の変異頻度も増大しなかった。S9 の非存在下で 24 時間暴露すると、1580、2810、5000 μg/ml で細胞毒性がみられた。2810、5000 μg/ml では成長が対照群に対して各々 13、14%に減じられおり、変異頻度はわずかに増大した。S9 の存在下、非存在下で影響が異なったので、さらに S9 非存在下で実験を行った。暴露時間を3時間にし、表現時間を3日間にした。この実験と先に述べた実験条件間の差異は認められず、細胞毒性がみられた。しかしながら、3時間の暴露では変異頻度が2倍以下であるが高くなった。24時間の暴露では、最大濃度群 (5000 μg/ml) で、2倍以上の変異頻度が認められ、成長も対照群の 0.2%にまで減じられた。委員会 (FESA) は、10%以下の生存では信頼のおける変異頻度を評価することはできないとしている。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム (純度 99%) を用いて、標準 Unscheduled DNA Synthesis (UDS)における DNA 障害修復誘導能性を調べた。Wistar 系ラットに 0.25%の methocel (vehicle control, 8匹)、800 (8匹)、2000 mg/kg (8匹) 体重の L-5-MTHF-G カルシウム (純度 99%)、75 mg/kg 体重の

2-Acetamido-fluorene (1<sup>st</sup> positive control, 4匹)、10 mg/kg 体重の Dimethylnitrosoamine (2<sup>nd</sup> positive control, 4匹)を胃内に強制投与した。Negative control 群の半分を 2~4 時間後に、残りの半分を 12~14 時間後に屠殺した。

2-Acetamido-fluorene 群は 2~4 時間後に、Dimethylnitrosoamine 群は 12~14 時間後に屠殺した。肝臓を取り出し、肝細胞の培養を行った。細胞が付着したのち、H<sup>3</sup>-thymidine を 4 時間添加した。そして、一晚培養をおこなった。そしてそこで、オートラジオグラフィを行った。核粒子を顕微鏡下で数えた。その結果、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム (純度 99%) は 800、2000 mg/kg (体重の投与では、ラット肝臓の Unscheduled DNA Synthesis を増大させないことが明らかとなった。また、遺伝毒性も認められなかった。

Wistar 系雄ラットを使用して、微小核試験を行った。2000 mg/kg 体重の L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを 10 匹のラットの胃内に強制投与した。同時に negative control (5匹) と positive control 群 (5匹) を作製した。negative control と positive control 群ラット及び試験群の 5 匹ラットは 24 時間後に屠殺した。試験群の残りの 5 匹は 48 時間後に屠殺した。骨髄の塗抹標品を作製し、赤血球中に微小核の存在を調べた。この実験を行った著者は L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムには微小核試験において変異原性は認められなかったとしている。

#### 5. ヒト試験<sup>30)</sup>

ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏に起因する悪性貧血は、F-G の大量投与により、マスクされる。しかしながら、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G にはこの危険性がないと思われる。なぜならば、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態ではメチオニンシンターゼ活性が低下しているため、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G から THF-G が生じにくくなっていると考えられるからである。しかし、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏患者に L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G を長期に投与した実験データはない。

血清のホモシステインの上昇は、心臓脈管系疾患のリスクファクターとなることが知られている。疫学実験のメタ分析によれば、0.5~5mg の F-G の投与は、血清中のホモシステイン含量を 25~33%低下させることが明らかにされている。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムあるいは F-G を 3 期間にわけて合計 24 週間、950 μg/日投与した。その結果、血清中のビタミン B<sub>9</sub> 濃度は高まり、血清中のホモシステイン濃度は 9



～19%低下した。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムとF-Gの効果は同じであった。

血液透析患者にL-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムを17mg/日、12週間経口投与したが、毒性を示したとは報告されていない。この時の血清中のビタミンB<sub>9</sub>濃度を表6に示した。血清中のビタミンB<sub>9</sub>濃度は14倍も高くなっている。なお、この実験では、血清中のホモシステイン含量が17%ほど投与により低下したと報告されている。

#### IV. 考察

ヒトにおいて、F-GとL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gの体内運命は、投与量が1mgまでは同じであると考えられる。F-Gの毒性に関して、一番問題となる欠点は、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏の大赤血球性貧血をマスクし、もう一つの臨床症状であるより深刻な亜急性連合変性(ACD)と呼ばれる神経障害を悪化させてしまうことである。しかしながら、このことが問題となった時代はビタミンB<sub>12</sub>欠乏の治療方法が確立されていない時の問題である。現在では、血漿中と赤血球中のビタミンB<sub>9</sub>とビタミンB<sub>12</sub>濃度を測定することで解決可能な問題である。しかしながら、医師の診断を受けていないヒトが、F-Gを、強化食品などにより知らず知らずのうちに数mg摂り続けた場合は依然として残る課題である。この欠点を補うものがL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gである。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウムは、水系ではCa<sup>2+</sup>とL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gイオンに完全に解離する。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gは吸収されて、循環系に入る。この時点で、食物由来のビタミンB<sub>9</sub>やその代謝産物と区別がなくなる。なお、血漿中のビタミンB<sub>9</sub>の主要な形はL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gである。L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムの吸収効率はF-Gとほぼ同じか、わずかに高い。したがって、生物系食料中のビタミンB<sub>9</sub>の2倍のビタミンB<sub>9</sub>活性を有することになる。

F-GとL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gは分子内にグルタミン酸を有することから、神経毒作用の有無が議論となったが、むしろ、神経毒として知られている化合物に対して拮抗剤(つまり保護作用)となることが明らかにされた。

SCFはF-Gの上限量を1mg/adult/dayとしている。また、SCFは、ビタミンB<sub>9</sub>補酵素型、例えば、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gの高用量が危険であるという情報はないが、さらなる研究が必要であるとしている(The EFSA journal, 2004, 135, 1-20)。

JECFAは、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムの吸収効率と代謝に関しては、生物系食料中に含まれる5-MTHF-Gnと同じであるということは確認したが、食品への添加に関する問題に関しては、関与しないという立場をとっている。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムの純度に関する問題であるが、純度は95%以上のものが使用されている。市販品は6S、 $\alpha$ S配位のL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムである。立体異性体の $\alpha$ R配位のL-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウム含量は0.1%以下である。主要な不純物はD-5-CH<sub>3</sub>-THF-G(6R、 $\alpha$ S)であるが、1.0%を超えない標品が使用されている。他のビタミンB<sub>9</sub>やその関連化合物、例えば、F-G、THF-G、5、10-メチレンTHF-G、4-アミノ安息香酸グルタミン酸、5-メチルテトラヒドロプテリン酸、4 $\alpha$ -ヒドロキシ-L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gなどの含量は2.5%以下とされている。これらの不純物の急性毒性は低く、変異原性は認められず、遺伝毒性は低い。

ラットを用いた中期投与実験では、最高投与量の400mg/kg体重の雄ラットにおいて、血漿中のAspartate aminotransferase、Lactate dehydrogenase、creatine kinase活性が有意に低い値を示したことのみであった。しかし、雌ラットでは認められなかった。さらに、妊娠ラットを用いた使用した胚毒性と催奇形成試験では、L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムでは1000mg/kg体重でも影響は認められなかった。

L-5-CH<sub>3</sub>-THF-Gカルシウムのラットの中期毒性試験(13週間)のデータを採用すると、ラットのNOELは400mg/kg体重となる。個体差と種差、さらに慢性毒性試験ではないことを考慮して、安全係数を1000とすると、ヒトにおけるAIは0.4mg/kg体重となる。60kgのヒトならば、24mg/日となる。F-Gの上限量は1mg/adult/dayと策定されていることを考えると、この値は妥当であると思われる。

他の中期投与実験においても、NOELは40mg/kg体重である。中期投与であるので、1000でわると、0.4mg/kg体重となる。さらに、同じ中期毒性試験において、NOELを360mg/kg体重と、安全係数を1000とすると、0.36mg/kg体重となり、60kgの体重のヒトならば、約20mg/kg体重となる。

ビタミンB<sub>9</sub>の必要量(欠乏を予防できる最低摂取量、生物系食料由来のビタミンB<sub>9</sub>量として200 $\mu$ g/日程度)から考えると、生物系食料由来からでは、とうてい摂取するこ



とができない数値である。したがって、1日許容上限量は生物系食料由来のビタミン B<sub>9</sub> 摂取量を考慮せずに、算定すればよい。

日本でも食品へのビタミン B<sub>9</sub> の添加の有効性が議論されはじめているが、①添加量の問題、②添加する食料の限定に関する問題、③診断を受けていないビタミン B<sub>12</sub> 不足者の神経障害マスキング問題、があるので、現在の日本の社会情勢を考えれば、食品に添加するよりも、自分の意識でビタミン B<sub>9</sub> の補足を認識させた方がよい。

結論として、日本では、食品にビタミン B<sub>9</sub> を添加する施策は実施する必要はない。ヒトがビタミン B<sub>9</sub> として認識をして上で、摂取させるべきである。

## VI. 引用文献

- 1 Wills L. 1933. The nature of the haemopoietic factor in Marmite. *Lancet*, **1**, 1283-1285.
- 2 Wills L, Clutterbuck PW, Evans BDF. 1937. A new factor in the production and cure of certain macrocytic anaemias. *Lancet*, **1**, 311-314.
- 3 Wald N. 1991. MRC Vitamin Study Research Group Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*, **38**, 131-137.
- 4 Scott JM, Weir DG. 1991. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q. J. Med.*, **89**, 561-563.
- 5 McPartlin J, Hallongan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. 1993. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet*, **341**, 148-149.
- 6 Dickinson CJ. 1995. Does folic acid harm people with vitamin B<sub>12</sub> deficiency? *Q. J. Med.*, **88**, 357-364.
- 7 Spector R, Lorenzo AV. 1975. Folate transport in the central nervous system. *Am. J. Physiol.*, **229**, 777-782.
- 8 Reynolds EH. Cerebrospinal fluid folate: clinical studies. In *Folic Acid in Neurology, Psychiatry and Internal Medicine* (Ed. Botez MI and Reynolds EH), pp. 195-203.
- 9 Reynolds EH, Gallagher BB, Mattson RH, Bowers M, Johnson AL. 1972. Relationship between serum and cerebrospinal fluid folate. *Nature*, **240**, 155-157.
- 10 Selby JV, Friedman GD, Fireman BH. 1989. Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up. *Cancer Res.*, **49**, 5736-5747.
- 11 Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. 1993. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85**, 875-884.
- 12 Butterworth CE Jr, Hatch KD, Macaluso M, Cole P, Sauberlich HE, Soong SJ, Borst M, Baker VV. 1992. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA*, **267**, 528-533.
- 13 Heimburger DC, Alexander CB, Birch R, Butterworth CE, Balley WC, Krumdieck CL. 1988. Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B<sub>12</sub>. *JAMA*, **259**, 1525-1530.
- 14 Herbert V. 1993. Folate deficiency to protect against malaria. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1127.
- 15 Sesin GP, Krischenbaum H. 1979. Folic acid hypersensitivity and fever: a case report. *Am. J. Hosp. Pharm.*, **36**, 1565-1567.
- 16 Sparling R, Abela M. 1985. Hypersensitivity to folic acid therapy. *Clin. Lab. Haematol.*, **7**, 184-185.
- 17 Gotz VP, Lauper RD. 1980. Folic acid hypersensitivity for tartazine allergy? *Am. J. Hosp. Pharm.*, **37**, 1470-1474.
- 18 Woodliff HJ, Davis RE. 1966. Allergy to folic acid. *Med. J. Aust.*, **1**, 351-352.
- 19 Mathur BP. 1966. Sensitivity of folic acid: a case report. *Indian J. Med. Sci.*, **20**, 133-134.
- 20 Parchure M, Ambaye RY. 1984. Gokhale SV. Combination of anticancer agents with folic acid in the treatment of murine leukaemia P388. *Chemotherapy*, **30**, 19-24.
- 21 Parchure M, Ambaye RY, Lalitha VS, Gokhale SV. 1985. Acute toxicity of folic acid in mice. *Experientia*, **41**, 72-73.
- 22 Olney JW, Fuller TA, de Gubareff T. 1981. Kainate-like neurotoxicity of folates. *Nature*. **292**, 165-167.
- 23 Tremblay E et al. 1983. Are convulsant and toxic properties of folates of the kainite type? *Eu. J. Pharmacol.*, **93**, 283-286.
- 24 Sattayasai J, Ehrlich D. 1987. Folic acid protects chick retinal neurons against the neurotoxic action of excitatory amino acids. *Exp. Eye Res.*, **44**, 523-535.
- 25 住吉好雄, 塩田浩平, 申宰昊. 平成9年度厚生省心身障害研究「ハイリスク児の健全育成のシステム化に関する研究」p. 165.
- 26 Achon M, Alonso-Aperte E, Reyes L, Ubeda L, Varela-Moreiras G. 2000. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine



- cycle. *Br. J. Nutr.*, **83**, 177-183.
- 27 Achon M, Alonso-Apperte E, Varela-Moreiras G. 2002. High dietary folate supplementation: Effects on diet utilization and methionine metabolism in aged rats. *J. Nutr. Health, Aging*, **6**, 51-54.
  - 28 Achón M, Alonso-Apperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G. 2007. upranormal dietary folic acid supplementation: effects on methionine metabolism in weanling rats. *Br. J. Nutr.*, **98**, 490-496.
  - 29 Campbell NRC. 1996. How safe are folic acid supplements? *Arch. Intern. Med.*, **156**, 1638-1644.
  - 30 Safety evaluation of certain food additives. WHO Additives Series : 56. Prepared by the Sixty-fifth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2006.
  - 31 Sehlab J, Powell GM, Rosenberg IH. 1984. Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate. *Am. J. Physiol.*, **246**, G515-G520.
  - 32 Strum WB, Hanstein WG. 1978. Pharmacokinetics of 5-methyltetrahydrofolate. *Research Communication Chemistry Pathology Pharmacology*, **20**, 449-456.
  - 33 Home DW, Briggs WT, Wagner C. 1978. Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in freshly isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **258**, 3529-3535.
  - 34 Branda RF, Anthony BK, Jacob HS. 1978. The mechanism of 5-methyltetrahydrofolate transport by human erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **61**, 1270-1275.
  - 35 McMartin KE, Morshed KM, Hazen-Martin DJ, Sens DA. 1992. Folate transport and binding by cultured human proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.*, **263**, F841-848.
  - 36 Levitt M, Nixon PF, Pincus JH, et al. 1971. Transport characteristics of folates in cerebrospinal fluid; a study utilizing doubly labeled. 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1301-1308.
  - 37 General Nutrition Corporation 社が FDA に提出した資料  
[http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/95s0316/rpt0023\\_01.pdf](http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/95s0316/rpt0023_01.pdf)





図1. 赤血球前駆細胞の巨大赤芽球

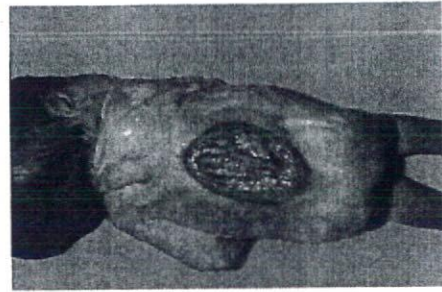


図2. 胎児の神経管閉鎖障害



図3. 胎児の無脳症

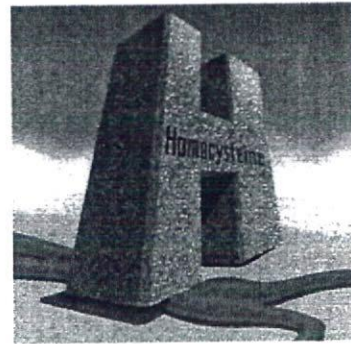


図4. ホモシステインによる血管壁の酸化

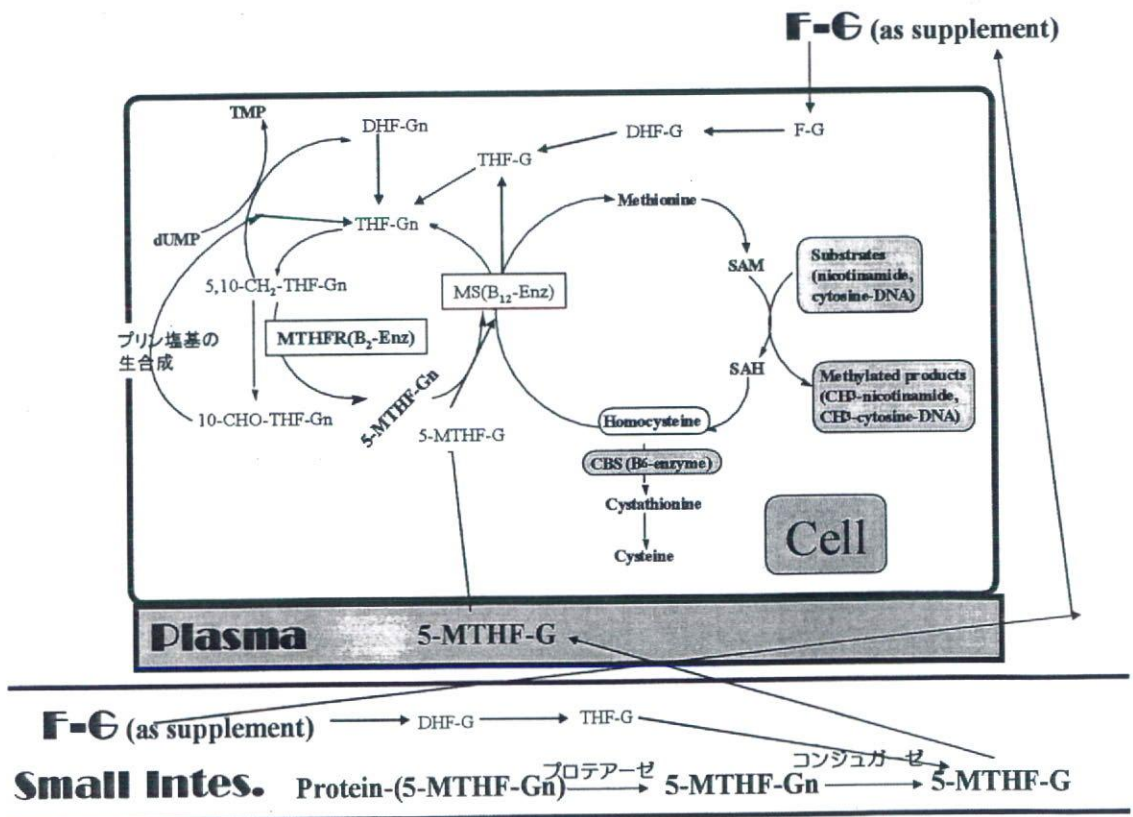


図5. 経口摂取されたビタミンB<sub>9</sub>あるいはF-Gの体内運命



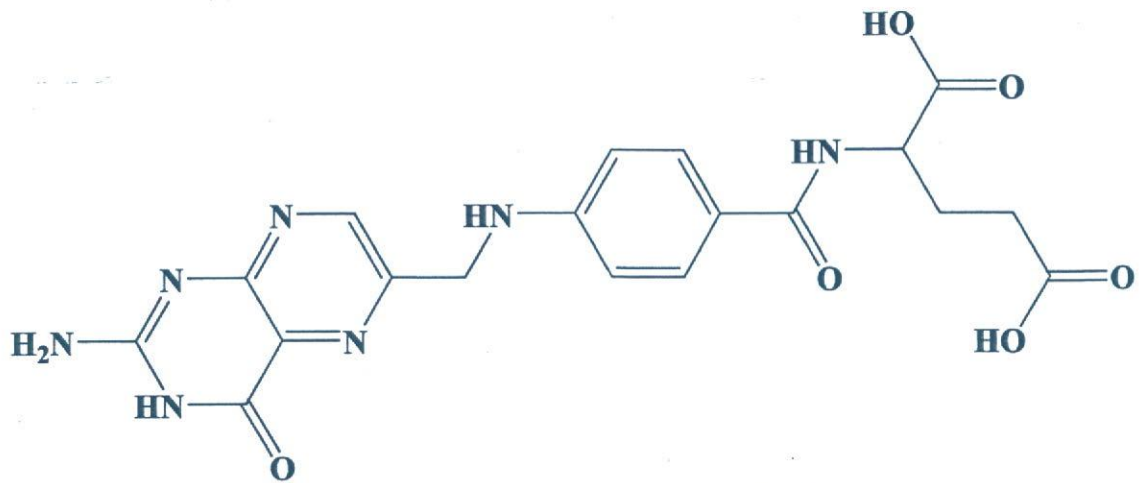
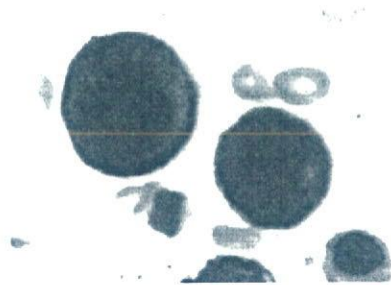


図6. 葉酸（プテロイルモノグルタミン酸=PGA=FA）の構造式  
 $C_{19}H_{19}N_7O_6 = 441.4$



		<b>MCV=mean corpuscular volume</b> 平均血球体積
<b>MCV 正常</b>	<b>MCV 大</b>	<b>MCH=mean corpuscular hemoglobin</b> 平均血球ヘモグロビン量
<b>MCH 正常</b>	<b>MCH 高</b>	

図7. ビタミンB<sub>12</sub>欠乏による悪性貧血.



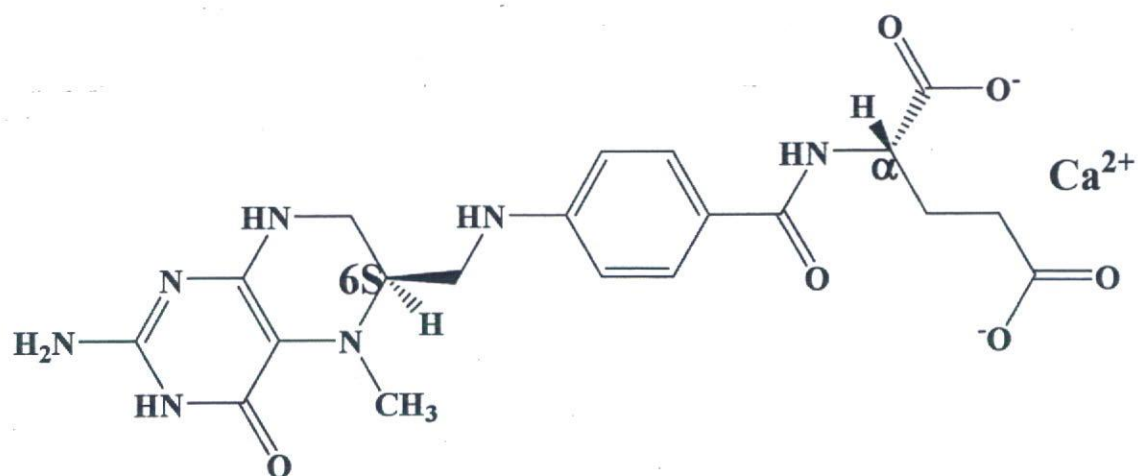


図8. L-5-CH<sub>3</sub>-THF-G カルシウム塩の構造式

C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>CaN<sub>7</sub>O<sub>6</sub> =497.5, CAS No. 151533-22-1



表 1. 空腸のコンジュガーゼ活性におよぼす食品成分の影響

食品名	豚コンジュガーゼ (阻害%)	ヒトコンジュガーゼ (阻害%)
オレンジジュース	80.0	73.4
バナナ	45.9	46.0
カリフラワー	25.2	15.3
コーンミール	35.3	28.3
リマ豆	35.6	35.2
まだら豆	35.1	33.2
ほうれん草	21.1	13.9
トマト	8.1	14.2

Am. J. Clin. Nutr., 51, 87-94 (1990)

表 2. 種々のマウスにおける F-G の LD<sub>50</sub> (腹腔内投与)

系統	雌雄	LD <sub>50</sub> (mg/kg) ± SE
C57BL/Cri	M	100 ± 12.86
C57BL/Cri	F	85 ± 10.00
AKR/RdBCri	M	260 ± 18.21
AKR/RdBCri	F	180 ± 14.54
S/RVCri	M	330 ± 20.11
S/RVCri	F	225 ± 0.50
DBA/2fNCri	M	175 ± 32.80
BDF <sub>1</sub>	M	180 ± 14.63
ICRC/HiCri	F	225 ± 11.74
S/RVCri-ba	F	225 ± 10.94



表 3. 妊娠マウスの高温負荷における F-G の保護効果

群	妊娠0日から9.5日まで1日1回 F-G (3 mg/kg) 腹腔内投与 38℃で15分間温浴	42℃で15分間温浴のみ	妊娠0日から9.5日まで1日1回 F-G (3 mg/kg) 腹腔内投与 42℃で15分間温浴
産仔数/匹	12	14	14
総胎仔数	163	166	159
早期吸収胚	17 (10.4)	30 (23.5)	31 (19.5)
早期死亡数	15 (9.2)	39 (23.5)	24 (15.1)
生存胎仔数	146	127	128
奇形仔	0 (0.0)	49 (38.6)	34 (26.6)
神経管奇形仔	0 (0.0)	49 (38.6)	34 (26.6)



表4. 受胎前後における F-G 投与の影響

文献	被験者	投与量 (mg/d)	投与期間	影響
Laurence et al (1981)	95 women	4	9 週間以上	なし
Smithells et al (1981)	550 women	1	平均投与期間 110	なし
Vergel et al (1990)	81 women	5	3 か月以上	なし
Wald et al (1991)	910 women	4	2,3 か月	なし
Czeizel et al. (1992)	4753 women	0.8	3 か月	なし
Kirke et al (1992)	354 pregnant women	0.36	5 か月	なし

- ✓ Laurence KM, et al., Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. Br. Med. J., 282, 1509-1511, 1981.
- ✓ Smithells RW et al., Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. Arch. Dis. Child., 56, 911-918, 1981.
- ✓ Vergel RG et al., Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementations; Cuban experience. Prenat. Diagn., 10, 149-152, 1990.
- ✓ Wald N et al., Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council vitamin Study. Lancet, 338, 131-137, 1991.
- ✓ Czeizel AF et al., Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N. Engl. J. Med., 327, 1832-1835, 1992.
- ✓ Kirke PN et al., A randomized trial of low-dose folic acid to prevent neural tube defects. Arch. Dis. Child., 67, 1442-1446, 1992.



表5. L-5-MTHF-G カルシウム塩の純度など

規格	数値
純度	95%以上
水分含量	
カルシウム含量	7.0~8.5%
鉛含量	2 mg/kg 未満
他の葉酸類	2.5%未満 プテロイルモノグルタミン酸, テトラヒドロ葉酸, 5,10-メチレンテ トラヒドロ葉酸, 4 アミノ安息香酸グルタミン酸, 5-メチルテトラ ヒドロプテリン酸, 4 $\alpha$ -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸,
L-5-MTHF-Gの立体異 性体など	1.0%未満 (6R)-5-メチルテトラヒドロ葉酸

表6. F-G (15 mg/d) あるいはL-5-MTHF-G カルシウム (17 mg/d ; F-G として 15 mg) を  
 12 週間投与した時の血清葉酸類濃度

	F-G (n = 25)	L-5-MTHF-G カルシウム (n = 25)
血清ビタミン B <sub>9</sub> 濃度 (投与 前)	32.2 ng/ml (76.2% L-5-MTHF)	38.1 ng/ml (86.3% L-5-MTHF)
血清ビタミン B <sub>9</sub> 濃度(投与 12 週間後)	466 ng/ml (50% L-5-MTHF)	407 ng/ml (97% L-5-MTHF)



分担研究報告書

食物繊維の健康影響：系統的レビュー

分担研究者 佐々木 敏、村上健太郎\*

東京大学大学院医学系研究科公共健康医学専攻疫学保健学講座社会予防疫学分野

\*研究協力者

研究要旨

近年、多くの研究者が、食物繊維が健康に与える影響に注目を向けており、欧米を中心に数多くの研究が行われている。そこで、日本人の食事摂取基準 [2010 年版] の策定の際の基礎的な資料の作成を目的として、食物繊維の健康影響を検討した学術論文を網羅的に収集し、現時点での科学的知見をまとめた。今回は、糖尿病、循環器疾患、がん、血圧、血中コレステロール、肥満、および便秘に焦点をしばって、文献収集を行った。

ここでは、①食物繊維摂取量と 2 型糖尿病の発症との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、②食物繊維摂取量と循環器疾患、脳卒中、および心筋梗塞の発症および死亡との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、③食物繊維摂取量とがん発症との関連を検討した前向きコホート研究、④食物繊維が血圧に与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑤食物繊維が血中コレステロールに与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑥食物繊維摂取量と肥満との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、および⑦食物繊維摂取量と便秘との関連を検討した観察研究の系統的レビューを行った。文献検索には PubMed を用い、収集した文献の引用文献による文献収集も行った。

その結果、食物繊維による、2 型糖尿病、心筋梗塞、結腸・直腸がん、高血圧、高コレステロール血症、肥満の予防効果が示唆された。今回収集した文献は、日本人の食事摂取基準 [2010 年版] の策定の際の基礎的な資料となるものである。しかしながら、日本人を含むアジア人を対象とした研究は依然として非常に少ないので、アジア人を対象とした研究が必要である。

A. 研究の背景ならびに目的

近年、多くの研究者が、食物繊維が健康に与える影響に注目を向けており、欧米を中心に数多くの研究が行われている。そこで、日本人の食事摂取基準 [2010 年版] の策定の際の基礎的な資料の作成を目的として、食物繊維の健康影響を検討し

た学術論文を網羅的に収集し、現時点での科学的知見をまとめた。今回は、糖尿病、循環器疾患、がん、血圧、血中コレステロール、肥満、および便秘に焦点をしばって、文献収集を行った。

B. 方法



ここでは、①食物繊維摂取量と2型糖尿病の発症との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、②食物繊維摂取量と循環器疾患、脳卒中、および心筋梗塞の発症および死亡との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、③食物繊維摂取量とがん発症との関連を検討した前向きコホート研究、④食物繊維が血圧に与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑤食物繊維が血中コレステロールに与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑥食物繊維摂取量と肥満との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、および⑦食物繊維摂取量と便秘との関連を検討した観察研究の系統的レビューを行った。文献検索にはPubMedを用い、収集した文献の引用文献による文献収集も行った。

## C. 結果

### 2型糖尿病

表1に示すように、13の前向きコホート研究において食物繊維摂取量と2型糖尿病の発症との関連が検討されていた。そのうち3つの研究において、総食物繊維摂取量と糖尿病発症とのあいだに有意な負の関連がみられた。

水溶性食物繊維の影響を検討した研究は3つあったが、有意な関連を示した研究はなかった。一方、不溶性食物繊維の影響を検討した研究も3つあり、そのうちの2つで有意な負の関連が観察された。

穀物由来食物繊維の影響を検討した研究は13あり、そのうち8つの研究で有意な負の関連がみられた。果物由来食物繊維および野菜由来食物繊維の影響を検討した研究はそれぞれ11と9あったが、有意な負の関連を示した研究はそれぞれ1つのみであった。豆類由来食物繊維の影響を検討し

た研究も5つあったが、有意な関連を示した研究はなかった。

### 循環器疾患、脳卒中、および心筋梗塞

表2に示すように、17の前向きコホート研究において食物繊維摂取量と循環器疾患、脳卒中、および心筋梗塞との関連が検討されていた。約半数の研究において、食物繊維の望ましい効果が観察された。

### がん

表3に示すように、31の前向きコホート研究で食物繊維摂取量とがんの発症との関連が検討されていた。子宮、膵臓、卵巣、および乳がん食物繊維の有意な関連はほとんどの研究においてみられなかったが、約半数の研究において、結腸・直腸がんに与える食物繊維の望ましい効果が観察された。

### 血圧

表4に示すように、食物繊維が血圧に与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスは2つあった。食物繊維の血圧降下作用が示された。

### 血中コレステロール

表5に示すように、食物繊維が血中コレステロールに与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスは1つだけあった。食物繊維の血中コレステロール降下作用が示された。

### 肥満

表6に示すように、4つの前向きコホート研究において食物繊維摂取量と肥満との関連が検討さ



れていた。そのうち3つの研究で、食物繊維摂取量と肥満とのあいだの有意な負の関連が示された。

## 便秘

表7に示すように、8つの観察研究において食物繊維摂取量と便秘との関連が検討されていた。そのうち2つの研究で、食物繊維摂取量と便秘とのあいだの有意な負の関連が示された。日本人を対象とした2つの研究では有意の関連はみられなかった。

## D. 考察

今回、糖尿病、循環器疾患、がん、血圧、血中コレステロール、肥満、および便秘に焦点をしばって、系統的に文献収集を行った。その結果、食物繊維による、2型糖尿病、心筋梗塞、結腸・直腸がん、高血圧、高コレステロール血症、肥満の予防効果が示唆された。今回収集した文献は、日本人の食事摂取基準 [2010年版] の策定の際の基礎的な資料となるものである。しかしながら、日本人を含むアジア人を対象とした研究は依然として非常に少ないので、アジア人を対象とした研究が必要である。

## E. 結論

近年、多くの研究者が、食物繊維が健康に与える影響に注目を向けており、欧米を中心に数多くの研究が行われている。そこで、日本人の食事摂取基準 [2010年版] の策定の際の基礎的な資料の作成を目的として、食物繊維の健康影響を検討した学術論文を網羅的に収集し、現時点での科学的知見をまとめた。今回は、糖尿病、循環器疾患、がん、血圧、血中コレステロール、肥満、および

便秘に焦点をしばって、文献収集を行った。

ここでは、①食物繊維摂取量と2型糖尿病の発症との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、②食物繊維摂取量と循環器疾患、脳卒中、および心筋梗塞の発症および死亡との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、③食物繊維摂取量とがん発症との関連を検討した前向きコホート研究、④食物繊維が血圧に与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑤食物繊維が血中コレステロールに与える影響を検討した介入試験のメタアナリシスのまとめ、⑥食物繊維摂取量と肥満との関連を検討した前向きコホート研究の系統的レビュー、および⑦食物繊維摂取量と便秘との関連を検討した観察研究の系統的レビューを行った。文献検索には PubMed を用い、収集した文献の引用文献による文献収集も行った。

その結果、食物繊維による、2型糖尿病、心筋梗塞、結腸・直腸がん、高血圧、高コレステロール血症、肥満の予防効果が示唆された。今回収集した文献は、日本人の食事摂取基準 [2010年版] の策定の際の基礎的な資料となるものである。しかしながら、日本人を含むアジア人を対象とした研究は依然として非常に少ないので、アジア人を対象とした研究が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし