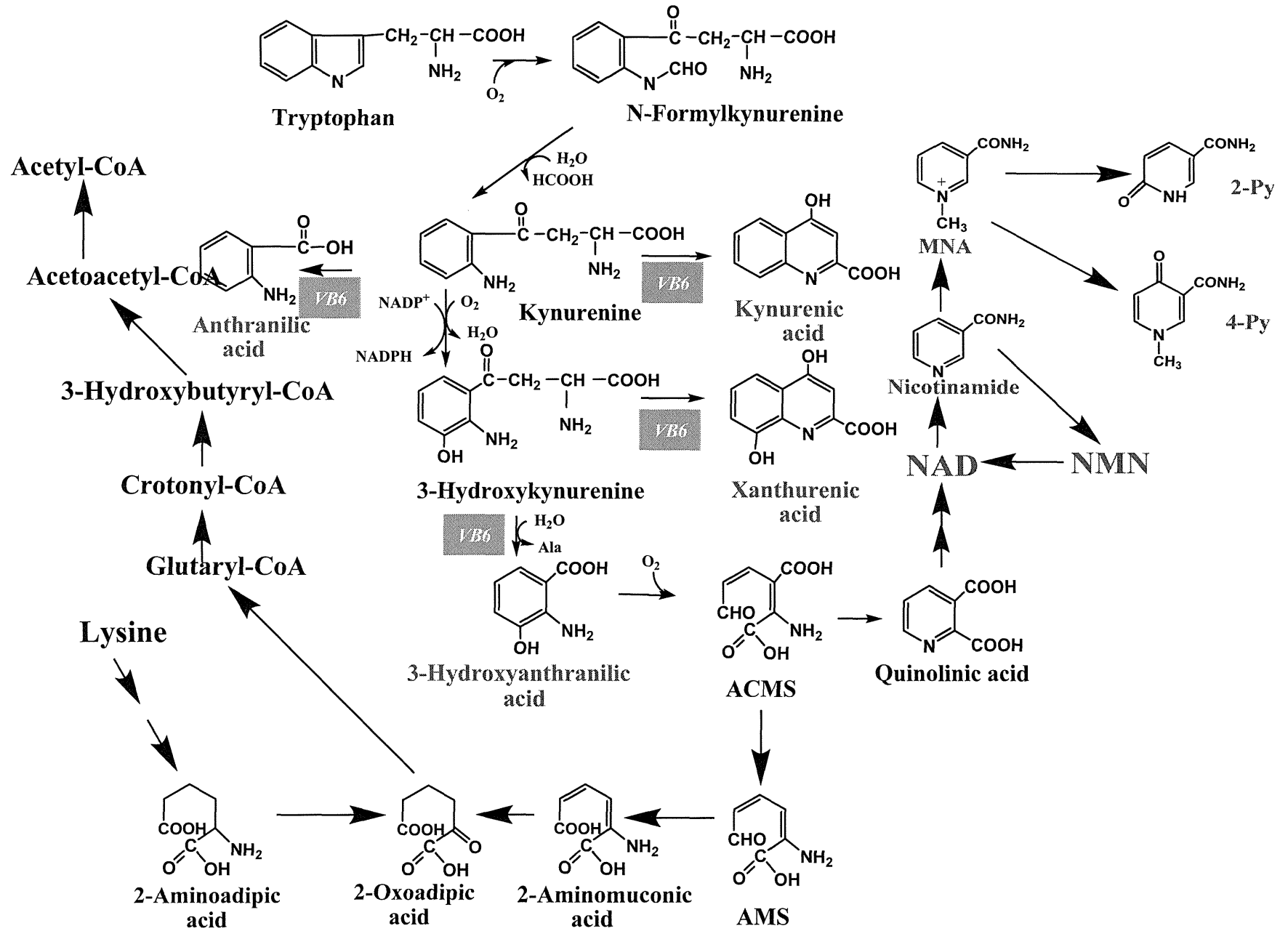


- the human subject on a pyridoxine-deficient diet. *Arch Biochem* (1949) **21**, 237-239.
- 31) Wachstein M, Gudaitis A. Detection of vitamin B<sub>6</sub> deficiency: utilization of improved method for rapid determination of xanthurenic acid in urine. *Am J Clin Path* (1952) **22**, 652-655.
- 32) Sprince H, Lowry RS, Folsome CE, Behrman JS. Studies on the urinary excretion of "xanthurenic acid" during normal and abnormal pregnancy: A survey of the excretion of "xanthurenic acid" in normal nonpregnant, normal pregnant, pre-eclamptic, and eclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* (1951) **62**, 84-92.
- 33) Vandelli I. The use of vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine) for suppressing the elimination of xanthurenic acid in pregnant and non-pregnant women following the oral intake of a measured quantity of tryptophan. *Acta Vitamin* (Milano) (1951) **5**, 55.
- 34) Wachstein M, Gudaitis A. Disturbance of vitamin B<sub>6</sub> metabolism in pregnancy. II. The influence of various amounts of pyridoxine hydrochloride upon the abnormal tryptophane load test in pregnant women. *J Lab Clin Med* (1953) **42**, 98-107.
- 35) Wachstein M, Lobel S. Abnormal tryptophan metabolites in human pregnancy and their relation to deranged vitamin B<sub>6</sub> metabolism. *Proc Soc Exp Biol* (1954) **86**, 624-627.
- 36) Rose DP, Adams PW. Oral contraceptives and tryptophan metabolism: Effects of oestrogen in low dose combined with a progestagen and of a low-dose progestagen (megestrol acetate) given alone. *J Clin Path* (1972) **25**, 252-258.
- 37) Rose DP. Excretion of xanthurenic acid in the urine of women taking progestogen-oestrogen preparations. *Nature* (1966) **210**, 196-197.
- 38) Rose DP. The influence of oestrogen on tryptophan metabolism in man. *Clin Sci* (1966) **31**, 265-272.
- 39) Toseland PA, Price S. Tryptophan and contraceptives. (Correspondence) *Brit Med J* (1969) **1**, 777.
- 40) Luhby AL, Brin M, Gordon M, Davis P, Murphy M, Spiegel H. Vitamin B<sub>6</sub> metabolism in users of oral contraceptive agents. I. Abnormal urinary xanthurenic acid excretion and its correction by pyridoxine. *Am J Clin Nutr* (1971) **24**, 684-693.
- 41) Rose DP, McGinty F. The influence of adrenocortical hormones and vitamins upon tryptophan metabolism in man. *Clin Sci* (1968) **35**, 1-9.
- 42) Rose DP, Braidman IP. Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Am J Clin Nutr* (1971) **24**, 673-683.
- 43) Altman K, Greengard. Correlation of kynurenine excretion with tryptophan pyrrolase levels in disease and after hydrocortisone. *J Clin Invest* (1966) **45**, 1527-1534.

- 44) Kitamura J, Fukuwatari T, Ohta M, Higashida M, Sasaki R, Shibata K. Comparison of the metabolism of tryptophan to nicotinamide among humans, rats, and mice. *Journal of Creative Approach for Health* (2005) **3**, 125-130.
- 45) Badawy AAB, Morgan CJ, Turner JA, Dougherty DM, Marsh DM, Mathias CW, Addicott MA, Jaga AA. Assessment of the kynurenine pathway in humans: I. Normal plasma values, ethnic differences and their clinical implications. *International Congress Series* (2007) **1304**, 335-343.
- 46) Hiratsuka C, Fukuwatari T, Shibata K. Fate of dietary tryptophan in young Japanese women. *Int J Tryptophan Res* (2012) **5**, 33-47.
- 47) Musajo L. *Atti accad Lincei* (1935) **21**, 368.
- 48) Kotake Y, Inada T. Studies on xanthurenic acid. II. Preliminary report on xanthurenic acid diabetes. *J Biochem* (1953) **40**, 291-294.
- 49) Kotake Y, Ueda T, Mori T, Murakami E, Hattori M. The physiological significance of the xanthurenic acid-insulin complex. *J Biochem* (1975) **77**, 685-687.
- 50) Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* (1998) **392**, 289-292.
- 51) Lima VLA, Dias F, Nunes RD, Pereira LO, Santos TSR, Chiarini LB, Ramos TD, Silva-Mendes BJ, Perales J, Valente RH, Oliveira PL. The antioxidant role of xanthurenic acid in the *Aedes aegypti* Midgut during digestion of a blood meal. *PLoS ONE* 7(6), e38349. Doi:10.1371/journal.pone.003849. (2012)
- 52) Ferré J, Real MD, Ménsua JL, Jacobson KB. Xanthurenic acid 8-O-b-glucoside, a novel tryptophan metabolite in eye-color mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* (1985) **260**, 7509-7514.
- 53) <http://hypophosphatasia.life.coocan.jp/> (2013年2月24日チェック).
- 54) Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA, Coburn SP. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. *J Clin Invest* (1985) **76**, 752-756.

図1. トリプトファン異化代謝経路



厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
（総合）研究報告書

日本人の食事摂取基準の改定と活用に資する総合的研究

研究代表者 徳留 信寛 国立健康・栄養研究所 理事長

Ⅱ. 研究分担者の報告書

5. 妊婦の葉酸必要量

研究分担者 柴田 克己 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科

研究要旨

1. 葉酸サプリメントとして使用されているプテロイルモノグルタミン酸の安全性に関する情報をまとめた。この安全性に関する情報は、厚生労働科学研究費補助金 循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業 「日本人の食事摂取基準」策定のための文献学研究（主任研究者 佐々木敏）平成 19 年度 総括・分担研究報告書に報告した「葉酸類の安全性に関する論文調査」から関連する記述を抽出し、追加したものである。
2. 妊婦の葉酸付加量は、推定平均必要量で 200  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、推奨量で 240  $\mu\text{g}/\text{日}$ と策定されている。日本人非妊婦女性の葉酸の推定平均必要量 200  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、推奨量は 240  $\mu\text{g}/\text{日}$ である。したがって、妊婦の推定平均必要量は 400  $\mu\text{g}/\text{日}$ 、推奨量は 480  $\mu\text{g}/\text{日}$ となる。日本人女性の 1,000 kcal 当たりの葉酸摂取量は 150  $\mu\text{g}$  である。つまり、葉酸摂取量を 200  $\mu\text{g}$  増大させるのは、1,300 kcal もの食事を摂らなければならないことを意味する。妊婦の葉酸の付加量が、なぜ実行が困難なこのような大きな値になっているのかを調べた。

## A. 栄養強化剤としてプテロイルモノグルタミン酸の登場の背景

現在の知識で、過去の研究論文をみてみると、最初の葉酸欠乏に起因する症例の報告は、英国の内科医 Lucy Wills が<sup>1)</sup>、インドにおいて貧しい織物工が妊娠末期に巨大赤芽球性貧血となったことを報告したものである(1933年)。彼は、ラットやサルにタンパク質と野菜を欠乏した飼料を投与することにより、同じような症状を誘発させた。さらに、彼は、欠乏動物と妊娠性貧血患者をマーマイトと呼ぶ酵母抽出液で治癒させた(1937年<sup>2)</sup>)。この治癒因子の単離と合成は1940年代になされた。

葉酸欠乏は、妊娠性貧血、胎児の神経管閉鎖障害<sup>3)</sup>や無脳症<sup>3)</sup>を引き起こすばかりでなく、動脈硬化症の引き金となるホモシステイン<sup>4)</sup>の血清中の値を高くする。

日本での成人の葉酸の推定平均必要量は200 $\mu$ g/日であるが、妊娠を計画している人には、次の注意事項を記載している<sup>5)</sup>。「胎児の神経管閉鎖障害とは、受胎後およそ28日で閉鎖する神経管の形成異常であり、臨床的には無脳症・二分脊椎・髄膜瘤などの異常を呈する。受胎前後のプテロイルモノグルタミン酸摂取が、神経管閉鎖障害のリスク低減に有効であることは数多くの研究から明らかにされている。葉酸代謝に関連する酵素(methylenetetrahydrofolate reductase)の遺伝子多型が神経管閉鎖障害の発生リスクと関連するという報告がみられる)。その他に葉酸摂取によってリスク低減が期待される胎児奇形として、口唇・口蓋裂や先天性心疾患があげられている。したがって、もっとも重要な神経管の形成期に、母体が十分な葉酸栄養状態であることが望ましい。しかし、

受胎の時期の予測は困難であり、どの程度の葉酸摂取が望ましいのか、用量依存的な実験報告はない。そこで、受胎前後の3か月以上の間、0.36~5 mg/日のプテロイルモノグルタミン酸が投与されていたという報告に基づいて、もっとも低い数値である0.36 mg/日を神経管閉鎖障害発症の予防量とし、平滑化して0.4 mg/日とした。なお、プテロイルモノグルタミン酸として400  $\mu$ g/日という量は、食事性葉酸としては2倍の800  $\mu$ g/日に相当する。」この800  $\mu$ gという葉酸の量は、生物系の食品のみからでは摂取できない量である。エネルギー1000 kcal当たりの平均的な葉酸濃度は、150  $\mu$ gである<sup>6)</sup>。サプリメントとして葉酸を摂取することを推奨する注意喚起である。

葉酸サプリメントの使用に当たり、正確な情報を整理しておく。受胎前後におけるプテロイルモノグルタミン酸投与の影響を表1にまとめた。

まず、妊娠初期に葉酸が必要とされる理由と妊娠末期に葉酸が必要とされる理由は異なるということである。

妊娠初期は、1万人に3~4人の頻度で発生する神経管閉鎖障害という病気の予防のためである<sup>7)</sup>。食事摂取基準の目的の一つは欠乏症からの回避である。このための指標として、推定平均必要量と推定平均必要量に分布を考慮して算定された推奨量がある。葉酸の場合は、先に述べたように、推定平均必要量が200  $\mu$ g/日、推奨量が240  $\mu$ g/日である<sup>5)</sup>。推定平均必要量とは健康な集団の50%の人が欠乏症を予防できるであろうと推定される摂取量である。推奨量は97.5%の人が欠乏症を予防できるであろうと推定される摂取量である。推奨量を摂取していても、100人中2~3人

の人は欠乏症を予防できない可能性があることを意味する。神経管閉鎖障害は、0.04%の確率の発生である。つまり、食事摂取基準の概念とは一致しない低い確率の病気である。そのために、食事摂取基準では注意喚起として記載してある。

一方、妊娠末期にみられる大赤血球性貧血は、明らかに葉酸欠乏である。未だ、なぜ妊娠末期には、葉酸の必要量が增大するのかという機構の解明はなされていないが、妊娠末期には葉酸の異化代謝が亢進し、尿中に葉酸の異化代謝産物の排泄量が增大し、その結果として、赤血球中葉酸濃度が低下するという考え方が支配的である<sup>5)</sup>。低下分を付加量として、妊婦に付加すべきであるという考え方である。さらに、葉酸の必要量が妊娠に伴って高くなること、酸化力の強いホモシステインというアミノ酸の血清中の濃度と循環器系の疾患との関係があり、ホモシステインの濃度上昇を葉酸が抑制するという事実がある。また、ポストゲノム時代の流れとして、遺伝子情報を活用して健康の維持を目的とした個人に最適な栄養管理を目指すという新しい学問領域が現れた(パーソナライズ栄養学(Personalized Nutrition))。これは、ヒトの遺伝子多型に基づいたものである。葉酸の必要量に係わるものでは、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(EC 1.5.1.20)(MTHFR:  $5,10\text{-CH}_2\text{-テトラヒドロ葉酸} + \text{NADH} \rightarrow 5\text{-CH}_3\text{-テトラヒドロ葉酸} + \text{NAD}^+$ )の遺伝子多型が知られている。MTHFRをコードする遺伝子のC677T(677番目の塩基がCは野生型、Tは変異型)多型のTT型(両親からT型とT型を遺伝したホモ)のMTHFRをもつヒトは高ホモシステイン血症を示し、脳梗塞や痴呆のリスクを高めることが明らかにさ

れている。このような背景から、葉酸の摂取量を400  $\mu\text{g}/\text{日}$ に高めることに関心が持たれている。ところが、この数値は、生物系食料を基盤とする食生活からでは達成できる量ではない。そこで、葉酸のサプリメントとしてプテロイルモノグルタミン酸の強化食品が米国などでは出現している。

ところが、葉酸には非常に多くの化学形態がある。サプリメントとして使用されている葉酸の化学名は、プテロイルモノグルタミン酸で、その構造式を図1に示した。

## B. プテロイルモノグルタミン酸とは

化学合成されたプテロイルモノグルタミン酸の栄養学上の欠点は、一定濃度を超えると、そのままの形で肝臓細胞などに取り込まれ、ジヒドロプテロイルモノグルタミン酸、テトラヒドロプテロイルモノグルタミン酸(THF-Gと略す;Gはグルタミン酸を意味する)となってしまうことである。THF-Gはポリグルタミン酸シンターゼの良好な基質となりうる。一方、食事性葉酸由来の5-メチルTHF-Gはポリグルタミン酸ポリメラーゼの基質となりえない。5-メチルTHF→THFの変換に関わる酵素がビタミンB<sub>12</sub>を補酵素とするメチオニンシンターゼである。THFはポリグルタミン酸化されTHF-Gn(Gnはポリグルタミン酸化されたグルタミン酸を意味する)となり、さらに5,10- $\text{CH}_2\text{-THF-Gn}$ に変換され、dUMP→dTMP反応に利用される。つまり、プテロイルモノグルタミン酸は、メチオニンシンターゼを介さずに、葉酸補酵素系に入ってしまう、メチオニンシンターゼ非依存的にDNA合成に必要な5,10- $\text{CH}_2\text{-THF-Gn}$ を産生してしまうことである。このような場合、より軽い症状である貧血が顕在化せず、

より深刻な神経疾患症状（末梢神経炎→脊髄の亜急性連合変性症→死）が進行し、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の発見を遅らせることとなるため、プテロイルモノグルタミン酸の大量投与の危険性が指摘されている（詳細は後述）。

### C. 葉酸代謝

生物系食料由来の葉酸は、5-CH<sub>3</sub>-THF-G (図 2) として細胞内に取り込まれる。

5-CH<sub>3</sub>-THF-G は、ビタミン B<sub>12</sub> 依存メチオニンシンターゼにより、THF-G に転換される。そして、ポリグルタミン酸化をうけ、5-CH<sub>3</sub>-THF-Gn として、細胞内に保持され、葉酸補酵素サイクルに入ることになる。

一方、サプリメントや強化食品に使用されるプテロイルモノグルタミン酸は完全にプテリジン環が酸化されたものである。酵素学的に活性型になるためには、まずプテリジン環がジヒドロ型 (DF-G) に還元され、引き続き還元されてテトラヒドロ型 (THF-G) となり、さらにポリグルタミン酸化 (THF-Gn) されなければならない。還元の一連の反応はジヒドロ葉酸還元酵素によって触媒される。完全に酸化されたプテロイルモノグルタミン酸から THF-G になる経路での律速反応は、プテロイルモノグルタミン酸→DHF-G である。

ここで、重要なことは、ポリグルタミン酸化を受ける葉酸の形は THF-G であることである。生物系食料に由来する葉酸の形は 5-CH<sub>3</sub>-THF-G であるが、このメチル化されたままでは、ポリグルタミン酸化されない。5-MTHF-G→THF-G 反応を触媒する酵素はメチオニンシンターゼと呼ばれる酵素でメチルコバラミン（ビタミン B<sub>12</sub> の補酵素型）を補酵素として必要とする。したがって、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態では、生物系食料に由来す

る 5-CH<sub>3</sub>-THF-G を葉酸補酵素として利用できないことになる。

THF-Gn はセリンから一炭素を受け取り、5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Gn となる。5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Gn は dUMP→dTMP 反応を触媒するチミジレートシンターゼの補酵素であり、5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Gn は DHF-Gn となる。DHF-Gn は、再度、THF-Gn となり、葉酸補酵素系に入っていく、再利用される (図 3)。THF-Gn は、酵素的にプテリジン環の N5, N10 あるいは両方に 1 炭素単位（ホルミル基、メチル基、メチレン基など）を結合できる。これらの 1 炭素単位の供給源は非必須アミノ酸のセリンの C3 である。これらの 1 炭素単位は、ピリミジンの生合成に利用される。すなわち、ウラシルにメチル基が渡され、チミジンが生成する。また、プリン環の C2 と C8 の供給源として生合成に寄与する。ピリミジンの生合成は DHF-Gn（結果的に THF-Gn となった後、関与するが）から始まる。重要なことは、この補酵素は絶えず THF-Gn に再生産されるので、細胞はごく微量しか必要としないことである。

葉酸はもう一つ重要なサイクル、メチルサイクルに関与している。数十個のメチルトランスフェラーゼが哺乳動物に存在している。これらの酵素は DNA、ドーパ、ニコチンアミド、タンパク質など非常に多岐にわたる分子にメチル基を転移させる。さらに、ミエリン、リン脂質のホスファチジルエタノールアミンにメチル基を転移させ、ホスファチジコリンを生成させる反応もある。これらすべての反応のメチル基はメチオニン由来であり、ATP 依存反応により S-アデノシルメチオニン (SAM) となった後、種々の化合物にメチル基が転移される。SAM はメチル基を渡

すと S-アデノシルホモシステイン (SAH) となる。SAH は、通常速やかにホモシステインに分解される。ホモシステインは引き続き、メチオニンシンターゼ (ビタミン B<sub>12</sub> を補酵素とする酵素) により新たにメチル基を付加され、このサイクルは終結する。この新しいメチル基は葉酸補欠分子族の 5-CH<sub>3</sub>-THF-Gn から供給される。このようにして、メチル化サイクルは連続的にメチル基を使用し、連続的に一つの葉酸補酵素を通じて供給される (図 3)。

#### D. 消化・吸収

細胞内葉酸補酵素は、異なる数のグルタミン酸が結合したポリグルタミン酸鎖が結合したものである。これらの鎖の長さは生物種によって異なる。このポリグルタミン酸鎖には二つの機能がある。細胞内に保持されるための機能と、葉酸依存性酵素と 1 炭素単位をより有効に転移させるための至適条件を付与するための機能である。細胞すなわち食品は、ポリグルタミン酸鎖と 1 炭素単位を結合した種々の還元型葉酸 (主要な形は 5-CH<sub>3</sub>-THF-Gn) を含んでいる。このポリグルタミン酸は空腸の冊子縁膜に存在するコンジュガーゼによって加水分解を受け、モノグルタミン酸型となった後、特異的なトランスポーターによって、能動的に吸収されて、粘膜細胞内ではモノグルタミン酸型として存在する。コンジュガーゼは亜鉛を補欠分子族とする酵素である。この酵素活性を阻害する化合物を含む食品として、オレンジジュースとバナナが有名である (表 2)。

生物系食品の葉酸の半分以上は 5-CH<sub>3</sub>-THF 型である。残りは粘膜細胞に輸送される間、

あるいは肝臓にはじめて輸送された時にこの形に転換される。通常、血漿中の葉酸の形はこの 5-CH<sub>3</sub>-THF である。

プテロイルモノグルタミン酸を摂取すると、図 3 に示したように、一部は小腸で還元、メチル化を受け、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、プテロイルモノグルタミン酸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、細胞に取り込まれる。

#### E. 細胞への取り込み

血漿中の 5-CH<sub>3</sub>-THF-G は促進拡散あるいは受動拡散によって細胞内に入るが、ポリグルタミン酸型となるまでは保持されない。このポリグルタミン酸化反応を触媒する合成酵素はモノ及びポリグルタミン酸型の 5-MTHF を良好な基質とはしない。したがって、この血漿中の葉酸を細胞内に保持するためには、すなわちポリグルタミン酸化するためには、はじめに 5-CH<sub>3</sub>-THF-G 型を THF 型に変換しなければならない。この変換反応は、ビタミン B<sub>12</sub> 依存型メチオニンシンターゼによって触媒される (図 3)。

化学合成されたプテロイルモノグルタミン酸の栄養学上の欠点は、一定濃度を超えると、そのままの形で細胞に取り込まれ、DHF-G, THF-G となり、そしてポリグルタミン酸化されたのち THF-Gn となり、さらに 5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Gn に変換され、dUMP→dTMP 反応に利用されてしまうことである。つまり、メチオニンシンターゼ非依存的に DNA 合成に必要な dTMP を産生してしまうことである。この現象は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏患者の骨髄中



でみられる赤血球の産生低下を抑えてしまう。このような場合、より軽い症状である大赤血球性貧血が顕在化せず、より深刻な神経疾患症状が進行し、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の発見を遅らせることとなる。

## F. 異化代謝と排泄

葉酸の異化代謝は必要量を定めるための主要因子である。この異化代謝の正確な機構は未だ確立されていないが、異化代謝産物はプテリジン類と *p*-アミノ安息香酸グルタミン酸である。後者は相当するアセトアミドベンゾイルグルタメートとして排泄される。健康婦人の尿中に排泄される異化代謝産物量は1日あたり 200 ± 10 µg であり、妊婦になると 600 µg に増大するという報告もある<sup>8)</sup>。幼児の葉酸化合物類の排泄量は非常に少なく1日あたりで2~3 µg 以下である。これは、血漿中の 5-CH<sub>3</sub>-THF-G 型や他の還元型葉酸、例えば、5-ギ酸型が非常に効率よく腎臓で再吸収されていることを意味する。逆に、非還元型である F-G は循環系にみいだされても、速やかに排泄されてしまう。

## G. 欠乏

葉酸欠乏の古典的見識は、5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Gn 依存性のチミジレートシンターゼ (dUMP→dTMP) が不十分であることに起因する DNA 生合成能力の低下による細胞分裂の阻止に基因する貧血であった。しかし、従来の判定では血漿中の葉酸濃度が正常域範囲内であると判断されている軽度な葉酸欠乏状態でも、二分脊椎のような神経管障害や虚血性心疾患や卒中の危険性を高めることが明らかとなった。

古典的見解では、葉酸バランスが負になる

と、まず血漿中の葉酸レベルが低下する、次に組織中の葉酸レベル—これは容易に赤血球中の葉酸レベルでみられるが—下がる。生化学的な欠乏の証拠ははじめにわずかではあるが、確実に血漿中のホモシステイン濃度が高まる。次に、DNA サイクルが障害を受けてくると、はじめに骨髄の形態学的変化がみられる。そして非常にわずかであるが、末梢血にも同じような変化がみられてくる。これらの変化が最も顕著であるのが骨髄中の赤血球の前駆体—異常に大きな核を有する異常に大きい赤血球の前駆細胞、いわゆる巨大赤芽球—である。普通の赤血球よりも大きな赤血球が末梢血に現れた時、鉄欠乏が伴わない限り、平均赤血球容積 (MCV) が高くなる。ビタミン B<sub>9</sub> 摂取の負のバランスが続くと、結局、葉酸とビタミン B<sub>12</sub> 欠乏である古典的な大赤血球性貧血となる。

## H. プテロイルモノグルタミン酸の安全性

### 1. 化学的性質

プテロイルモノグルタミン酸分子の基本構造は、N-ヘテロ環のプテリジンと *p*-アミノ安息香酸の二つの芳香環をもつプテロイル基にグルタミン酸が結合したものである (図 1)。F-G の場合、化学合成したものは完全にプテリジン環が酸化されたものである。橙色の粉末で市販されている。においはほとんどない。

### 2. 代謝

プテロイルモノグルタミン酸を摂取すると、図 3 に示したように、一部は小腸で還元、メチル化を受け、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、プテロイルモ

ノグルタミン酸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

プテロイルモノグルタミン酸は生物系食料中の葉酸よりも2倍ほど、消化・吸収率が高い。詳細に述べると、空腹時にプテロイルモノグルタミン酸を摂取した時の消化・吸収率は生物系食料葉酸の2倍となる。食事と一緒にプテロイルモノグルタミン酸を摂取すると、消化・吸収率は1.7倍に下がる。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、空腹時にプテロイルモノグルタミン酸を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

プテロイルモノグルタミン酸の毒性に関して、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、プテロイルモノグルタミン酸を大量 (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がプテロイルモノグルタミン酸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が現れず、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> 欠乏患者に対してプテロイルモノグルタミン酸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、健常人に対しては、20 mg./日までのプテロイルモノグルタミン酸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> 欠乏患者に対するプテロイルモノグルタミン酸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プテロイルモノグルタミン酸の治療により、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、プテロイルモノグルタミン酸の投与は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏による悪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葉酸の形は5-CH<sub>3</sub>-THF-G であるとされている<sup>10)</sup>。そして、脳脊髄液に貯蔵される<sup>11)</sup>。葉酸が不足すると、脳脊髄液中の葉酸量が低下してくる<sup>12)</sup>。以下に述べるプテロイルモノグルタミン酸の神経毒作用に記載したように、プテロイルモノグルタミン酸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、カイニ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プテロイルモノグルタミン酸の神経毒作用に対して、問題にする必要はない。

**③プテロイルモノグルタミン酸と葉酸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り、食事摂取基準の葉酸必要量に関する事項ではない。

**④プテロイルモノグルタミン酸と亜鉛との相互関係.** 健常者において、プテロイルモノグルタミン酸の投与により、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、プテロイルモノグルタミン酸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 5~15 mg/日のプテロイルモノグルタミン酸の投与は亜鉛の吸収を阻害しなかった。したがって、プテロイルモノグルタミン酸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プテロイルモノグルタミン酸と腫瘍との関係.** 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、プテロイルモノグルタミン酸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>13)</sup>。しかしながら、結腸直腸のアデノーマと葉酸の摂取量とは負の相関関係が認められたこと<sup>14)</sup>、葉酸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>15)</sup>、プテロイルモノグルタミン酸の投与が喫煙家の肺の落屑性の異形成を改善した

ことから<sup>16)</sup>、Selby らの報告<sup>13)</sup> (プテロイルモノグルタミン酸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、他の論文は葉酸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。

**⑥プテロイルモノグルタミン酸の添加がマラリアにおよぼす影響.** 葉酸欠乏サルがマラリアに対して耐性を示したという報告がある<sup>17)</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。

**⑦プテロイルモノグルタミン酸の薬品アレルギー.** 5 報の論文がある<sup>18-22)</sup>。プテロイルモノグルタミン酸アレルギーのヒトにはプテロイルモノグルタミン酸の使用を禁ずるべきである。

#### 4-1. 急性毒性試験

✦ 100 mg/kg/day のプテロイルモノグルタミン酸投与により、P388 lymphocytic leukaemia マウスでは死亡するものもいた<sup>23)</sup>。

✦ US Dept. of Health and Human Services (NIOSH Cincinnati, Ohio, 1979) にはプテロイルモノグルタミン酸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) にプテロイルモノグルタミン酸 (2% NaHCO<sub>3</sub> に溶解) を腹腔内投与後 7 日間観察 (表 3)<sup>24)</sup>。系統により大きく異なっていた。C57BL/Cri が最も低い LD<sub>50</sub> であり、プテロイルモノグルタミン酸の感受性が高か

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、プテロイルモノグルタミン酸投与 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。多くのマウスはプテロイルモノグルタミン酸投与後 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

➤ プテロイルモノグルタミン酸と 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プテロイルモノグルタミン酸の方が、5-MTHF-G よりも高かった<sup>25)</sup>。

➤ プテロイルモノグルタミン酸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プテロイルモノグルタミン酸の神経障害作用が異なっていたことから、異なる機構でプテロイルモノグルタミン酸が神経毒作用を示すものと思われた<sup>26)</sup>。

➤ ひよこの網膜を使用して、プテロイルモノグルタミン酸あるいはプテロイルモノグルタミン酸+神経毒の作用を *in vitro* で調べた<sup>27)</sup>。プテロイルモノグルタミン酸は 10 mM までは影響を与えなかった。10 mM

F-G + 2  $\mu$ M 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プテロイルモノグルタミン酸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関してもプテロイルモノグルタミン酸は保護作用を示した。この中で、プテロイルモノグルタミン酸は 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プテロイルモノグルタミン酸の影響

➤ ICR 系雌マウスに妊娠 0 日から 9.5 日まで 1 日 1 回プテロイルモノグルタミン酸 (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。対照群としてプテロイルモノグルタミン酸を投与し、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 4)。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、プテロイルモノグルタミン酸+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プテロイルモノグルタミン酸の投与により、有意に低下し、プテロイルモノグルタミン酸の保護効果が認められた<sup>28)</sup>。

➤ 体重 180g の妊娠雌 Wistar 系ラットを通常プテロイルモノグルタミン酸含有食 (0.2 mg%食) あるいは高プテロイルモノグルタミン酸含有食 (4 mg%食) を 3 週間投与

した。また、非妊娠ラットを、同じく通常プテロイルモノグルタミン酸含有食 (0.2 mg%食) あるいは高プテロイルモノグルタミン酸含有食 (4 mg%食) を3週間投与した<sup>29)</sup>。妊娠期間は高プテロイルモノグルタミン酸食群でも正常であったが、高プテロイルモノグルタミン酸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、高プテロイルモノグルタミン酸食群母ラットから生まれた仔の生育を行う必要があるとも考察している。高プテロイルモノグルタミン酸食群の肝臓中の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、高プテロイルモノグルタミン酸食群の方が低い値を示し、葉酸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葉酸含量は低くなったが、高プテロイルモノグルタミン酸食群では妊娠によっても低くならなかった。

#### 4-4. プテロイルモノグルタミン酸が一炭素代謝におよぼす影響

✦ 18か月齢のWistar系ラットを通常プテロイルモノグルタミン酸含有食 (0.1 mg%食) あるいは高F-G含有食 (4mg%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>30)</sup>。その結果、高プテロイルモノグルタミ

ン酸含有食と通常プテロイルモノグルタミン酸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系ラットを通常プテロイルモノグルタミン酸含有食 (0.1 mg%食) あるいは高プテロイルモノグルタミン酸含有食 (4mg%食) を3週間投与したが、SAM/SAH比、DNAメチル化能力、あるいは葉酸代謝と関係の深いビタミンB<sub>12</sub>およびビタミン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>31)</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プテロイルモノグルタミン酸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>9)</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/日以上プテロイルモノグルタミン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、プテロイルモノグルタミン酸を投与する前に、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、ビタミン医師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。この点がプテロイルモノグルタミン酸耐容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葉酸剤との拮抗**<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葉酸拮抗体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>32)</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、プテロイルモノグルタミン酸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5~15 mg/日のプテロイルモノグルタミン酸の投与は亜鉛の吸収を阻害しなかった。したがって、「③」のプテロイルモノグルタミン酸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プテロイルモノグルタミン酸の神経毒作用としての可能性**<sup>32)</sup>。これは、プテロイルモノグルタミン酸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 5 mg に設定し、UF5 を選択し、葉酸の UL を 1 mg 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、5 mg 以上の投与量で副作用を認めたことに加えて、葉酸 1 mg までの投与量は悪性貧血患者の血液学的兆候をマスキングすることはなさそうである、と結論し、耐容上限量を 1 mg 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 1 mg 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、1 mg 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耐容上限摂取量) を 1 mg としている。

## 1. 妊婦は妊娠中期、末期は葉酸不足状態？

妊娠に伴って、大赤血球性貧血がアフリカ、南アジア、南アフリカで3~5%の頻度で起きていたことから、公衆栄養学上の問題とされてきた<sup>33)</sup>。これは、胎児の成長に伴う葉酸必要量の増大と考えられている。葉酸栄養に関することで、最も議論されていることは「妊婦末期に生じる大赤血球性貧血を予防するにはどの程度の葉酸を付加すべきか」という課題である。

### 1-1. 赤血球中の葉酸濃度を用いる葉酸栄養状態の評価

日本人の食事摂取基準-2010年版<sup>5)</sup>では、赤血球葉酸濃度を 300 nmol/L 以上に維持でき、かつ血漿総ホモシステイン値を 14 μmol/L 未満に維持できる食事性葉酸量を推定平均必要量として算定されている。参考にされた論文は 34~39 である。その結果、推定平均必要量は 200 μg/日と策定されている。これらの詳細は**参考資料 1**として添付した。

日本人妊婦の赤血球葉酸濃度を測定した論文に関しては、Mitoら<sup>40)</sup>の報告がある。彼らの報告によれば、日本人妊娠の初期の葉酸サプリメント非使用者の食事性葉酸摂取量は 300 μg/日程度 (1000 kcal エネルギー摂取量当たりでは 150 μg 程度)、赤血球注葉酸濃

度は 1200 nmol/L 程度と報告されている。赤血球葉酸濃度はカットオフ値の 300 nmol/L をはるかに超える数値であった。さらに、同じグループでの報告では<sup>41)</sup>、日本人妊婦を対象とした初期、中期、末期に分けて、赤血球中葉酸濃度を測定している。この報告によれば、妊娠期間中にわたる葉酸施主量は 280 µg/日程度で、妊娠期間による差異は認められず、一方、赤血球中葉酸濃度は、初期で 1317±824 nmol/L、中期で 909±551 nmol/L、末期で 813±475 nmol/L と妊娠の進行とともに低下していった。しかしながら、末期においてもカットオフ値である 300 nmol/L をはるかに超えていた。後に (2011 年～2012 年)、我々が他の地域で行った日本人妊婦 (自記式食事歴法による調査結果では<sup>42)</sup>、葉酸摂取量は 250 µg/日、150 µg/1000 kcal) を対象とした赤血球中葉酸濃度は、初期で 360±130 nmol/L、中期で 422±188 nmol/L、末期で 357±180 nmol/L、出産 1 ヶ月で 320±119 nmol/L であった値とかなり異なる。しかしながら、結論として、日本人妊婦は、末期においてもカットオフ値である 300 nmol/L を維持できているという事実は、彼女らが食していた食事から必要量の葉酸を摂取できていたということを意味する。その摂取量は 300 µg 程度であった。この数字は食事摂取基準で示された推定平均必要量である 400 µg/日の 3/4 であった。

## 1-2. 血漿葉酸値

血漿の葉酸値は、1 週間程度の葉酸栄養状態を示す指標として用いられている。カットオフ値としては、7 nmol/L が用いられることが一般的である<sup>43)</sup>。日本人妊婦の末期における血漿葉酸濃度を測定した Takimoto らは<sup>44)</sup>、葉酸サプリメント使用者は平均値で 26.3

nmol/L、非使用者は 14 nmol/L であったと報告している。人数は 19 名と少ないが、非使用者でもカットオフ値を超えていた。彼女らの葉酸の平均摂取量は 300 µg/日と報告されている。血漿総ホモシステイン値は 5.7 µmol/L で、この値もカットオフ値以下であった。これらの結果は、日本人妊婦では、300 µg/日の食事性葉酸を摂取していれば、妊娠末期においても葉酸栄養状態が良好に維持されていることを示唆する。Takimoto らは<sup>44)</sup>、この論文において、葉酸サプリメント使用者の出産時の乳児体重が、非使用者に対して低いことを報告している (2814 ± 318 vs 3154 ± 230 g)。ただし、生後 1 ヶ月時では両群において差異は認められなくなったことも報告している。

我々も、平成 24 年度の報告書<sup>42)</sup>に記載したように、日本人妊婦の血漿葉酸値を初期 (17.0 ± 9.6 nmol/L, n = 90)、中期 (11.6 ± 8.1 nmol/L, n = 116)、末期 (11.6 ± 8.1 nmol/L, n = 116。注：中期と全くおなじ数値になった) にわけて、検討した結果、中期および末期の血漿葉酸濃度は初期と比べて、低い値を示したが (p < 0.05)、カットオフ値である 7 nmol/L を超える値であった。つまり、日本人妊婦においては妊娠中期、末期においても、葉酸の栄養状態は良好であった。なお、この実験における対象者の葉酸摂取量 (自記式食事歴法による調査) は、150 µg/1000 kcal 程度であった。妊婦のエネルギー摂取量を 2000 kcal とすると、概ね 300 µg/日の食事性葉酸摂取量であった。言い換えれば、日本人妊婦は、中期、末期においても、日本食品標準成分表 (日本食品標準成分表-2010-。文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 報告。) から計算された葉酸摂取量、300 µg/日を摂取

していれば、血漿葉酸濃度を適正值に維持できることを意味している。この結果は、Takimoto ら<sup>44)</sup>の報告と一致した。

### I-3. 尿中葉酸排泄量を用いる葉酸栄養状態の評価

妊娠末期には葉酸代謝回転が亢進し、その結果として、葉酸異化代謝産物である *p*-Aminobenzoylglutamate と *p*-Acetoamidobenzoylglutamate の排泄量が増大するという報告<sup>45)</sup>が有り、これは、妊娠の進行に伴って、葉酸の代謝回転が高まった結果によるものであり、結果として、血漿葉酸濃度が低下したという機構が唱えられた。ところが、後の報告<sup>46)</sup>では、尿中の葉酸異化代謝産物排泄量は増加していないこと、さらに標識葉酸を用いた実験においても、妊娠中に葉酸異化代謝産物の尿中排泄量は増加していないことを報告している<sup>47)</sup>。我々が日本人女性を対象とした尿中排泄量のライフステージごとの変動を調べた横断的研究では、妊娠中期と末期において、非妊娠時と授乳期に比べて、高い排泄量を示した<sup>48)</sup>。

### J. 今後なすべき課題

外国の論文では、妊娠中期、末期には妊婦の血漿および赤血球中葉酸濃度がカットオフ値以下になるため、妊婦に対する葉酸付加を推奨しているが、日本人妊婦を対象とした実験結果だけをみると、妊娠の進行に伴って、血液中の葉酸濃度は低下するが、カットオフ値以上は維持できていた。彼女らの葉酸摂取量は 250~300 µg/日であった。したがって、日本人妊婦の付加量は、前期は不要、中期と末期で 50 µg が妥当であると思われた。このように他国と比べて、低い葉酸摂取量で血液

中葉酸濃度が維持できたのは、日本食品成分表<sup>49)</sup>の葉酸の定量方法に起因するのかもしれない。日本の食品成分表では、食品からの葉酸の抽出をプロテアーゼとコンジュガーゼの二つの酵素で処理する方法をとっている。最も新しい食品中の葉酸の抽出方法としては、アミラーゼ、プロテアーゼ、コンジュガーゼの三つの酵素を使用して抽出する方法が推奨されている。

食品中には様々な葉酸型が存在し、葉酸型によって生体利用率が異なる。サプリメントに使用されている葉酸化合物は合成されたプテロイルモノグルタミン酸であり、これは主要な食事性葉酸である 5-メチルテトラヒドロ葉酸のポリグルタミン酸型や、その他のポリグルタミン酸型葉酸誘導体と異なる。プテロイルモノグルタミン酸の生体利用率は、食事性葉酸よりもはるかに高い。さらに、5-メチルテトラヒドロ葉酸のモノグルタミン酸型はプテロイルモノグルタミン酸よりも葉酸栄養状態改善に効果的である。Konings らは<sup>50)</sup>、めし 100 g 中の葉酸含有量は 22 µg であり、そのほとんどが 5-メチルテトラヒドロ葉酸であると報告している。これに対して、日本食品標準成分表 (2010)<sup>49)</sup>におけるめし (食品番号: 01088) 100 g 中の葉酸含有量 3 µg である。日本食品標準成分表 (2010)<sup>49)</sup>では、食品をプロテアーゼおよびコンジュガーゼによる二酵素法により処理し、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 を用いた微生物学的定量法により葉酸濃度を測定している。一方 Konings らは<sup>50)</sup>、食品をアミラーゼ、プロテアーゼおよびコンジュガーゼによる三酵素法により処理し、HPLC 法を用いて葉酸濃度を測定している。

日本人妊婦のめしの平均摂取量は 400 g/日



であるため、めし 100 g 中の葉酸含有量を 22  $\mu\text{g}$  とすると、めしからの葉酸摂取量は 12  $\mu\text{g}$ /日から 88  $\mu\text{g}$ /日に増加する。これにより、平均葉酸摂取量は 250  $\mu\text{g}$ /日から 320  $\mu\text{g}$ /日に増加するが、妊婦の EAR である 400  $\mu\text{g}$ /日にはまだおよばない。日本人女性が葉酸栄養状態を良好に保つことができる他の理由が存在するはずである。

Tamura らは<sup>51,52)</sup>、二酵素法ではなく三酵素法を使用し、食品中の葉酸含有量を再評価する必要があることを示唆している。また Tamura らは、モノグルタミン酸型の葉酸化合物の生体利用率は、プテロイルモノグルタミン酸を 100%とすると 70% ~120%のものがあることを報告している。日本の食事によく利用される食品中には日本食品標準成分表 (2010) の記載よりも葉酸含有量が多いものが存在しているか、調理方法により生体利用率が高い葉酸型に変換されていることが考えられる。日本における生および調理後の食品中の葉酸を、三酵素法および新たな高速液体クロマトグラフ分析方法を用いて明らかにする必要がある。この食品中の葉酸の分析方法の改良が、葉酸必要量に関する終止符となる可能性が高い。

## K. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Shibata K, Shimizu A, Fukuwatari T. Vitamin B<sub>1</sub> deficiency does not affect the liver concentrations of the other seven kinds of B-group vitamins in rats. *Nutrition Insights*. in press.
- 2) Shibata K, Fukuwatari T, Sasaki S, Sano M, Suzuki K, Hiratsuka C, Aoki A, Nagai C. Urinary excretion levels of water-soluble vitamins in pregnant and lactating women in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol*. in press.
- 3) Shibata K, Fukuwatari T, Imai E, Hayakawa T, Watanabe F, Takimoto H, Watanabe T, Umegaki K. Dietary Reference Intakes for Japanese 2010: water-soluble vitamins. *J Nutr Sci Vitaminol* (2013) **59**, suppl S67-S82.
- 4) Shibata K, Imai E, Sano M, Fukuwatari T. The urinary excretory ratio of nicotinamide catabolites was associated with the conversion ratio of tryptophan to nicotinamide in growing rats fed a niacin-free 20% casein diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. (2012) **76**,186-188.
- 5) Yoshida M, Fukuwatari T, Sakai J, Tsuji T, Shibata K. Correlation between Mineral Intake and Urinary Excretion in Free-living Japanese Young Women. *Food Nutr Sci* (2012) **3**,123-128.
- 6) Moriya A, Fukuwatari T, Sano M, Shibata K. Different variations of tissue B-group vitamin concentrations in short- and long-term starved rats. *Br J Nutr* (2012) **107**, 52-60.
- 7) Imai E, Tsuji T, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K. Association between 24 h urinary alpha-tocopherol catabolite, 2,5,7,8-tetramethyl-2 (2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (alpha-CEHC) and alpha-tocopherol intake in intervention and cross-sectional studies. *Asia Pac J Clin Nutr* (2011) **20**, 507-513.
- 8) Endo M, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K. Vitamin contents in rat milk and effects of dietary vitamin intakes of dams on the

vitamin contents in their milk. *J Nutr Sci Vitaminol* (2011) **57**, 203-208.

- 9) Shibata K, Yasui M, Sano M, Fukuwatari T. Fluorometric determination of 2-oxoadipic acid, a common metabolite of tryptophan and lysine, by high-performance liquid chromatography with pre-chemical derivatization. *Biosci Biotechnol Biochem* (2011) **75**,185-187.
- 10) Tsuji T, Fukuwatari T, Sasaki S, Shibata K. Twenty-four-hour urinary water-soluble vitamin levels correlate with their intakes in free-living Japanese school children. *Public Health Nutr* (2011) **14**, 327-333.
- 11) 今井絵理, 佐野光枝, 福渡努, 柴田克己. ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットのトリプトファンニコチンアミド代謝-摂取ビタミン量との関係. *日本栄養・食糧学会誌* (2011) **64**, 313-321.
- 12) 柴田克己, 坂崎愛, 佐野光枝, 福渡努. ビタミン B<sub>1</sub> 最小必要量飼料投与ラットあるいは十分量飼料投与ラットを寒冷曝露させた時の肝臓, 血液および尿中のビタミン B<sub>1</sub> 量. *日本栄養・食糧学会誌* (2011) **64**, 329-334.
- 13) 柴田克己, 福渡努, 吉田宗弘. 特集「栄養アセスメント-基礎から臨床へ-」4. 生化学検査 (3) ビタミンと微量ミネラル. *評価と治療* (2011) **28**, 143-147.
- 14) 柴田克己, 河田哲典, 石田香織, 清水篤史, 守谷彩, 寺方美希, 佐野光枝, 福渡努. ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットの種々の臓器, 血清, 尿中の B 群ビタミン含量. *ビタミン* (2011) **85**, 18-22.

## 2. 学会発表

なし

## L. 知的財産権の出願・登録状況・特許取得

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## M. 引用文献

1. Wills L. The nature of the haemopoietic factor in Marmite. *Lancet* (1933). **1**, 1283-1285.
2. Wills L, Clutterbuck PW, Evans BDF. A new factor in the production and cure of certain macrocytic anaemias. *Lancet* (1937) **1**, 311-314.
3. Wald N. MRC Vitamin Study Research Group Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* (1991) **38**, 131-137.
4. Scott JM, Weir DG. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* (1991) **89**, 61-563.
5. 日本人の食事摂取基準 (2010 年版), 「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書, 平成 21 年 5 月, 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室.
6. Okubo H, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Murakami K, Hirota Y, Osaka Maternal and Child Health Study Group. Nutritional adequacy of three dietary patterns defined by cluster analysis in 997 pregnant Japanese women: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Public Health Nutr* (2011) **14**, 611-621.
7. <http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h122>

- 8-1\_18.html (平成 25 年 2 月 26 日アクセス).
8. McPartlin J, Hallongan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet* (1993) **341**, 148-149.
  9. Dickinson CJ. Does folic acid harm people with vitamin B<sub>12</sub> deficiency? *Q J Med* (1995) **88**, 357-364
  10. Spector R, Lorenzo AV. Folate transport in the central nervous system. *Am J Physiol* (1975) **229**, 777-782.
  11. 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.
  12. Reynolds EH, Gallagher BB, Mattson RH, Bowers M, Johnson AL. Relationship between serum and cerebrospinal fluid folate. *Nature* (1972) **240**, 155-157.
  13. Selby JV, Friedman GD, Fireman BH. Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up. *Cancer Res* (1989) **49**, 5736-5747.
  14. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* (1993) **85**, 875-884.
  15. Butterworth CE Jr, Hatch KD, Macaluso M, Cole P, Sauberlich HE, Soong SJ, Borst M, Baker VV. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA* (1992) **267**:528-533.
  16. Heimbürger DC, Alexander CB, Birch R, Butterworth CE, Balley WC, Krumdieck CL. Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B<sub>12</sub>. *JAMA* (1988) **259**, 1525-1530.
  17. Herbert V. Folate deficiency to protect against malaria. *N Engl J Med* (1993) **328**, 1127.
  18. Sesin GP, Krischenbaum H. Folic acid hypersensitivity and fever: a case report. *Am J Hosp Pharm* (1979) **36**, 1565-1567.
  19. Sparling R, Abela M. Hypersensitivity to folic acid therapy. *Clin Lab Haematol* (1985) **7**, 184-185.
  20. Gotz VP, Lauper RD. Folic acid hypersensitivity for tartazine allergy? *Am J Hosp Pharm* (1980) **37**:1470-1474.
  21. Woodliff HJ, Davis RE. Allergy to folic acid. *Me J Aust* (1966) **1**, 351-352.
  22. Mathur BP. Sensitivity of folic acid: a case report. *Indian Med Sci* (1966) **20**, 133-134.
  23. Parchure M, Ambaye RY, Gokhale SV. Combination of anticancer agents with folic acid in the treatment of murine leukaemia P388. *Chemotherapy* (1984) **30**, 19-24.
  24. Parchure M, Ambaye RY, Lalitha VS, Gokhale SV. Acute toxicity of folic acid in mice. *Experientia* (1985) **41**, 72-73.
  25. Olney JW, Fuller TA, de Gubareff T. Kainate-like neurotoxicity of folates. *Nature* (1981) **292**, 165-167.
  26. Tremblay E, Cavalheiro E, Ben-Ari Y. Are convulsant and toxic properties of folates of the kainite type? *Eur J Pharmacol* (1983) **93**, 283-286.
  27. Sattayasai J, Ehrlich D. Folic acid protects chick retinal neurons against the neurotoxic

- action of excitatory amino acids. *Exp Eye Res* (1987) **44**, 523-535.
28. 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.
  29. Achon M, Alonso-Aperte E, Reyes L, Ubeda L, Varela-Moreiras G. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br J Nutr* (2000) **83**, 177-183.
  30. Achon M, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. High dietary folate supplementation: Effects on diet utilization and methionine metabolism in aged rats. *J Nutr Health Aging* (2002) **6**, 51-54.
  31. Achón M, Alonso-Aperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G. upranormal dietary folic acid supplementation: effects on methionine metabolism in weanling rats. *Br J Nutr* (2007) **98**, 490-496.
  32. Campbell NRC. How safe are folic acid supplements? *Arch Intern Med* (1996) **156**, 1638-1644.
  33. Rothman D. Folic acid in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* (1970) **108** 149-175.
  34. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH et al. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* (1987) **46**, 1016-1022.
  35. Milne DB, Johnson LK, Mahalko JR, Sandstead HH. Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutrition. *Am J Clin Nutr* (1983) **37**:768-773.
  36. O'Keefe CA, Bailey LB, Thomas EA et al. Controlled dietary folate affects folate status in nonpregnant women. *J Nutr* (1995) **125**, 2717-2725.
  37. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* (1996) **347**:657-659.
  38. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, Steegers-Theunissen RP. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* (1999) **129**, 1135-1139.
  39. Venn BJ, Green TJ, Moser R, Mann JI. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr* (2003) **77**, 658-662.
  40. Mito N, Takimoto H, Umegaki K, Ishiwaki A, Kusama K, Fukuoka H, Phta S, Abe S, Yamawaki M, Ishida H, Yoshiike N. Folate intakes and folate biomarker profiles of pregnant Japanese women in the first trimester. *Eur J Clin Nutr* (2007) **61**, 83-90.
  41. Takimoto H, Mito N, Umegaki K, Ishikawa A, Kusama K, Abe S, Yamawaki M, Fukuoka H, Ohta C, Yoshiike N. Relationship between dietary folate intakes, maternal plasma total homocysteine and B-vitamins during pregnancy and fetal growth in Japan. *Eur J Nutr* (2007) **46**, 300-306.