

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00865

研究課題名(和文) 葉酸強化食品摂取による遺伝子多型別血中葉酸動態と食生活への影響

研究課題名(英文) Effects of folic acid fortified foods on blood folate status in genetic polymorphism and eating habits

研究代表者

福島 真実 (Fukushima, Mami)

淑徳大学・看護栄養学部・准教授

研究者番号：30286885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子多型に基づいたテーラーメイド栄養指導「さかど葉酸プロジェクト」において、葉酸強化食品による葉酸摂取量は $195\mu\text{g DFE}$ (食事性葉酸当量)程度で、食事からの摂取量を合わせてホモシステインを基準範囲に保つために十分量であることが示された。葉酸の他にビタミンB2がホモシステイン値低下に、飽和脂肪酸が上昇に影響することが示唆された。介入前後6ヵ月間では、赤血球葉酸濃度はいずれの多型においても有意差は認められなかった。強化食品の使用頻度は葉酸強化米が高く、食事がおろそかになる傾向はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

穀類への葉酸強化政策は、すでに世界80か国以上で実施されており、胎児の神経管閉鎖障害(NTDs)発症率の低下や、脳卒中による死亡率の低下、ある種のがんや認知症予防に対して効果をあげている。しかし我が国では葉酸強化は実施されておらず、葉酸推奨量は $240\mu\text{g/日}$ と欧米諸国の $400\mu\text{g}$ より低い。本研究では、葉酸栄養状態を良好に保つための葉酸摂取を $400\mu\text{g}$ とした栄養介入において、葉酸強化食品から葉酸約 $200\mu\text{g}$ 補充できることを示した。食事からの摂取量とあわせて目標に達する量であり、耐容上限量を超えることもない。今後の葉酸強化食品の普及に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The folate intake from fortified foods was about $195\mu\text{g/day DFE}$ (dietary folate equivalents) in the health promotion program designated the "Sakado Folate Project", which aimed to achieve personalized nutritional intervention based on the MTHFR C677T genotype for the prevention of various diseases, and which was shown to be sufficient to keep the reference value of serum total homocysteine. Vitamin B2 was also suggested to be a factor that decreases homocysteine, meanwhile saturated fatty acid might be a factor to increase the homocysteine level. There were no significant increases in red blood cell folate levels at 6 months after the onset of this intervention in all MTHFR C677T genotypes. The fortified rice was used more frequency for fortified food. A tendency that meal is neglected was not observed.

研究分野：テーラーメイド栄養学 応用栄養学

キーワード：葉酸 テーラーメイド栄養 ホモシステイン 葉酸強化食品 遺伝子多型 赤血球葉酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎児の神経管閉鎖障害 (NTDs) の発症と葉酸摂取不足の関連が明らかにされて以降、葉酸投与が NTDs 発症率の減少に効果的であることが報告されてきた。1998 年、アメリカ、カナダは穀類への葉酸を強制的に添加する政策を実施し、NTDs の発症率の低下のみならず、脳卒中による死亡率の劇的な低下やある種のガンや認知症予防にも効果をあげている。この穀類への葉酸強化政策をとる国は年々増加し、2015 年 8 月においては世界 78 カ国で実施されている。一方で、葉酸過剰摂取によって体内で代謝されない葉酸 (葉酸未代謝物) が血中で検出されるようになり、その生理作用の究明が課題となっている。添加される葉酸はピテロイルモノグルタミン酸であり、天然に存在する形と異なっているため、吸収後、還元され数段階の代謝を経て活性型となる。このとき作用する還元酵素の活性能力を超えた過剰分が葉酸未代謝物である。

我が国での強制的な葉酸強化は行われていないが、NTDs の発症率は 6.8 人 (対 1 万人あたり) で先進国の中では決して低くはない。2000 年に、当時の厚生省から妊娠可能年齢にある女性に対しての葉酸摂取を推奨する勧告がなされ、翌年から国民栄養調査に葉酸が調査項目として加えられた。その結果から日本人女性の葉酸摂取量の年次推移をみると、年々減少しており、2013 年には 15~49 歳女性において葉酸の推奨量 240 μ g を下回っている。

葉酸摂取不足は、NTDs の発症だけでなく他の疾病の発症とも関連が深い。すなわち、十分な葉酸摂取を必要とする対象は、妊娠可能な女性に限られるのではなく、中高年男女とも対象である。葉酸摂取不足が続くと血中ホモシステイン (Hcy) の上昇を招き、動脈硬化症や冠動脈疾患、脳梗塞などの危険因子となる。血中 Hcy 値が 15 μ mol/L 以上では、5 年後の認知症発症頻度が 25% である。認知症高齢者において葉酸摂取量が推奨量を超えて十分摂取していても、対照群に比べて血清葉酸濃度は極めて低く、血清 Hcy 濃度は高いことが示されている。また認知症患者の約 40~50% でうつ症状がみられると推定されており、うつ症状のある男性では、葉酸摂取量および血清葉酸濃度との関連も報告されている。うつ症状は現代の労働保健上の最も頻度の高い病態であり自死は年間 3 万人を超えて我が国の重大な課題となっている。

葉酸の代謝関連遺伝子の多型と疾病に関しては数多く研究されており、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) C677T 遺伝子多型は、葉酸栄養状態を左右する重要な多型である。CC 型に比べて CT 型では約 35%、TT 型では 70% 酵素活性が低下する。その結果、5-メチルテトラヒドロ葉酸の生成量が減少し、Hcy からメチオニンへの経路が阻害されて血中 Hcy 濃度が上昇する。日本人の 15% が TT 型である。

これまでに我々は、健常者、認知症高齢者、妊婦などを対象にビタミン摂取状況と血中濃度および代謝関連遺伝子多型を解析して、TT 型では葉酸を推奨量 (240 μ g) 以上摂取していても、血中葉酸値は低く、血中 Hcy 値は高いことを明らかにし、こうした遺伝子間の格差は葉酸 400 μ g 補給で解消されることを示した。さらに、地域住民を対象に遺伝子多型に基づいたテーラーメイド栄養指導 (「さかど葉酸プロジェクト」、女子栄養大学・埼玉県坂戸市協働事業、主任研究者；香川靖雄教授 (女子栄養大学)、申請者は共同研究者、2006~現在に至る) を実践し、血清 Hcy 値の抑制に効果をあげてきた。実践の場である講習会では、生活習慣病や認知症予防を目的として、野菜の摂取促進や食生活の改善を図ることによる葉酸摂取量の増加を基本方針とし、遺伝子型告知とともに栄養指導した結果、半年後にはいずれの多型においても同様に血清葉酸濃度は有意に増加し、Hcy 濃度は有意に減少したが、特に TT 型での変化量が大きく遺伝子告知効果がみられた。さらに受講後の追跡調査によって TT 型では介入効果の長期維持の可能性が示された。

しかし、食品からの葉酸摂取量や野菜摂取量の増加は、必ずしも有意ではなく、葉酸強化食品、とくに米に葉酸を強化した葉酸米の使用が半数以上の対象者にみられた。これは通常の食事における葉酸摂取量の増加を実践することの困難さを示した結果と考えられる。またサプリメントではなく、主食として頻度の高い米の利用が多いことは注目すべき点である。

前述のとおり我が国での葉酸強化政策は実施されておらず、その是非について賛否両論がかかわられている。実験的デザインによる葉酸負荷試験は実施されているが、葉酸強化食品の自由摂取による葉酸未代謝物の血中動態は明らかにされておらず、葉酸介入における課題として検証の必要性が高い。

2. 研究の目的

葉酸代謝関連遺伝子多型別テーラーメイド栄養指導において、リスク遺伝子型の TT 型対象者には、葉酸を推奨量の 240 μ g を超える 400 μ g 摂取するよう勧めた結果、栄養指標の改善は顕著であったが、その際、対象者の半数に葉酸強化食品の使用がみられた。穀類への葉酸強化政策は、日本を除く世界 80 カ国以上で実施されており、近年葉酸過剰摂取と体内での葉酸未代謝物の生理作用との関連が注目されている。そこで、(1) 血中の葉酸未代謝物濃度を測定し、葉酸強化食品の日常的な摂取と血中葉酸動態の関連を遺伝子多型別に検討し、(2) 葉酸強化食品の利用が食品選択などの食習慣へ及ぼす影響を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

「さかど葉酸プロジェクト」(女子栄養大学と坂戸市と協同で実施) における「食と認知症予防講習会 / 食と健康のプランニングセミナー」2007~2018 年度の参加者を対象とし、食事調査と栄養指導前後の血液データがそろった者を抽出して解析に供した。男性 130 名、女性 659 名

で年齢は 63.7±9.2 歳であった。セミナーの内容は表 1 に示したとおりで、例年 7 月頃から開始され 2 回の採血、食事調査、個別栄養アドバイス（栄養指導）は必ず実施した。

採血は午前中空腹時とし、同日に食事調査を行い、その結果に基づき栄養指導を行った。血液生化学検査は血清葉酸、総ホモシステイン（Hcy）、ビタミン B₁₂、その他一般生化学・血液学検査 28 項目とした。検査は Hcy を酵素法によるアルフレッサファーマ、（2018 年以降 SRL に依頼、HPLC 法）その他の項目は SRL に依頼した。食事調査は自記式食事歴法質問票（DHQ）を使用した。葉酸強化食品の摂取状況は、食習慣アンケートと聞き取りによる確認をして把握した。葉酸強化食品からの葉酸摂取量は、摂取頻度と摂取量から試算した。

赤血球葉酸測定は、一部の試料（2014 年～2018 年度）にて行った。*Lactobacillus rhamnosus* による微生物法での測定には、ID-Vit Folic Acid MTP Kit（IMD）を使用した。葉酸分子種の分別定量を目的とし、電気化学的検出 ECD-HPLC 法の条件検討を実施したが、標準物質の確認にとどまった。

遺伝子多型の解析は、全血から抽出した DNA を用いて、PCR-RFLP 法または TaqMan PCR 法で行った。対象とした多型はメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）の C677T 多型である。

表 1 食と健康のプランニングセミナー スケジュール

回	内容	日程
1	講話：体質を知って生活習慣病予防と認知症予防	7 月
2	採血、食事調査票の確認	7 月
3	血液検査結果返却、栄養士による個別アドバイス	9 月
4	運動教室	10～11 月
5	食事教室	10～11 月
6	採血、食事調査票の確認	12 月
7	血液検査結果返却、栄養士による個別アドバイス	2 月

得られたデータは、正規分布に従わない場合が多いためノンパラメトリック法により解析した。血液検査値、栄養摂取量は中央値（範囲）で示し、多型間の比較は Kruskal-Wallis 検定を用いた。栄養指導前後の比較は Wilcoxon 検定、血清葉酸値と Hcy 値の変動要因は重回帰分析を行った。いずれも有意水準は $p < 0.05$ とした。これらの統計処理 SPSS ver.22（IBM）および StatFlex ver.6（アーテック）を使用した。

4. 研究成果

血清葉酸値は食事の影響を反映する短期的な指標とされており、それに対して中長期的な指標とされるのが赤血球中の葉酸値である。血清葉酸濃度、および Hcy 濃度は解析対象者全体（ $n=798$ ）において、栄養指導前後比較で有意な改善が示された（図 1）。また多型間の差も解消された。しかし、習慣的な食生活改善の効果、例えば葉酸摂取量増加の継続性は、赤血球葉酸値の変化を検討することが重要である。検体試料の得られた一部の対象者の赤血球中の総葉酸濃度（ $n=189$ ）は栄養指導前 337（79～1175）ng/mL、指導後 324（48～1016）ng/mL と有意差がみられなかった。さらにサプリメント、葉酸強化食品を使用していない群（ $n=30$ ）において、血清葉酸、赤血球葉酸いずれも指導前後の値に有意差葉認められなかったが、血清 Hcy 値は $8.7 \rightarrow 7.6 \mu\text{mol/L}$ （ $p < 0.002$ ）と改善された。採血の間隔は 5 ヶ月程度であるが、栄養指導後、次の採血までは 4 ヶ月程度であり、ホモシステインの代謝速度と葉酸の代謝速度に差があることが考えられた。サプリメント、強化食品を使用していない群（全体のうち $n=155$ ）で Hcy 値に影響する変動要因を検討したところ、葉酸、ビタミン B₂ 摂取量が多いほうが低下し、飽和脂肪酸により上昇することが示唆された。したがって、葉酸以外の栄養素に注目した解析をさらに進めることが重要である。

葉酸代謝関連酵素の遺伝子多型、特に MTHFR C677T 多型の影響は、赤血球中の葉酸分子種の分布に影響する。本研究では、分別定量により分子種の分布とともにサプリメント等の葉酸で通常生体内に存在しない folic acid、すなわち葉酸未代謝物の存在を検討する計画であったが、ECD-HPLC 法の試料調製が進まなかった。現在は LCMS-MS 法による定量が主流となってきたため、今後は LCMS-MS 法の活用を考える必要がある。

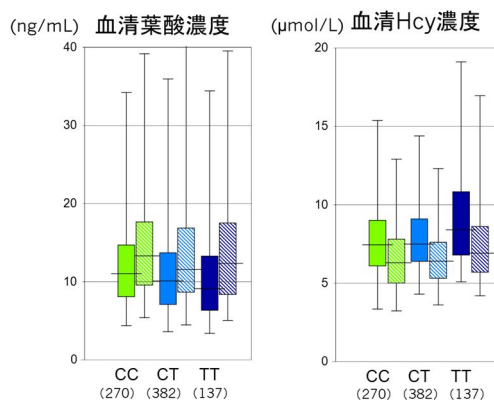


図 1 遺伝子多型別栄養指導による血清葉酸値とホモシステイン値の改善

葉酸強化食品は年々認知度と使用頻度が高まっており、全体では栄養指導前から使用は19.8%であり、指導後には46.0%と増加した。葉酸強化食品の使用頻度は葉酸強化米が最も多く、これは諸外国で実施されている穀類への葉酸強化が効果をあげていることと一致する。葉酸強化米では、飯1杯(150g)で約100 μ gの葉酸補給が可能である。その他の葉酸強化食品も含めた平均葉酸補給量は195 μ gDFE(食事性葉酸当量)と見積もられた。サプリメント使用では耐容上限量を超えるリスクもあるが、葉酸強化食品では過剰摂取のリスクはきわめて少ない。また消化食品を使用することによる食事量の減少や献立の貧弱化はみられなかった。本研究の栄養介入において、ホモシステイン値の上昇を抑え、食生活の改善を進めるうえで葉酸強化食品の使用は有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kagawa Yasuo, Hiraoka Mami, Kageyama Mitsuyo, Kontai Yoshiko, Yurimoto Mayumi, Nishijima Chiharu, Sakamoto Kaori	4. 巻 57
2. 論文標題 Medical cost savings in Sakado City and worldwide achieved by preventing disease by folic acid fortification	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 157 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Mami, Kagawa Yasuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and folate status	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 142 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平岡真実, 坂本香織, 金胎芳子, 影山光代, 百合本真弓, 西島千陽, 香川靖雄
2. 発表標題 遺伝子多型別テラーメイド栄養指導による血中葉酸およびホモシステイン濃度改善に及ぼす食品摂取状況の検討
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西島千陽, 坂本香織, 平岡真実, 影山光代, 金胎芳子, 百合本真弓, 堀江修一, 香川靖雄
2. 発表標題 さかど葉酸プロジェクトにおけるMTHFR遺伝子 C677T 多型別テラーメイド栄養指導と葉酸強化食品の使用
3. 学会等名 第71回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chiharu Nishijima, Mami Hiraoka, Kaori Sakamoto, Mitsuyo Kageyama, Yoshiko Kontai, Mayumi Yurimoto and Yasuo Kagawa
2. 発表標題 Reduction of homocysteine in persons with genetic polymorphism using folic acid fortified rice
3. 学会等名 49th Conference of the Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岡真実
2. 発表標題 遺伝子多型に基づく栄養指導とその実践
3. 学会等名 第39回日本臨床栄養学会総会・第38回日本臨床栄養協会総会 第15回大連合大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岡真実
2. 発表標題 遺伝子多型と葉酸の栄養
3. 学会等名 第56回日本先天異常学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mami Hiraoka, Kaori Sakamoto, Mitsuyo Kageyama, Yoshiko Kontai, Mayumi Yurimoto, Chiharu Nishijima and Yasuo Kagawa
2. 発表標題 The effects of personalized nutrition intervention in folate status with MTHFR C677T genotype notification
3. 学会等名 The 48th Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mayumi Yurimoto, Mami Hiraoka, Mitsuyo Kageyama, Yoshiko Kontai, Chiharu Nishijima, Kaori Sakamoto and Yasuo Kagawa	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 -
3. 書名 Nutritional Guidance in Sakado Folate Project, B Group Vitamins - Current Uses and Perspectives	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	香川 靖雄 (Kagawa Yasuo)		
研究協力者	坂本 香織 (Sakamoto Kaori)		
研究協力者	西島 千陽 (Nishijima Chiharu)		
研究協力者	金胎 芳子 (Kontai Yoshiko)		
研究協力者	影山 光代 (Kageyama Mitsuyo)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	百合本 真弓 (Yurimoto Mayumi)		