

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18700611  
 研究課題名 (和文) 日本人のモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の摂取比率検討  
 研究課題名 (英文) Study on the ratio of dietary monoglutamate and polyglutamate folate in Japaneses  
 研究代表者  
 福島 真実 (FUKUSHIMA MAMI)  
 女子栄養大学・栄養学部・助教  
 研究者番号：30256885

研究成果の概要：食品中の葉酸は、結合しているグルタミン酸が1つのモノグルタミン酸型と数個結合したポリグルタミン酸型があり、吸収過程が異なっているため、それぞれ Bioavailability (生体利用率) が異なる。葉酸供給源となる主な食品17品と通常の献立5種類中の両者を微生物法にて分別定量した。その数値を基に、健康な女子大学生および高齢者施設入居者の食事調査からモノとポリグルタミン酸型葉酸の摂取比率を求めたところ、平均してそれぞれ17%と83%であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：葉酸，モノグルタミン酸型葉酸，ポリグルタミン酸型葉酸，bioavailability，葉酸摂取量，HPLC

## 1. 研究開始当初の背景

葉酸の摂取不足は血中ホモシステイン (tHcy) の上昇を招き、冠動脈疾患や脳梗塞などの危険因子となるが、認知症、胎児の神経管閉鎖障害 (NTDs) の発症とも関連している。また葉酸の代謝には多くの酵素や輸送体が関与しておりそれらの遺伝子多型と tHcy の関わりも注目されている。葉酸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いる。

国際的には NTDs だけではなく、がんや心血管疾患、アルツハイマー病などの一次予防を目的とした RDA が必要との考えから諸外国の葉酸推奨量は 400 $\mu$ g が主流である。更にアメリカをはじめとする世界 52 カ国では葉酸の小麦粉強化を義務づけており、NTDs 発症率低下のほか、脳卒中死亡率を劇的に減少させ (Circulation 113, 1335-1343, 2006)、さらに認知症を予防することも多くの研究で報告されている (Am J Clin Nutr 82, 627-635,

2005)。しかし、日本人の食事摂取基準 [2005年度版] の推奨量は 240 $\mu$ g/日とされており、葉酸強化も実施されていない。

サプリメントや製剤である葉酸はプテロイルモノグルタミン酸であるが、天然の食品中葉酸の大半はポリグルタミン酸型として存在しているため、その消化・吸収過程において生体利用率が異なる。従来の日本人の食習慣におけるの食事中葉酸の生体利用率は50%程度とされているが、近年の食習慣の変遷を鑑みて再検討の余地がある。また、我が国の食品成分表にはモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸値の記載はない。上述の疾病予防の観点から、食事中の葉酸を効果的に摂る栄養指導が必要である。そのためには、食品中の bioavailability を考慮せねばならないが、モノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の比率を明確にすることが第一段階として重要である。これまでにポリグルタミン酸型とモノグルタミン酸型葉酸の比率が血漿葉酸レベルに与える影響を検討した報告は数報のみである (J Nutr 132, 1307-1312, 2003)。

## 2. 研究の目的

本研究では、食品中のモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の存在比を測定し、日本人におけるこれらの摂取比率を検討することを目的とした。

食品中葉酸の測定法は微生物法が主流であるが、試料の前処理で大きく値が異なる。我が国では食品中葉酸値は 2000 年発表の 5 訂食品成分表に初めて記載されたが、その測定法における前処理は現在の Standard method とは若干異なる。また、微生物法ではモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の完全な分別定量は容易ではないため、化学的測定法の導入が不可欠である。そこで、HPLC 法によるモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の分別定量を検討し、さらにこの数値を用いて食事調査からこれらの摂取比率を算出し、葉酸栄養状態への影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 微生物法によるモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の分別定量

食品試料は日本人の主な葉酸供給源となる食品と、食生活データ総合年報 2006 年版の報告に基づいた日本人の主な消費食品を中心に、17 食品を選択した。いずれも大学近隣のスーパーマーケットで市販されているもので、1 食品につき産地、メーカーの異なる 3 種類を購入した。また、女子栄養大学栄養クリニックのヘルシーダイエットコースで提供された献立から 5 種類選択し、日常的な食事の例として測定に供した。

葉酸の定量は、葉酸要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus casei* ATCC 7469) を用いた微生物学的定量法に従い、マイクロプレートを使用した比濁法で測定した。*L. casei* は、モノグルタミン酸型葉酸からトリグルタミン酸型葉酸までに生育活性を持つため、総葉酸含量の測定には適しているが、正確なモノグルタミン酸型葉酸の割合を測定することは難しいが、一部の食品ではほとんどジ、ヤトリグルタミン酸型葉酸は存在しないとする報告もある。そこで HPLC 法に先立つ基礎データを得るため、微生物学的定量法を用いた。試料の前処理は trienzyme 法、すなわち、プロテアーゼ、アミラーゼおよびコンジュガーゼ処理を行い、総葉酸測定用とした。酵素処理を行わない試料を便宜上遊離葉酸 (モノグルタミン酸型葉酸からトリグルタミン酸型葉酸) とした。

### (2) モノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の摂取比率と葉酸栄養状態への影響

健康な若年女性 101 名 (21 $\pm$ 1.6 歳) のおよび特別養護老人ホーム入所者の認知症高齢者 44 名 (87 $\pm$ 4.5 歳、女性 85%) を対象とした。3 日間連続の秤量記録法による食事調査から葉酸摂取量を日本食品標準成分表を用いて計算した。さらに主な葉酸供給源となる食品中の遊離葉酸とポリグルタミン酸型葉酸の比率を使用し、遊離葉酸比率を求めた。測定していない食品については、同じ食品群の平均値で読替えした。食事調査終了翌朝に空腹時採血した血清中葉酸濃度は化学発光-競合的結合測定法 (バイエルメディカル) で測定した。

### (3) HPLC 法によるモノグルタミン酸型とポリグルタミン酸型葉酸の分別定量検討

葉酸には多くの誘導体が存在するため、グルタミン酸鎖の分別に目的を絞り、パラアミノベンゾイルグルタミン酸 (PABGlu<sub>n</sub>) に分解し HPLC 法での分別条件を検討した。標準品の PABGlu<sub>1</sub>~PABGlu<sub>7</sub> は Schircks Lab. (Jona, Switzerland) から購入した。HPLC 条件は、次のとおりである。Column: TSK-gel ODS80TsQ (4.6mm $\times$ 250mm)、移動相: 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5%CH<sub>3</sub>CN、pH2.5、流速1.0ml/分、検出: UV272nm。

葉酸標準品 (プテロイルグルタミン酸 1-プテロイルグルタミン酸 8 ; PteGlu<sub>1</sub>~PteGlu<sub>8</sub>、10-ホルミル葉酸 ; 10-CHO-F、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 ; 5-CHO-THF、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 ; 5,10-CH<sub>2</sub>-THF、5,10-メチルテトラヒドロ葉酸 ; 5,10-CH-THF、5-メチルテトラヒドロ葉酸 ; 5-CH<sub>3</sub>-THF、テトラヒドロ葉酸 ; THF) を PABGlu<sub>n</sub> に還元分解する方法は次のとおりである。まずこれらの標準液を 5M HCl にて pH 1 にし 4 $^{\circ}$ C、

1 晩静置後、5M NaOH を加えて pH6 に調整後、1-オクタノールを1滴加え直ちに NaBH<sub>4</sub> を加えて混和した。15分室温にて静置後、5M HCl を静かに加えて過剰の NaBH<sub>4</sub> を酸化分解し、pH5 に戻した。続いて試料液中のメルカプトエタノールを除くため、0.2M HgCl<sub>2</sub> を加えて生じた沈澱を除いた。得られた上清を5M NaOH で pH12 に調整し、室温にて4時間放置した。再度5M HCl にて pH1 以下に調整し、4°C、1晩静置後、さらに液量の0.1容量5M HCl と亜鉛末溶液を速やかに加えて5分間攪拌して得られた液を HPLC に供した。更に、試料液は塩濃度が非常に高いため、いったんアゾ化した後、Bio-Gel P2 カラムにて脱塩処理を施し、ふたたび還元して PABGlu に還元分解後、HPLC に供した。

#### 4. 研究成果

(1) 今回測定した葉酸の主要供給源である食品の葉酸量と遊離葉酸比を香川式4群食品群別に平均値を算出した(表1)。遊離葉酸量の割合は、遊離葉酸量の割合が高い食品は全て4群食品群の第2群に属しており、主にたんぱく質源となる食品であった。

日本食献立、5食における総葉酸含量と遊離葉酸比(%)は、表2に示した。いずれの献立も遊離葉酸の割合は大差がない結果となった。

表1 香川式4群食品群別の葉酸供給源上位食品中総葉酸量と遊離葉酸割合

食品群	食品名	総葉酸 (mg/100g)	遊離葉酸の 割合 (%)
第1群	卵、ヨーグルト、牛乳	62.5±63.3	12.7±8.2
第2群	納豆、豚肉、マグロ ほうれん草、キャベツ、プロッコリ	41.4±55.9	54.2±27.7
第3群	一、レタス、さつまいも、じゃがいも	136.2±96.4	10.1±13.4
第4群	煎茶、玉露、うどん、白飯、食パン	41.6±57.8	13.3±10.8

平均値±SD

表2 日本食献立中の葉酸量と遊離葉酸の割合

献立	料理名	調理法	総葉酸 (μg/100g)	遊離葉酸 (%)
1	マグロ丼	生	191	11.5
	かぼちゃと人参のきんぴら 長いもの素焼き	炒 焼		
2	つけそば	焼煮	98	14.3
	人参のたらこ炒め ゆりねときゅうりの梅肉添え みかん	炒 茹 生		
3	鮭の焼き南蛮漬け ひじきのカラフル炒め	焼 炒	163	16.6
	レタスとえのきの味噌汁 ブルーの紅茶漬け 胚芽ご飯	煮 浸 炊		
4	ゴーヤチャンプルー さやいんげんとエリンギの和え物	炒 茹	247	15.0
	新玉ねぎとわかめの味噌汁 ヨーグルトとパインのシャーベット 胚芽ご飯	煮 生 炊		
5	さわらのさっぱり西京焼き れんこんとしめじの梅和え	焼 茹	96	15.6
	人参としらたきの真砂炒め さつまいものミルク煮 胚芽ご飯	炒 煮 炊		

(2) 健康な若年女性の総葉酸摂取量は 310±100μg で遊離葉酸として 52±21μg、ポリグルタミン酸型葉酸として 256±84μg であった。摂取比率の平均は遊離葉酸 16.9±4.1%、ポリグルタミン酸型葉酸 82.7±4.1%であり、表2の日本食献立測定値と同程度となった。また総葉酸摂取量とポリグルタミン酸摂取比率との間に相関はないことから、遊離葉酸とポリグルタミン酸型葉酸の存在比は摂取量には左右されないことがわかった。

認知症高齢者においては、総葉酸摂取量は 291±45μg で遊離葉酸として 48±9μg、ポリグルタミン酸型葉酸として 243±37μg であった。摂取比率の平均は遊離葉酸 16.4±1.9%、ポリグルタミン酸型葉酸 83.6±1.9%であり、若年女性と同様の結果が得られた。

一方、血清葉酸濃度は両群で差がみられた。すなわち若年女性 8.4±3.6ng/ml に対して認知症高齢者は 4.6±2.8ng/ml と非常に低値 (p<0.001) を示した。若年女性では葉酸摂取量と有意な相関がみられた (r=0.204, p<0.05) が、認知症高齢者では摂取量とは相関を示さなかった。遊離葉酸、ポリグルタミン酸型葉酸別に相関をみると、図1に示すように若年女性では遊離葉酸摂取量は血清葉酸濃度と正の相関 (r=0.288, p<0.01) を示したが、認知症高齢者では逆に負の相関傾向 (r=-0.252, p<0.099) となった(図2)。更に若年女性では遊離葉酸摂取比率と血清葉酸濃度は正の相関 (r=0.231, p<0.05)、ポリグルタミン酸型葉酸摂取比率と血清葉酸濃度は負の相関 (r=-0.221, p<0.05) を示した(図3)。総葉酸摂取量が 240μg 未満の場合 (n=27) は、一層その傾向が強く示された (r=-0.397, p<0.05)。総葉酸を十分摂取していれば、ポリグルタミン酸型葉酸の摂取比率は血清葉酸値に有意に反映されなかった。一方、認知症高齢者ではポリグルタミン酸型葉酸摂取比率と血清葉酸濃度は正の相関 (r=0.442, p<0.004) を示した(図3)。高齢者では消化機能の低下などが葉酸吸収に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

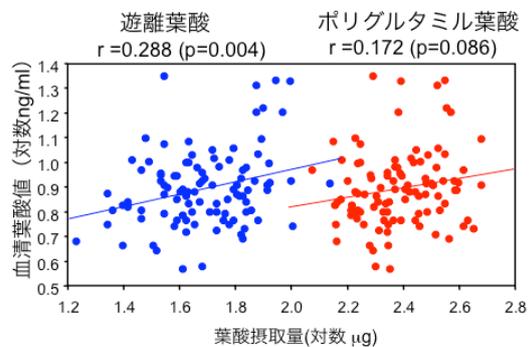


図1 若年女性の葉酸摂取量(遊離葉酸とポリグルタミン酸型葉酸)と血清葉酸濃度

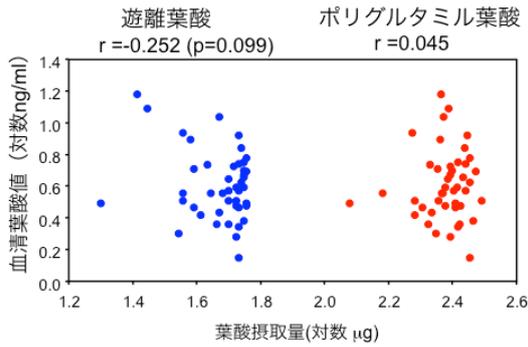


図2 認知症高齢者の葉酸摂取量（遊離葉酸とポリグルタミン酸型葉酸）と血清葉酸濃度

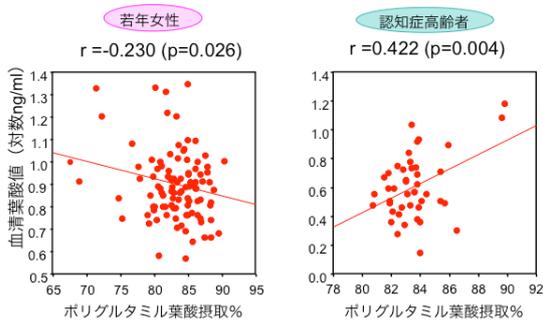


図3 ポリグルタミン酸型葉酸摂取比率と血清葉酸濃度

(3) パラアミノベンゾイルグルタミン酸 (PABGlu<sub>n</sub>) のクロマトグラムを図4に示す。30分程度で7種類の各成分の良好な分離が可能となった。

本法は葉酸を解裂してPABGluにする際、高濃度の酸とアルカリを使用するため、溶液中の塩濃度が非常に高くなり、カラムに注入する前に脱塩処理が必要である。そこで文献に従いアゾ化後ゲル濾過したが回収率は低かった。今後は精製条件の検討と食品検体への応用を今後継続して検討する必要がある、より正確な葉酸のBioavailabilityを考慮した栄養指導による疾病予防への発展が期待される。

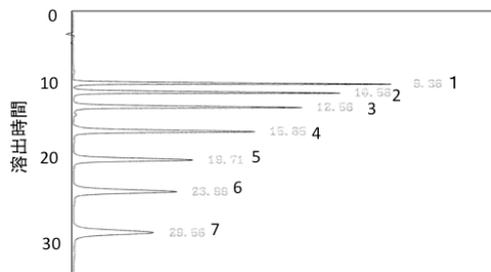


図4 PABGlu<sub>1</sub>～PABGlu<sub>7</sub>のクロマトグラム  
ピーク右の数字は溶出時間とグルタミン酸側鎖数を表す。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

①平岡真実、影山光代、百合本真弓、金胎芳子、矢富裕、大川龍之介、國枝寛、堀江修一、香川靖雄、葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテラーメイド栄養学-さかど葉酸プロジェクト-、ビタミン 83、264-274 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

①平岡真実、小島早貴、影山光代、安田和人、香川靖雄、食事中葉酸におけるポリグルタミン酸誘導体の葉酸栄養状態への影響、日本ビタミン学会第60回大会、2008年6月14日、宮城・仙台国際センター

②S Kojima, M Hiraoka, Y Kagawa, Folate polyglutamyl folate ratio in Japanese diet, The 39th Conference of Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health, 2007年11月24日、埼玉・女子栄養大学

③小島早貴、平岡真実、香川靖雄、日本人の食事中葉酸におけるポリグルタミン酸誘導体の存在比、第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月20日、京都・京都国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 真実 (FUKUSHIMA MAMI)  
女子栄養大学・栄養学部・助教  
研究者番号：30286885