

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350140

研究課題名(和文) 食材中の天然型葉酸の生体利用率評価系の構築とその応用に関する研究

研究課題名(英文) Construction of bioavailability evaluation system of natural folate in food stuff and its application

研究代表者

梅垣 敬三 (UMEGAKI, Keizo)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 情報センター・センター長

研究者番号：60191920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：4週齢マウスに葉酸欠乏食を4週間与え、その後に葉酸添加食を1週間与えて、血漿、骨髄、肝臓の葉酸濃度および血漿ホモシステイン濃度の変化により、様々な食事葉酸の生体利用率を評価する実験系を構築した。その方法を利用して、日本人の主要な葉酸供給源と考えられる緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)がハウレンソウ由来葉酸の吸収にほとんど影響しないこと、またEGCGがバイオアッセイ法による葉酸分析に影響しないことを示した。また、マウスにX線を全身照射して骨髄染色体損傷を誘発する試験系において、ハウレンソウ由来葉酸が合成葉酸と同様、染色体損傷の抑制作用を有することを示した。

研究成果の概要(英文)：To evaluate bioavailability of various food folates, a folate depletion/repletion mice model was constructed. In the model, 4-week-old mice fed a folate deficient diet for 4 weeks were supplied with food folate for 7 days, and then the folate bioavailability was evaluated in terms of changes in folate level in plasma, liver, and bone marrow and decrease in plasma homocysteine level. Based on this model, we showed that tea catechin in green tea, which is considered a major folate source of Japanese, did not influence absorption of spinach folate, and had no practical impact on folate analysis in green tea, using the general microbiological assay. In addition, we showed that spinach folate as well as synthetic folic acid attenuated the chromosomal damage in bone marrow induced by total body irradiation of X-ray.

研究分野：栄養学

キーワード：葉酸 生体利用率 緑茶 茶カテキン 放射線防御

### 1. 研究開始当初の背景

葉酸はホウレンソウの抽出物から発見された B 群ビタミンの一種で、ラテン語の「葉」を意味する「folium」と「酸」を意味する「acid」から Folic acid と命名されたとされている。しかし、実際の葉酸とは葉酸活性を持つ構造類似体の総称名で、多様な化合物が葉酸に該当している。

葉酸は DNA 合成やアミノ酸代謝などに重要な役割を担っている。不足すると巨赤芽球性貧血を起こし、また、血中ホモシステイン濃度の増加により動脈硬化のリスクを高める。胎児の神経管形成期である受胎前後から妊娠初期までの間に、母体の葉酸が不足していると、胎児の神経管閉鎖障害のリスクが高くなることも知られている。

食品から摂取している葉酸は天然型葉酸（ポリグルタミン酸型）と合成葉酸（モノグルタミン酸型）に大別できる。天然型葉酸は消化管の酵素によってポリグルタミン酸型からモノグルタミン酸型に変換されてから体内に吸収される。そのため、ポリグルタミン酸型の天然型葉酸の生体利用率は合成葉酸に比べて低いことが知られている。そして、天然型葉酸はサプリメントなどに含まれている合成葉酸の 50% と見積られている。しかし、実際の天然型葉酸の生体利用率は、食材によって 30% から 98% の幅があることが若干の食材の評価で示されている。日常摂取している多様な食材中の天然型葉酸の生体利用率は十分に検討されておらず、そのような状況で合成葉酸の生体利用率が高いということから、合成葉酸を含むサプリメントの摂取が推奨されている。個々の食材中の天然型葉酸の生体利用率、およびその吸収に影響する食事因子については、これまで適切な評価系がないため、ほとんど明確になっていない。

日本人の葉酸供給源の一つとして緑茶があげられる。これは緑茶中の葉酸をバイオアッセイ法によって測定した食品成分表の値から摂取量を算出して言及されたものである。すなわち、緑茶から葉酸を摂取した際の消化吸收等を踏まえて検討されたものではない。緑茶中にはカテキン類が含まれており、特にエピガロカテキンガレートは、消化管の消化酵素活性の阻害作用や抗菌作用を有することが知られている。これらの茶カテキンの作用は、多様な化学形態の天然型葉酸の測定に採用されているバイオアッセイ法の分析に影響する可能性を示唆している。また、茶カテキンは他の食材から摂取した葉酸の体内吸収にも悪影響を及ぼしている可能性がある。しかしながら、それらの点について詳細に検討した報告は見当たらない。

葉酸は DNA 合成や染色体の安定化に寄与することが報告されており、合成葉酸については放射線曝露による染色体損傷の防御作用を示唆した報告がある (Int J Radiat Biol, 82:223-230, 2006)。しかし、天然型葉酸に同様の作用があるか否かについて検討した

報告は見当たらない。

### 2. 研究の目的

本研究では、食材中に含まれている天然型葉酸の生体利用率の評価系として、少量の食材試料で検討可能なマウスの in vivo 評価系を構築し、その妥当性を検証した。また、日本人の重要な葉酸供給源と考えられている緑茶に含まれている茶カテキンに関して、バイオアッセイ法による葉酸分析への影響、天然型葉酸の体内吸収への影響をマウスの in vivo 評価系において検討した。さらに、マウスの末梢網状赤血球の小核試験を利用して、ホウレンソウ由来葉酸の放射線防御効果の可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

葉酸欠乏 - 再負荷の実験系の構築：既にラットで実施した実験条件 (Food and Nutrition Sciences 4:136-143, 2013) を参考に、できるだけ短期間に評価できる条件を設定した。具体的には、マウスに葉酸欠乏食を一定期間与え、その後に検討したい食事葉酸を含む飼料を一定期間与え、血漿・肝臓・骨髄の葉酸濃度の増加と血漿ホモシステインの低下を指標として、食事葉酸の有効性を評価した。この検討の特徴は、葉酸要求性が高いと考えられる骨髄の葉酸濃度の変動に着目している点である。

マウスの葉酸欠乏食にはアミノ酸ベースの市販特殊飼料 (Dyets Inc.) を用いた。葉酸添加食は、葉酸欠乏食に合成葉酸 (folic acid) または食材由来の葉酸を添加して調製した。葉酸の分析は、多様な化学形態の葉酸の微量定量ができるバイオアッセイ法 (トリエンザイム法) により実施した。実際の分析は、クロラムフェニコール耐性菌と 96 穴マイクロプレートを利用した。血漿ホモシステインおよび茶カテキンは、HPLC 法により測定した。

マウスは 4 週齢の ICR 系や C57BL 系などの雄を用い、個別のケージで飼育して摂餌量を把握した。

葉酸の定量および消化吸收に対する茶カテキンの影響：バイオアッセイ法による葉酸分析の各操作段階における試料中茶カテキン (特にエピガロカテキンガレート) 濃度を測定し、葉酸分析に対する茶カテキンの影響を評価した。また、マウスの葉酸欠乏-再負荷の実験系において、葉酸再負荷の段階で、ホウレンソウ由来葉酸とともにエピガロカテキンガレートを飼料に添加し、その後の組織内葉酸濃度の増加を測定した。天然型葉酸としてはホウレンソウの凍結乾燥品を用いた。

X 線全身照射により誘発した骨髄染色体損傷に対する天然型葉酸の防御作用の検討：マウスに葉酸欠乏食を 4 週間摂取させた後、葉酸欠乏群と再負荷群に分けた。葉酸欠乏群には葉酸欠乏食を継続して与え、葉酸再負荷

群には合成葉酸またはハウレンソウ由来葉酸を1週間与えた。その後、それぞれの群のマウスをさらにX線照射群と非照射群に分け、X線照射群には無麻酔下で0.45Gyの軟X線を全身照射して骨髄染色体損傷を誘発した。X線照射2日後、尻尾から血液を採取し、末梢網状赤血球を利用した小核試験により骨髄染色体損傷度を評価した。また、血液、骨髄、肝臓を採取し、血液と組織中の葉酸濃度、血漿ホモシステイン濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

マウスの *in vivo* 葉酸欠乏-再負荷の条件は、マウスに4週齢から葉酸欠乏食を4週間摂取させ、その後に葉酸含有食(2mg 葉酸/kg 飼料)を1週間与える条件が適切と考えられた。マウスとしてはICR系やB57BL系なども利用したが、系統による大きな違いは認められなかった。

日本人の葉酸供給源の一つとして緑茶が知られている。その値は、葉酸要求性の菌体を利用したバイオアッセイ法によって測定されたものである。しかし、緑茶には茶カテキン(特にエピガロカテキンガレート)が多く含まれており、茶カテキンはバイオアッセイ法による葉酸分析の際、前処理酵素や菌体生育の阻害作用を有する可能性があった。そこでバイオアッセイ法による緑茶中の葉酸分析に茶カテキンが影響するかどうかを検討した。その結果、エピガロカテキンガレートは強い菌体生育阻害作用を示し、その阻害濃度は10 $\mu$ g/mL以上であった。ガレート基を持たない茶カテキンには阻害作用は認められなかった。試料の前処理に利用する3つの酵素活性はエピガロカテキンガレートにより阻害され、その阻害濃度は、 $\alpha$ -amylase 750  $\mu$ g/mL、protease 1000  $\mu$ g/mL、conjugase 50  $\mu$ g/mL以上であった。しかし、実際の各分析操作段階において、試料中のエピガロカテキンガレート濃度は、阻害濃度以下にまで低下し、エピガロカテキンガレートは緑茶の葉酸分析に影響しなかった。緑茶試料のconjugase処理の有無から、緑茶中に含まれる葉酸は、ほとんどがポリグルタミン酸型と推定された。以上の結果から、バイオアッセイ法による緑茶中の葉酸分析に対して、茶カテキンが実質的には影響しないことが示唆された。

茶カテキンの中でエピガロカテキンガレートは消化酵素などへの阻害作用が強いと考えられ、経口摂取した天然型葉酸の体内吸収を阻害する可能性が考えられた。そこで天然型葉酸としてハウレンソウ由来葉酸を用い、エピガロカテキンガレートの葉酸吸収に対する影響を、マウスの *in vivo* 葉酸欠乏-再負荷の実験系で検討した。その結果、エピガロカテキンガレートはハウレンソウ由来葉酸の体内吸収にほとんど影響しなかった。このことから飼料中に十分な量の天然型葉酸が含まれていれば、エピガロカテキンガレ

ートはその葉酸の体内吸収にほとんど影響しないことが示唆された。

マウスにX線を全身照射する実験系において、骨髄染色体損傷に対するハウレンソウ由来葉酸と合成葉酸の防御作用を検討した。葉酸欠乏食を与えたマウスの血液と組織中の葉酸濃度は低下し、血漿ホモシステイン濃度は増加した。その後、合成葉酸(Folic acid)または天然型葉酸(ハウレンソウ由来)を1週間与えることで、血液と組織中の葉酸濃度は増加し、血漿ホモシステイン濃度は低下した。これらの変化に対して、合成葉酸と天然型葉酸で著しい差異はなかった。X線を照射しない条件において、骨髄染色体損傷度は葉酸欠乏食群で増加し、その増加は合成葉酸および天然型葉酸の摂取により抑制された。X線を全身照射した条件では、骨髄染色体損傷度が著しく増加し、合成葉酸および天然型葉酸を負荷した群では、いずれもX線照射による染色体損傷度が有意に抑制された。以上の結果より、葉酸不足状態では骨髄染色体損傷度が高くなること、その骨髄染色体損傷度はX線全身照射によってさらに増強されること、また、ハウレンソウ由来の天然型葉酸は合成葉酸と同様に、X線照射による骨髄染色体損傷の防御作用を有することが示唆された。ハウレンソウ由来の葉酸の生体利用率が高い結果は、ラットの葉酸欠乏-再負荷の実験系において認めた結果とよく一致した(Food and Nutrition Sciences 4:136-143, 2013)。

本研究で構築したマウスの葉酸欠乏-再負荷の実験系は、食品中に様々な形態で存在するポリグルタミン酸型葉酸の生体利用率の評価に有用な試験系であることが示された。また、エピガロカテキンガレートの実験で示したように、食品中に共存する葉酸の吸収阻害因子、あるいは葉酸の吸収促進因子の検索にも応用できると考えられた。今回構築した実験系が短期間の葉酸再負荷でも評価できたのは、葉酸要求性の高い骨髄を評価対象組織としたためと考えられた。

近年、葉酸は胎児の神経管閉鎖障害のリスク低減で注目されており、天然型葉酸の生体利用率が低いという理由から、妊娠を計画している女性や妊娠可能な女性には、生体利用率の高い合成葉酸を含むサプリメントの摂取が推奨されている。しかし、本研究で示唆されるように、天然型葉酸でもハウレンソウ由来葉酸のように生体利用率が合成葉酸とそれほど差異のないものもある。今回設定したマウスの *in vivo* における葉酸欠乏-再負荷の実験系を利用すれば、通常の食材中にも生体利用率の高い葉酸の存在が明らかにでき、合成葉酸のサプリメントに依存しないで、葉酸を適切に摂取できる食事を提案することが可能と考えられる。これは昨今のサプリメントの乱用が危惧される状況を改善でき、栄養政策や健康政策に重要な資料が提示できる可能性を示している。

今回構築したマウスの評価系では、食品成

分の消化吸収における種差の影響を把握することはできない。これはマウスの評価系の利用において留意すべき事項である。ヒトにおいて膨大な食材中の葉酸の生体利用率を検討することは現実には困難である。そのため、今回のマウスの評価系を活用して多様な食材から注目すべき食材を選定し、その現象をヒト試験で検証することが、今回構築したマウスの評価系の妥当な使い方と考えられる。

#### 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)

Umegaki K, Sekine Y, Sato Y, Chiba T, Sonoda M. Effect of Tea Catechins on Folate Analysis in Green Tea by Microbiological Assay. J Nutr Sci Vitaminol 2016;62(2):134-8. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

尾関彩、小林悦子、佐藤陽子、千葉剛、梅垣敬三. X線全身照射マウスの骨髄染色体損傷に対する合成型葉酸と天然型葉酸の防御作用. 第63回日本栄養改善学会. 青森市. 2016.9.7

関根有希、園田勝、尾関彩、千葉剛、佐藤陽子、梅垣敬三. バイオアッセイ法による緑茶の葉酸定量に対する茶カテキンの影響. 日本ビタミン学会 67 回大会. 奈良市. 2015.6.5

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

梅垣 敬三 (UMEGAKI, Keizo)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所・情報センター・センター長

研究者番号： 60191920

(2)研究分担者

なし