

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500956

研究課題名(和文) ヒト血管内皮細胞の酸化障害に対する葉酸および葉酸含有食品の効果

研究課題名(英文) Effect of folic acid and folic acid-containing foods against oxidative damage of human vascular endothelial cells

研究代表者

村上 恵 (Murakami, Megumi)

同志社女子大学・生活科学部・准教授

研究者番号：80340769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸の抗酸化性について、葉酸標品だけでなく、食品中に含まれる葉酸についても抗酸化性を有することが明らかにした。また、その抗酸化性は血管内皮細胞の過酸化水素障害に対しても弱いながら発揮される可能性が示唆された。

さらに脳卒中予防の観点から、血栓モデルであるフィブリンプレート法を用いて葉酸の血栓溶解性を検討し、葉酸標品では血栓溶解性は認められないが、アスパラガスから抽出した葉酸には溶解性がみられ、食品中に含まれる葉酸には血栓に対して何らかの作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Standards of folic acid has been shown to have antioxidant properties, folic acid contained in foods was also revealed to have similar anti-oxidative properties. Its antioxidant is to be exerted against oxidative damage of vascular endothelial cells was suggested, the effect was weak.

In terms of stroke prevention, we examined the thrombolytic properties of folic acid using the fibrin plate method is a thrombosis model. As a result, were observed thrombolytic the standards of folic acid. However, thrombolytic was observed in folic acid that is extracted from asparagus. Thus, may show some effect on thrombus folic acid contained in the food has been suggested.

研究分野：調理科学

キーワード：葉酸 抗酸化性 血栓溶解性 ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 アスパラガス

1. 研究開始当初の背景

(1) 海外における7カ国共同の大規模疫学研究から、妊娠初期の積極的な葉酸摂取は胎児の神経管閉鎖障害(NTDs)の発症率を72%も低下させることが報告されている(Wald N., *Lancet*, 1991)。この結果を受け、アメリカでは穀類に葉酸を添加し摂取量を増加させることにより、NTDsの発症率の低下のみならず、葉酸添加後の脳卒中の死亡率や要介護者が減少したことが明らかにされている(Yang Q., *Circulation*, 2006, Manton K.G., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006)。また脳卒中のような生活習慣病の発症には、活性酸素の関与が示唆されていることから、葉酸の活性酸素消去能についても近年明らかにされつつある(Joshi R., *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, Bashir M., *FEBS*, 2003, Anna G.S., *J. Agric. Food Chem.*, 2007)。一方、日本では葉酸の認知度は低く、NTDs発症率は1993年から2003年の10年間で約2倍に増加している。

(2) 脳卒中は平成17年度の厚生労働省による患者調査において約130万人が罹患し、13万人が死亡する日本人の死亡原因の第3位を占めている。このような現状を踏まえ、埼玉県坂戸市では、女子栄養大学との共同で平成18年より「さかど葉酸プロジェクト」をスタートさせ、葉酸摂取量の増大や葉酸強化食品の開発、認知症の予防と食に関する講習会などに取り組んでいる。その結果、葉酸の認知度の上昇や野菜の摂取量の増大、血清葉酸濃度の上昇およびホモシステイン値の減少がみられたことが報告されている(香川靖雄, *ビタミン*, 2008)。しかしながら、国内において脳卒中や認知症予防に対する葉酸の効果や葉酸の活性酸素消去能に関する研究はほとんど見られない。

2. 研究の目的

本研究では、葉酸のNTDsの発症率低下以外に脳卒中や認知症の発症予防にも寄与する点に着目した。すなわち、活性酸素は生活習慣病発症に関与すると考えられていることから、葉酸の活性酸素消去能が脳卒中のような血管障害に対しても有効であるかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 葉酸のラジカル捕捉活性をDPPH-吸光度法を用いて評価した。試料としてプテロイルモノグルタミン酸(FA)、ジヒドロ葉酸(DHF)、テトラヒドロ葉酸(THF)、5-メチルテトラヒドロ葉酸(5-MTHF)の4種の葉酸とビタミンB₁₂および葉酸たまご、ほうれん草、アスパラガスの3種類の食品を用いた。

(2) これらのサンプルについてHuvecの過酸化水素障害に対する保護効果をMTT

法により活性酸素消去能を評価した。

(3) サンプルの血栓溶解作用についてフィブリンプレート法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 葉酸の抗酸化性が測定可能かを確認するため、DPPH-吸光度法を用いて、葉酸標品のラジカル捕捉活性を測定した。その結果、FAにはほとんど抗酸化性はみられず、最終濃度100μMでは、5-MTHF > THF > DHFの順に抗酸化性を示した。

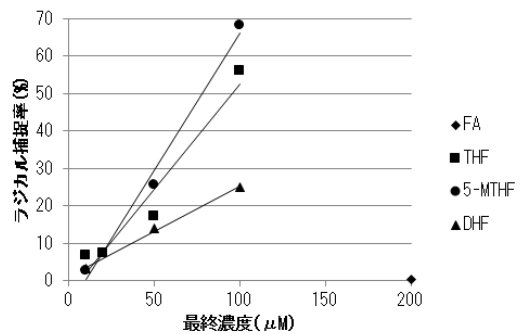


図1.葉酸標品のラジカル捕捉活性

食品中の葉酸についてラジカル捕捉活性を測定した結果、いずれのサンプルにもラジカル捕捉活性が認められ、アスパラガスとほうれん草においては、葉酸量との間に相関がみられ、葉酸がラジカル捕捉活性に関与していると示唆された。葉酸たまごの相関係数が他の試料に比べてやや低かった。

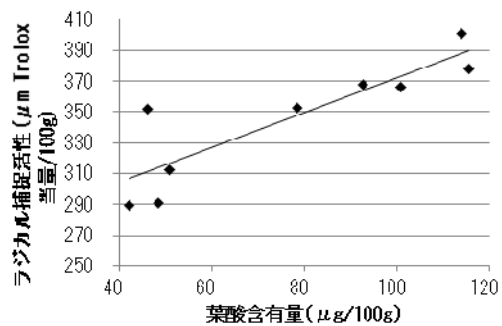


図2.アスパラガスのラジカル捕捉活性と葉酸量の相関

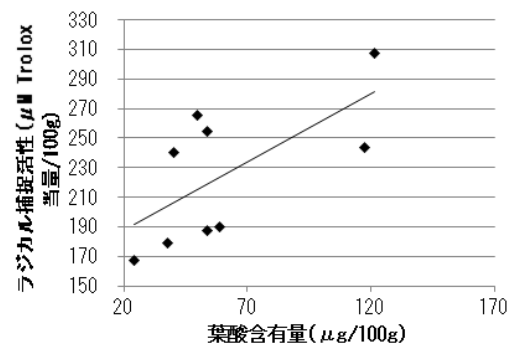


図3.ほうれん草のラジカル捕捉活性と葉酸量の相関

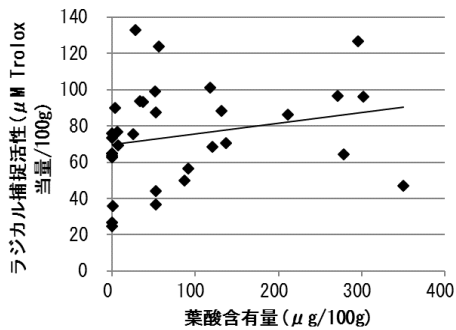


図 4.葉酸たまごのラジカル捕捉活性と葉酸量の相関

卵白は葉酸がほとんど含まれていないにも関わらず、ラジカル捕捉活性を示した。卵白の主要なタンパク質はオボアルブミンであり、抗酸化性をもつとの報告があるため、オボアルブミンの抗酸化性への寄与を検討した。その結果、約 30~90%寄与しており、オボアルブミンの抗酸化性がラジカル捕捉活性の測定に関与していると推測された。

表 1.オボアルブミンの寄与率

	ラジカル捕捉活性 (μM Trolox 当量/100g)		寄与率 (%)
	抽出液中のオボアルブミン	試料溶液	
生	24 ± 3	71 ± 6	34
固ゆで	39 ± 3	79 ± 10	49
かきたま	28 ± 4	29 ± 6	97
炒り	21 ± 0	64 ± 1	32

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

(2) Huvec に最終濃度 0.1~0.5mM H₂O₂ を添加したところ、0.2mM 以上では吸光度が一定になったことから、0.3mM 以上の H₂O₂ の添加により大部分の Huvec が細胞死に至ったと考えられる。アスパラガス抽出液を添加すると、昨年度抽出したほうれん草、全卵、卵黄抽出液と比べて生存率が高い傾向にあった。

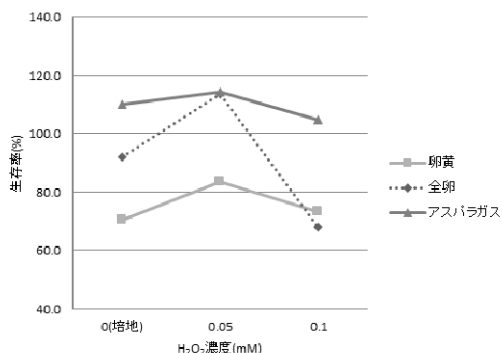


図 5.H₂O₂ 添加による生存率の変化

(3) 本実験はフィブリンを凝固させることで簡易的な血栓モデルを形成するフィブリンプレート調製し、それを用いて行った。血栓溶解因子を活性化させる酵素、u-PA をフィブリンプレートに添加し、その溶解面積から検量線を作成した。

アスパラガスの葉酸抽出液では生、ゆでサンプルの抽出液で血栓溶解性が見られ、u-PA 当量は生サンプルの方がゆでサンプルよりも 5%の危険率で有意に高い値を示した。ブランク (抽出溶液)、希釈溶媒 (DMSO、メタノール) では溶解が見られなかったことから、これらの溶液は血栓溶解性に関与しないと考えられた。

表 2. アスパラガスの血栓溶解性

サンプル	u-PA 当量 (U/ml)
生	1.14 ± 0.30
ゆで	0.21 ± 0.04

(n=6, **p<0.01)

血栓溶解性と葉酸量では両サンプルにおいて緩やかな正の相関が見られたことから、血栓溶解性には葉酸が関与している可能性が考えられる。そのため、葉酸標品である FA や抗酸化力が強いと言われている THF を添加し実験を行ったが、血栓溶解性は見られなかった。

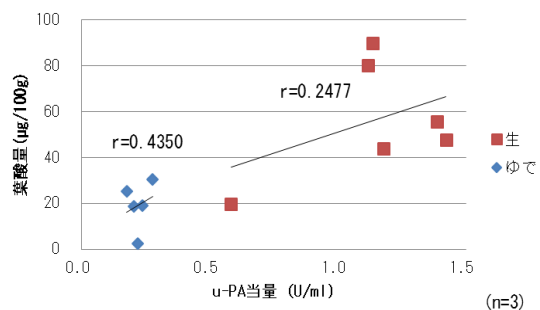


図 6. 血栓溶解性と葉酸量の相関

以上の結果より、葉酸は標品だけでなく食品から抽出した葉酸にも抗酸化性が認められ、その食品の抗酸化性に関与することが示唆された。またその抗酸化性は血管内皮細胞の過酸化水素障害に対しても効果を発揮する可能性が考えられた。

また動脈硬化抑制の観点から、血栓溶解性に対する葉酸の作用も検討したところ、葉酸の標品では血栓溶解性は認められなかったものの、アスパラガスから抽出した葉酸では認められた。

これらのことから食品に含まれる葉酸には、抗酸化性や血栓溶解性などこれまではあまり明らかにされてこなかった新たな機能性が存在する可能性が示唆された。

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)

〔学会発表〕(計1件)

村上 恵，橋本幸江，小鳥 愛，岡本千加，原田清佑，渡部和哉，食品中に含まれる葉酸のラジカル捕捉活性測定の検討，日本調理科学会平成25年度大会，2013年8月23日，奈良女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 恵 (MURAKAMI Megumi)

同志社女子大学・生活科学部・准教授

研究者番号：80340769