

## 《原著》

# メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T と葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値との関連 —葉酸添加発酵乳を用いたシングルアーム介入試験—

三ツ口千代菊<sup>1)</sup> 熊谷佳子<sup>2)</sup> 安友裕子<sup>2)</sup> 伊藤勇貴<sup>2)</sup>  
北川元二<sup>1)</sup> 藤木理代<sup>2)</sup> 徳留裕子<sup>1)</sup>

## 要旨

## 【目的】

葉酸添加発酵乳を付加し、メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型別 (MTHFR) C677T 別に葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値との関連を検討した。

## 【方法】

解析対象者は本学管理栄養士養成課程の1年生女子65名、調査期間は2014年11月～12月である。介入食品にはプテロイルモノグルタミン酸 (PtGlu<sub>1</sub>) 200μg/100mL 添加したビフィズス菌発酵乳 (以下、葉酸添加発酵乳とする) を用いた。介入はシングルアーム試験である。血清葉酸値は CLEIA 法、血漿ホモシステイン値は HPLC 法で測定した。遺伝子多型は、口腔内粘膜を採取し、PCR-RFLP 法で解析した。食事調査は FFQ を用いた。なお、葉酸添加発酵乳の介入については、巨赤芽球性貧血、動脈硬化症などのリスクを血清葉酸値および血漿ホモシステイン値のカットオフ値を用いて評価した。統計解析は、対応のある *t* 検定、一元配置分散分析、Pearson の相関、 $\chi^2$  検定、Fisher の直接確率検定などを行った。

## 【結果】

介入前の平均葉酸摂取量は249μg/日であった。葉酸摂取量と血清葉酸値は正相関があり、血漿ホモシステイン値とは負相関していたが、統計的に有意ではなかった。血清葉酸値と血漿ホモシステイン値の間には介入前後とも中等度の有意な負の関連がみられた。介入前の血清葉酸値は CC>CT および TT に有意差があり、血漿ホモシステイン値は介入前後とも CC および CT<TT に有意差があった。介入前後の変化率は、血清葉酸値は、全体で平均65% (CC 型; 48%、CT 型; 72%、TT 型; 74%) 有意に上昇し、血漿ホモシステイン値は、全体で平均-22% (CC 型; -19%、CT 型; -21%、TT 型; -28%) の有意な低下がみられた。

巨赤芽球性貧血予防のための血漿ホモシステインのカットオフ値 (14nmol/mL) 以上のリスクのある者は、介入前後とも2名 (3.1%) であった。動脈硬化症の予防のためのカットオフ値 (10nmol/mL) 以上のリスク者は、全体で介入前9名 (13.8%) から介入後2名 (3.1%) に有意に減少した。遺伝子多型別にみると、介入により CC 型 2→0 名、CT 型前後とも 0→0 名で、TT 型 7 名→2 名へ減少した。この2名は巨赤芽球性貧血リスク者と同一対象者であった。

## 【結論】

本学女子大学生は、巨赤芽球性貧血の血清葉酸、血漿ホモシステインのカットオフ値の観点から

1) 名古屋学芸大学大学院栄養科学研究科

2) 名古屋学芸大学栄養管理学部

みると、遺伝子多型に関わらず葉酸の栄養状態はほぼ良好であった。動脈硬化症リスクについては食事性葉酸を十分、摂取したうえで、葉酸添加食品 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg/日) の利用は有効であることが示唆された。

**キーワード：**葉酸摂取量、葉酸添加発酵乳、メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値

## I. 緒 言

葉酸の代謝過程における5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-メチル THF) は、ビタミン B<sub>12</sub> を補酵素として、ホモシステインからメチオニンへの再メチル化に関与している (図1)。葉酸不足は、血漿ホモシステイン値を増加させる。高血漿ホモシステインは、動脈硬化症、認知症、神経管閉鎖障害の危険因子の一つとされている<sup>1-3)</sup>。これらのことから、一般的に血清葉酸値は短期間の葉酸の摂取状態を表し、血漿ホモシステイン値は、生体内での葉酸の栄養状態を表す指標として、血漿ホモシステイン値を用いることができる。

葉酸代謝は、メチレンテトラヒドロ還元酵素 (MTHFR) 遺伝子多型 (C677T) と関連がある<sup>4)</sup>。MTHFR 遺伝子多型は、野性型同型接合体 (ホモ) CC 型、異型接合体 (ヘテロ) CT 型、変異型同型接合体 (ホモ) TT 型がある。MTHFR 遺伝子多型のうち、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と報告されている<sup>5)</sup>。5,10-メチレン THF は、MTHFR により5-メチル THF に変換される。MTHFR の酵素活性の低下は、5-メチル THF の生成を抑制し、ホモシステインの再メチル化を阻害する。

米国の国民健康・栄養調査では、心血管疾患の予防に必要な血清葉酸値、血漿ホモシステイン値を測定し<sup>6)</sup>、1998年から穀類に葉酸 140μg/100g を強制的に添加し、日常的な摂取量の増加を図り、脳梗塞死亡率を約10%低下させたと報告している<sup>7)</sup>。米国の葉酸推奨量 (RDA) は400μg/日<sup>8)</sup> であるが、わが国のそれは巨赤芽球性貧血予防レベルの240μg/日 (2015年)<sup>9)</sup> である。なお、妊娠可能な年齢の女性あるいは

妊娠を計画している女性に対しては、神経管閉鎖障害のリスク低減のために、PtGlu<sub>1</sub> として400μg/日をいわゆる健康補助食品から摂取することを勧奨している。

国民健康・栄養調査 (2009年～2014年)<sup>10)</sup> によると、食事による葉酸摂取量 (以下、食事性葉酸とする) は、女性18～29歳で平均247±14.5μg/日であり、約50%が葉酸推奨量 (RDA) 以下である。これはこの10年間、変化していない。また、2001年国民健康・栄養調査<sup>11)</sup> によるサプリメント使用状況は20～29歳で18.5%であり、その種類はビタミン C、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン E、鉄、Ca であり、葉酸は含まれていなかった。女子大学生を対象とした著者らの研究 (2017年)<sup>12)</sup> におけるサプリメント利用率は新入生12.2%、上級生20.1%であり、国民健康・栄養調査の結果とほぼ同様の結果であった。

わが国では、葉酸添加食品の介入による MTHFR 遺伝子多型と血清葉酸値、血漿ホモシステイン値との関連を検討した研究は極めて少なく、プロバイオティクス共存下における介入試験は見当たらない。

そこで、本研究では女子大学生を対象に、摂取に抵抗感が少なく、日常的に摂取しやすい葉酸添加食品 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg 添加) であるビフィズス菌発酵乳を用いて MTHFR 遺伝子多型別に、葉酸摂取量、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値との関連について検討した。

## II. 研究の方法

### 1. 対象者および調査期間

調査対象者は本学管理栄養士養成課程の1年生女子77名、調査期間は2014年11月～12月であ

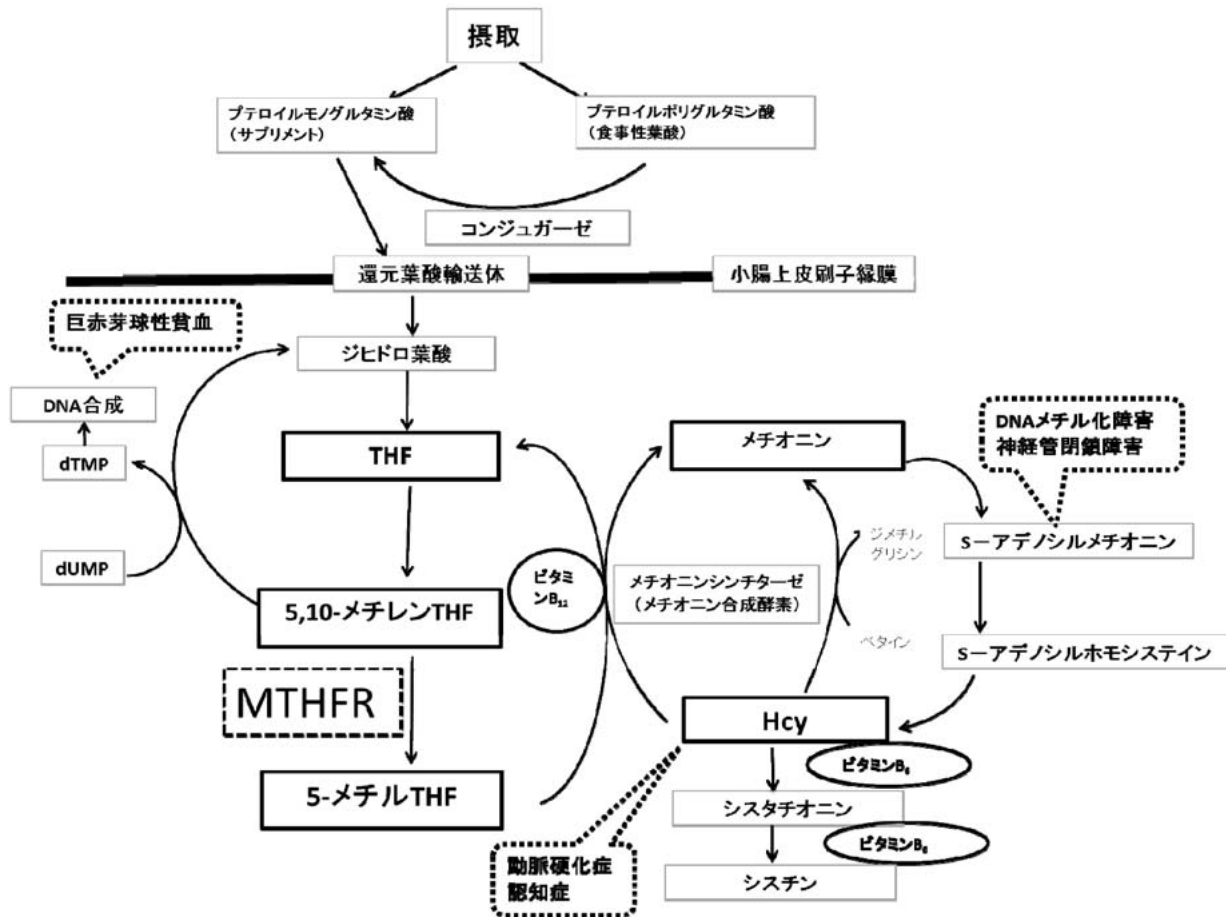


図1 葉酸・ホモシステインの代謝経路

(平岡真実・葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテラーメイド栄養学. ビタミン 2009; 83: 265-274) 一部改変

THF (テトラヒドロ葉酸)

5,10-メチレン THF (5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸)

MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素)

5-メチル THF (5-メチルテトラヒドロ葉酸)

Hcy (ホモシステイン)

る。なお、対象者は習慣的にビタミン剤、サプリメントを使用していないものとした。

## 2. 介入方法

研究デザインはシングルアーム介入試験である。介入には100mL中にBifidobacterium breve ヤクルト株を $1.0 \times 10^{10}$  cfu 含有したビフィズス菌発酵乳（以下、葉酸添加発酵乳とする）を用いた。摂取時間は指定せず、毎日1本・4週間飲用させた。この食品にはプテロイルモノグルタミン酸（以下、PtGlu<sub>1</sub>とする）200μg/100mLが添加されている。その他、ビタミンB<sub>6</sub> 1.2mg、ビタミンB<sub>12</sub> 2.4μgも添加されている（表1）。

表1 葉酸添加発酵乳の栄養成分

(100mL 当たり)	
成分	含有量
エネルギー (kcal)	49
たんぱく質 (g)	3.2
脂質 (g)	0.1
糖質 (g)	10.6
食物繊維 (g)	2.5
ナトリウム (mg)	40
カルシウム (mg)	100
鉄 (mg)	4
ビタミンB <sub>6</sub> (mg)	1.2
ビタミンB <sub>12</sub> (μg)	2.4
ビタミンE (mg)	8
葉酸 (μg) <sup>1)</sup>	200

1) プテロイルモノグルタミン

### 3. 食事調査

食事調査は介入前に半定量食物摂取頻度調査票 (Semi-quantitative Food Frequency Questionnaire : FFQ) を用いて行った<sup>13)</sup>。FFQ は、普段よく食べる102品目の食品・料理の摂取頻度と摂取量を問うものである。摂取頻度は1ヶ月、1週間、1日当たりの摂取回数、摂取量は食品ごとに基準量が設定されており、それに対して、なし(0倍)、0.5倍、0.8倍、同量、1.5倍、2倍以上として回答するものである。出力は50栄養素等および19食品群について、1日当たりの摂取量が出力されるが、ここでは、葉酸に係るエネルギーと6栄養素(たんぱく質、脂質、炭水化物、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、葉酸)および17食品群について検討した。身長、体重は自己申告に拠った。なお、PtGlu<sub>1</sub>の食事性葉酸当量(dietary folate equivalent : DFE)を1.7倍<sup>14)</sup>とした。介入食品である葉酸添加発酵乳のPtGlu<sub>1</sub> 200μgは、DFEとして340μgに相当する。

### 4. 血液生化学検査

血液生化学検査は、介入の前後において、早朝空腹時に採血し、血清葉酸値は化学発光酵素免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay : CLEIA法)、血漿ホモシステイン値は高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography : HPLC)を用いた。分析はSRL (Co. Ltd)に依頼した。なお、巨赤芽球性貧血予防のカットオフ値は血清葉酸値4 ng/mL以上<sup>15)</sup>、血漿ホモシステイン値14 nmol/mL未満<sup>16)</sup>、動脈硬化症の予防のカットオフ値は血漿ホモシステイン値10 nmol/mL未満<sup>17)</sup>を用いた。

### 5. 遺伝子解析

MTHFR 遺伝子多型(C677T, rs1801133)は、介入前に対象者の口腔粘膜を綿棒で採取し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)により抽出したDNAを用いて解析した。MTHFR 遺伝子の増幅は、目的の多型領域を挟む位置に設計したプライマー(Forward : 5' TATTGGCAGGTTACCCCAA 3'、Rivers; 5'

CTCACCTGGATGGGAAAGAT 3')と、DNA合成酵素KOD Plus(東洋紡績株式会社、大阪、日本)を用いて、Polymerase Chain Reaction (PCR)法により行った。DNA増幅プログラムは、94℃ 15秒(変性)、60℃ 30秒(アニーリング)、68℃ 30秒(伸長)を35サイクルとした。PCR産物をHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roch, USA)により精製後、制限酵素HinfI (New England BioLabs, USA)を用いたRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)法にて切断し、3%アガロースゲルに電子泳動し多型の有無を確認した(PCR産物は多型が無い場合208bp、多型を持つ場合85bpと123bpに切断される)。

### 6. 統計解析

血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の分布は偏っていたので、自然対数変換(ln)し、正規化して解析した。栄養摂取量はエネルギーで調整し、エネルギー1,000kcal当たりの摂取量とした。遺伝子多型間の3群間の差は1元配置分散分析、介入前後の比較は対応のあるt検定を行った。食品群はKuskal-Wallis検定を用いて検討した。血清葉酸値と血漿ホモシステイン値の関連については、Pearsonの相関係数を求めた。巨赤芽球性貧血、動脈硬化症などリスクのカットオフ値との分布の割合の比較は $\chi^2$ 検定、Fisherの直接確率法を用いた。統計ソフトSPSS Statistics ver. 20 (IBM)を用い有意水準は $p<0.05$ (両側)とした。

### 7. 倫理的配慮

対象者に、調査の目的および調査で収集したデータは研究以外には使用しないこと、データは統計的に処理するため個人は特定されないこと、調査への参加は自由であり、途中で取りやめても不利益はないことについて文章および口頭にて説明し、文書にて同意を得た。なお、本研究は名古屋学芸大学研究倫理委員会の承認(No.101)を得て行った。



### Ⅲ. 結 果

#### 1. MTHFR 遺伝子多型別身体特性および栄養素、食品群別摂取量

介入前対象者77名中、介入後の採血ができなかった12名を除いた65名について解析した。遺伝子多型の頻度はCC型19名（29%）、CT型32名（49%）、TT型14名（22%）でHardy-Weinberg平衡内にあった。（表2）。

対象者の年齢は $18.3 \pm 0.5$ 歳（平均値 $\pm$ 標準偏差）、身長 $157.5 \pm 5.3$ cm、BMI  $20.1 \pm 1.9$ kg/m<sup>2</sup>であった。BMI 18.5kg/m<sup>2</sup>以下（やせ）の割合は20%であった。国民健康・栄養調査（2014年）<sup>10）</sup>による15～19歳のやせの頻度19.3%とほぼ同じ

割合であった。

介入前全体の摂取量は、エネルギー $1,526 \pm 342$ kcal/日、ビタミンB<sub>6</sub>  $1.0 \pm 0.3$ mg/日、ビタミンB<sub>12</sub>  $4.1 \pm 2.0$ μg/日、葉酸 $249 \pm 96$ μg/日であった、摂取エネルギーと葉酸摂取量の間には $r=0.541$ （ $p<0.001$ ）の中等度の相関があった（図2）。そこで、栄養素摂取量は、エネルギーで調整した。

主な葉酸供給源食品の摂取量は豆類32.6（18.5～44.1）[中央値（四分位範囲）]g/日、緑黄色野菜類69.3（56.3～103.2）g/日、その他の野菜類107.4（61.4～179.4）g/日、果物類37.3（14.0～79.6）g/日であった。健康日本21<sup>18）</sup>の目標量と比較すると、緑黄色野菜類は目標量の57.8%（目標

表2 MTHFR 遺伝子多型別、身体特性および栄養素・食品群別摂取量

項目	全体 (n=65)		CC 型 (n=19)		CT 型 (n=32)		TT 型 (n=14)		<i>p</i> <sup>1)</sup>	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD		
身体特性										
年齢 (歳)	18.3	0.5	18.4	0.5	18.2	0.4	18.4	0.5	}	
身長 (cm)	157.5	5.3	157.7	4.9	157.1	5.5	158.0	5.4		
体重 (kg)	50.0	5.9	51.9	6.0	49.1	6.2	49.7	5.0		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.1	1.9	20.8	1.8	19.8	1.9	19.9	1.7		
栄養素等										
総エネルギー (kcal)	1526	342	1480	377	1610	348	1394	224		
たんぱく質 (g)	57.6	16.3	55.8	17.2	60.0	16.8	54.6	14.0		
脂質 (g)	54.1	16.6	50.8	16.7	58.5	17.1	48.5	13.4		
炭水化物 (g)	196.9	43.1	195.3	45.7	205.2	45.6	179.9	28.4	}	
ビタミン B <sub>6</sub> (mg)	1.0	0.3	1.0	0.4	1.0	0.3	0.9	0.3		
ビタミン B <sub>12</sub> (μg)	4.1	2.0	4.3	2.2	4.2	1.8	3.7	2.2		
葉酸 (μg)	249	96	269	102	237	96	249	93		
食品群 (g/日)	中央値	(四分位範囲)	中央値	(四分位範囲)	中央値	(四分位範囲)	中央値	(四分位範囲)	<i>p</i> <sup>2)</sup>	
めし類	250.0	(175.0~337.5)	250.0	(197.1~290.0)	280.0	(157.5~350.0)	230.0	(135.0~307.5)	}	
パン類	64.3	(43.2~97.1)	53.6	(42.9~98.6)	63.6	(43.9~94.3)	71.8	(53.2~107.1)		
いも類	21.4	(14.3~28.6)	21.4	(14.3~28.6)	18.8	(14.3~35.1)	22.3	(12.5~28.6)		
砂糖・甘味料	0.0	(0.0~0.8)	0.0	(0.0~1.1)	0.0	(0.0~1.2)	0.0	(0.0~0.4)		
豆類	32.6	(18.5~44.1)	36.1	(21.3~56.1)	33.3	(17.6~42.4)	27.9	(16.5~60.4)		
種実類	0.1	(0.0~1.1)	0.2	(0.1~1.1)	0.2	(0.0~1.2)	0.1	(0.0~0.2)		
緑黄色野菜類	69.3	(56.3~103.2)	66.1	(56.1~83.6)	67.9	(55.1~94.4)	92.1	(70.0~152.7)		
その他の野菜類	107.4	(61.4~179.4)	109.3	(65.0~185.7)	108.7	(52.4~155.1)	95.8	(55.5~213.1)		
果実類	37.3	(14.0~79.6)	57.4	(25.0~117.4)	31.0	(13.3~81.3)	35.9	(4.9~54.4)		
藻類	4.6	(1.9~9.5)	5.4	(1.8~10.0)	4.6	(1.5~8.4)	5.0	(3.1~10.9)		
魚介類	36.1	(25.7~51.7)	36.4	(26.6~50.9)	38.8	(27.3~53.4)	30.7	(16.1~53.4)		
肉類	68.6	(46.6~110.0)	57.9	(34.3~102.1)	79.3	(55.9~115.2)	64.6	(43.4~71.5)		
卵類	25.0	(25.0~50.0)	31.4	(25.0~50.0)	28.2	(20.0~50.0)	25.0	(25.0~50.0)		
乳類	173.2	(76.3~271.4)	171.4	(85.7~225.7)	221.4	(68.6~320.6)	86.3	(65.4~231.4)		
油脂類	16.0	(10.9~19.3)	10.9	(7.3~19.2)	16.7	(14.1~20.3)	16.5	(6.8~19.9)		
菓子類	31.4	(16.4~43.9)	35.7	(17.1~50.8)	31.4	(19.4~46.3)	21.6	(7.1~32.3)		
嗜好飲料	160.7	(103.6~310.7)	207.1	(128.6~335.7)	150.0	(101.8~306.2)	184.8	(77.7~336.2)		

$p^{1)}$  一元配置分散分析（多重比較 *post hoc* Bonferroni 検定）

$p^{2)}$  Kruskal Wallis 検定

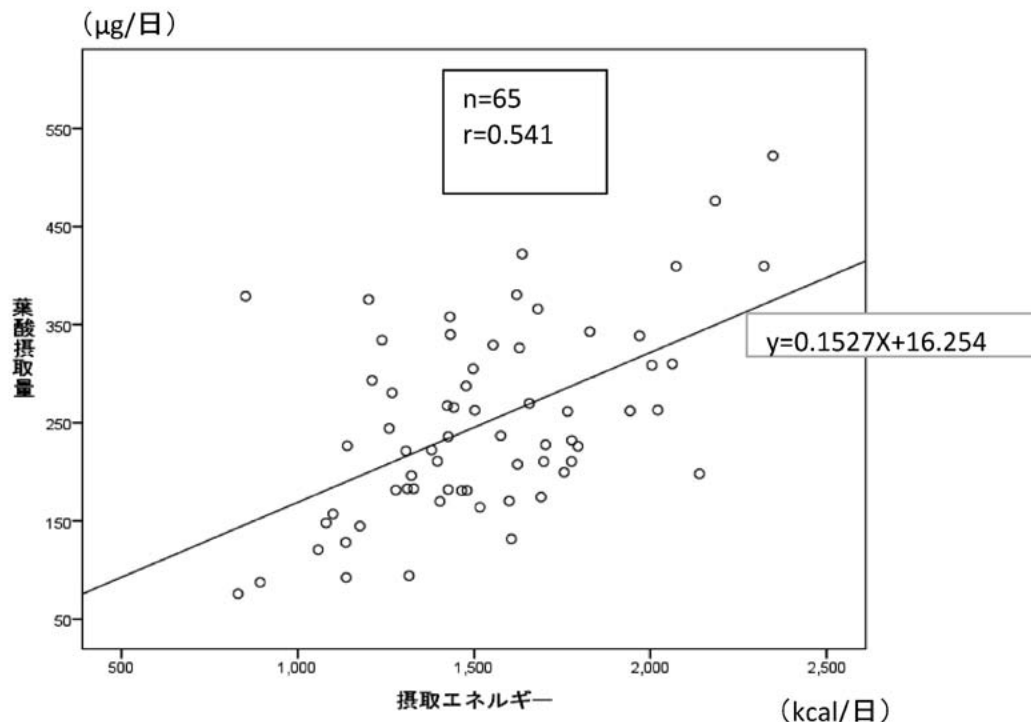


図2 摂取エネルギーと葉酸摂取量の関連

量120g)、その他の野菜類46.7% (目標量230g)、豆類37.3% (目標量100g)、果実類18.7% (目標量200g)であり、目標量に達していなかった。

身体特性および栄養素・食品群別摂取量は、いずれも遺伝子多型間に差はなかった。

## 2. 介入試験による MTHFR 遺伝子多型別葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値

### 1) MTHFR 遺伝子多型別葉酸摂取量

介入前の葉酸摂取量 (全体) は  $164 \pm 62 \mu\text{g}/1,000\text{kcal}/\text{日}$ 、介入後は、 $\text{PtGlu}_1$   $200 \mu\text{g}/\text{日}$  (DFE  $340 \mu\text{g}/\text{日}$ ) (表3) を加えた  $386 \pm 83 \mu\text{g}/1,000\text{kcal}/\text{日}$  で、介入前後に差があった ( $p < 0.001$ )。遺伝子多型別にみると、CC 型介入前  $186 \pm 83 \rightarrow$  介入後  $417 \pm 115 \mu\text{g}/1,000\text{kcal}/\text{日}$  へ (以下、同様)、CT 型  $146 \pm 44 \rightarrow 355 \pm 56 \mu\text{g}/1,000\text{kcal}/\text{日}$  へ、TT 型  $177 \pm 56 \rightarrow 412 \pm 57 \mu\text{g}/1,000\text{kcal}/\text{日}$  へといずれも有意に増加した。遺伝子多型間では、介入前には有意ではなかったが、介入後は  $\text{CC} > \text{CT}$  の間に有意の差があった ( $p < 0.024$ )。他の栄養素は、いずれも介入前後は有意差があったが (いずれも  $p < 0.001$ )、遺伝子多型間の比較では、介入前、介入後いずれも差はなかつ

た。

### 2) MTHFR 遺伝子多型別血清葉酸値

血清葉酸値 (全体) は、介入前  $7.1 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$   $\rightarrow$  介入後  $11.7 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$  と増加した ( $p < 0.001$ ) (表3)。遺伝子多型別にみると CC 型介入前  $9.0 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$   $\rightarrow$  介入後  $13.3 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$  へ、CT 型は  $6.8 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$   $\rightarrow 11.8 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$  へ、TT 型は  $5.7 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$   $\rightarrow 9.8 \pm 1.6 \text{ ng/mL}$  へといずれも介入後が有意に高い値を示した (いずれも  $p < 0.001$ )。遺伝子多型間では介入前  $\text{CC} > \text{CT}$  ( $p < 0.05$ )、 $\text{CC} > \text{TT}$  ( $p < 0.001$ ) であり、CC 型は他の多型 (CT、TT) より高い値であった。しかし、介入後は遺伝子多型間に差はなかった。介入前後の変化率は全体では  $165.2 \pm 1.3\%$  であり、遺伝子多型別では CC 型  $148.3 \pm 1.3\%$ 、CT 型  $172.4 \pm 1.3\%$ 、TT 型  $173.6 \pm 1.3\%$  の増加であった。しかし、その変化率は遺伝子多型間に有意差はなかった。

### 3) MTHFR 遺伝子多型別血漿ホモシステイン値

血漿ホモシステイン値 (全体) は、介入前  $8.0 \pm 1.3 \text{ nmol/mL}$   $\rightarrow$  介入後  $6.2 \pm 1.3 \text{ nmol/mL}$  へ低

表3 介入試験による MTHFR 遺伝子多型別、葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値

		全体 (n=65)			CC (n=19)			CT (n=32)			TT (n=14)			$p^{2)}$
		平均値	SD	$p^{1)}$	平均値	SD	$p^{1)}$	平均値	SD	$p^{1)}$	平均値	SD	$p^{1)}$	
総エネルギー (kcal/日)	介入前	1526	342		1480	377		1610	348		1394	224		ns
	介入後	1575	342		1529	377		1659	348		1443	224		ns
蛋白質 (g/1,000kcal/日)	介入前	37.5	5.0	<0.001	37.3	4.6	<0.001	37.1	5.2	<0.001	38.7	5.0	<0.001	ns
	介入後	38.4	4.7		38.3	4.4		37.9	5.0		39.7	4.8		ns
脂質 (g/1,000kcal/日)	介入前	35.1	5.7	<0.001	33.9	4.6	<0.001	36.1	5.8	<0.001	34.5	6.8	<0.001	ns
	介入後	34.0	5.6		32.8	4.6		35.0	5.7		33.4	6.6		ns
炭水化物 (g/1,000kcal/日)	介入前	130.1	15.5	<0.001	133.3	13.3	<0.001	128.2	16.2	<0.001	130.2	17.3	<0.001	ns
	介入後	132.9	15.2		136.1	13.1		130.9	15.8		133.1	16.9		ns
ビタミン B <sub>6</sub> (mg/1,000kcal/日)	介入前	0.6	0.2	<0.001	0.7	0.2	<0.001	0.6	0.1	<0.001	0.6	0.2	<0.001	ns
	介入後	1.4	0.2		1.5	0.2		1.3	0.2		1.5	0.2		ns
ビタミン B <sub>12</sub> (μg/1,000kcal/日)	介入前	2.6	1.0	<0.001	2.8	1.0	<0.001	2.6	1.0	<0.001	2.6	1.3	<0.001	ns
	介入後	4.1	1.0		4.4	0.8		4.0	1.0		4.2	1.1		ns
葉酸摂取量 (μg/日)	介入前	249	96	<0.001	269	102	<0.001	237	96	<0.001	249	93	<0.001	ns
	介入後	589	96		609	102		577	96		589	93		ns
葉酸摂取量 (μg/1,000kcal/日)	介入前	164	62	<0.001	186	83	<0.001	146	44	<0.001	177	56	<0.001	ns
	介入後	386	83		417	115		355	56		412	57		a, b (0.024)
血清葉酸値 (ng/ml)	介入前	7.1	1.5	<0.001	9.0	1.4	<0.001	6.8	1.4	<0.001	5.7	1.4	<0.001	a, b (0.029) a, c (0.001)
	介入後	11.7	1.5		13.3	1.4		11.8	1.4		9.8	1.6		ns
	変化率 (%)	165.2	1.3		148.3	1.3		172.4	1.3		173.6	1.3		ns
血漿ホモシステイン値 (nmol/ml)	介入前	8.0	1.3	<0.001	7.4	1.2	<0.001	7.4	1.2	<0.001	10.4	1.4	<0.001	a, c (<0.046) b, c (<0.004)
	介入後	6.2	1.3		6.1	1.2		5.8	1.2		7.5	1.5		a, c (0.046) b, c (0.004)
	変化率 (%)	77.9	1.2		81.3	1.2		78.6	1.1		71.9	1.2		ns

血清葉酸値、血漿ホモシステイン値については統計解析は log 値を用いて行い表示はもとに戻した値を示す

$p^{1)}$  介入前後の  $t$  検定

$p^{2)}$  遺伝子多型間 (CC=a, CT=b, TT=c) の比較は、一元配置分散分析 (多重比較 *post hoc Bonferroni* 検定: 同じ記号間に有意差有り)

下した ( $p<0.001$ ) (表3)。遺伝子多型別では CC 型  $7.4 \pm 1.2 \text{ nmol/mL} \rightarrow 6.1 \pm 1.2 \text{ nmol/mL}$ 、CT 型は  $7.4 \pm 1.2 \text{ nmol/mL} \rightarrow 5.8 \pm 1.2 \text{ nmol/mL}$ 、TT 型は  $10.4 \pm 1.4 \text{ nmol/mL} \rightarrow 7.5 \pm 1.5 \text{ nmol/mL}$  といずれも有意に低下した ( $p<0.001$ )。遺伝子多型間では介入前  $\text{CC} < \text{TT}$  ( $p<0.05$ )  $\text{CT} < \text{TT}$  ( $p<0.01$ ) と TT 型が高くなっていた。介入後も同じような傾向であった。介入前後の変化率は全体では  $77.9 \pm 1.2\%$  であり、遺伝子多型別では CC 型  $81.3 \pm 1.2\%$ 、CT 型  $78.6 \pm 1.1\%$ 、TT 型  $71.9 \pm 1.2\%$  といずれも低下したが、遺伝子多型間に有意差はなかった。

#### 4) 葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値との関連

葉酸摂取量と血清葉酸値は正相関、血漿ホモシステイン値とは逆相関していたが、統計的に有意ではなかった。血清葉酸値と血漿ホモシステイン値との間には、介入前後とも中等度の負の関連があった (介入前  $r = -0.478$ 、介入後  $r = -0.535$   $p<0.001$ ) (図3)。

### 3. 介入前後における MTHFR 遺伝子多型別巨赤芽球性貧血および動脈硬化症のリスクと血清葉酸値、血漿ホモシステイン値

#### 1) 巨赤芽球性貧血

本研究では巨赤芽球性貧血のリスクのカットオフ値を血清葉酸値 (4 ng/mL) 未満と血漿ホモシステイン値 (14 nmol/mL) 以上を用いた。血清葉酸値の当該カットオフ値を下回るものは、全体において、介入前 6 名 (9.2%)  $\rightarrow$  介入後 1 名 (1.5%) に減少した ( $p=0.115$ ) (表4)。遺伝子多型別では、CC 型は介入前後とも 0 名、CT 型 3 名  $\rightarrow$  0 名 (介入前  $\rightarrow$  介入後)、TT 型 3 名  $\rightarrow$  1 名 (介入前  $\rightarrow$  介入後) にいずれも減少した。

血漿ホモシステインのカットオフ値以上に該当する者は、介入前後とも全体で 2 名 (3.1%) であり、その遺伝子多型は TT 型であった。遺伝子多型別の出現頻度は介入前後でいずれも有意差はなかった。

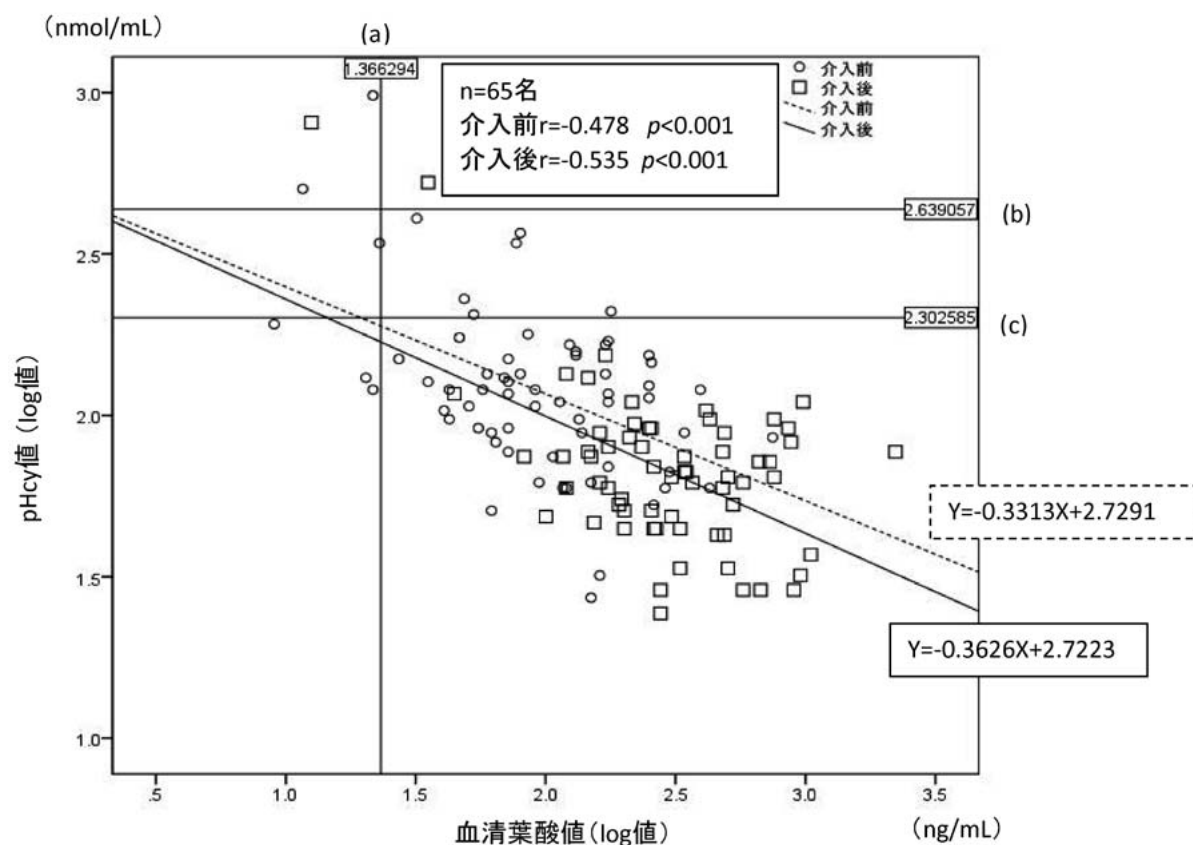


図3 血清葉酸値と血漿ホモシステイン値 (pHcy) との関連

- (a) 血清葉酸値  $\geq 4$  ng/mL の log 値 (巨赤芽球性貧血予防のカットオフ値)  
 (b) pHcy 値  $< 14$  nmol/mL の log 値 (巨赤血球性貧血予防のカットオフ値)  
 (c) pHcy 値  $< 10$  nmol/mL の log 値 (動脈硬化症予防のカットオフ値)

表4 介入前後における MTHFR 遺伝子多型別巨赤芽球性貧血および動脈硬化症のリスクと血清葉酸値、血漿ホモシステイン値

MTHFR 遺伝子多型 n	血漿ホモシステイン値					血清葉酸値				
	全体 (65)	CC (19)	CT (32)	TT (14)	$p^{1)}$	全体 (65)	CC (19)	CT (32)	TT (14)	$p^{1)}$
巨赤芽球性貧血予防のカットオフ値 ( $\geq 14$ nmol/mL)						(<4 ng/mL)				
介入前 n (%)	2 (3.1)	0	0	2 (14.3)	0.023	6 (9.2)	0	3 (9.4)	3 (21.4)	0.110
介入後 n (%)	2 (3.1)	0	0	2 (14.3)	0.023	1 (1.5)	0	0	1 (7.1)	0.157
$p^{2)}$	1.000			1.000		0.115		0.238	0.596	
動脈硬化症の予防のカットオフ値 ( $\geq 10$ nmol/mL)										
介入前 n (%)	9 (13.8)	2 (10.5)	0	7 (50.0)	<0.001					
介入後 n (%)	2 (3.1)	0	0	2 (14.3)	0.023					
$p^{2)}$	0.054	0.486		0.103						

$p^{1)}$  遺伝子多型間の差 pearson のカイ2乗

$p^{2)}$  介入前後の差 Fisher の直接確率法

## 2) 動脈硬化症

動脈硬化症の血漿ホモシステインのカットオフ値10nmol/mL 以上でみると、全体で介入前9名(13.8%)→介入後2名へ減少した( $p<0.054$ )

(表4)。遺伝子多型ではCC型2名、TT型7名であった。そしてTT型が有意に多かった( $p<0.001$ )。介入後は全体で2名(3.1%)であり、その遺伝子多型はTT型であった。



## IV. 考 察

### 1. 栄養・食品群別摂取量

介入前の栄養素等摂取量については、エネルギー  $1,526 \pm 342 \text{ kcal/日}$ 、葉酸  $249 \pm 96 \mu\text{g/日}$  であり、国民健康・栄養調査<sup>10)</sup> のそれは、それぞれ  $1,776 \pm 474 \text{ kcal/日}$ 、 $237 \pm 101 \mu\text{g/日}$  で、エネルギーは国民健康・栄養調査より有意に低く ( $p < 0.05$ )、葉酸は同じような摂取量であった。日本人の食事摂取基準2015年版<sup>9)</sup> (18~29歳) の葉酸の推定平均必要量 (EAR  $200 \mu\text{g/日}$ ) 未満で、不足の者の割合は35.4%と3人に一人にリスクがあった。また、ホモシステインの代謝に関連するビタミン B<sub>6</sub> (EAR  $1.0 \text{ mg/日}$  以下の者)、ビタミン B<sub>12</sub> (EAR  $2.0 \mu\text{g/日}$  以下) の介入前の不足の者の割合は、それぞれ58.5%、13.8%であった。

葉酸添加葉酸添加発酵乳は葉酸だけではなく、ビタミン B<sub>6</sub>  $1.2 \text{ mg}$ 、ビタミン B<sub>12</sub>  $2.4 \mu\text{g}$  が添加されているので、介入後は、葉酸とビタミン B<sub>6</sub> は、介入前の2.3倍、ビタミン B<sub>12</sub> は1.6倍と増加し、いずれも十分な摂取量となり不足の者はいなかった。このことは、介入後の葉酸代謝にビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> の不足の影響は避けられたものと考えられる。

### 2. 葉酸摂取量と血清葉酸値および血漿ホモシステイン値との関連

遺伝子多型別葉酸摂取量は介入前は粗データ、 $1,000 \text{ kcal}$  当たりとも差がなかったが、介入後は粗データに差がなく、 $1,000 \text{ kcal}$  当たりの摂取量には有意差が示された。それは、介入前の摂取量に一律に PtGlu<sub>1</sub>  $200 \mu\text{g/日}$  を添加したためである。しかし、葉酸摂取量と血清葉酸値および血漿ホモシステイン値には介入前後とも有意な関連はなかった。しかし、著者らの前報<sup>19)</sup> の割付介入試験において、介入前は、本研究同様、葉酸摂取量と血清葉酸値に正の相関はあったものの、有意ではなかった。しかし、PtGlu<sub>1</sub> 添加葉酸添加発酵乳の介入後 (対照群と介入群を含む全対象者) では中等度の有意の相関がみられた。他の報告において、食事性葉酸摂取量と血清葉酸値あるいは血漿ホモシステイン値の間

に有意な負の相関があったという報告<sup>20-22)</sup>、相関はなかったという報告<sup>23-26)</sup> が相半ばしている。介入前のように、日常的な食事性葉酸摂取量 (本研究では  $75-522 \mu\text{g/日}$ ) の範囲では、摂取量と血清葉酸値間に、一定の明確な関連はみられないものの、いずれも正の相関であった。前報<sup>19)</sup> における PtGlu<sub>1</sub> 介入後 ( $71-863 \mu\text{g/日}$ ) の関連性が明確になったのは、摂取量の範囲が大きいためか、PtGlu<sub>1</sub> の吸収・代謝の効果か、また、プロバイオティクスの影響かは今後の検討が必要と考えられる。

### 3. MTHFR 遺伝子多型別の介入前後の血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の変化

介入前後の変化率をみると、血清葉酸値は、全体で介入前より65%、遺伝子多型では CC 型48%、CT 型72%、TT 型74%とそれぞれ有意に上昇していた。血漿ホモシステイン値は、全体で介入前より22%有意に低下した。遺伝子多型では、CC 型19%、CT 型21%、TT 型28%とそれぞれ有意に低下した。

平岡ら<sup>27)</sup> は若年女性を対象に、普段の食事に葉酸を含む総合ビタミン剤を用い PtGlu<sub>1</sub>  $200 \mu\text{g}$ 、 $400 \mu\text{g}$  をそれぞれ4週間付加したシングルアーム介入試験を行い遺伝子多型別に検討した。血清葉酸値は40% (PtGlu<sub>1</sub>  $200 \mu\text{g/日}$  添加) および50% (PtGlu<sub>1</sub>  $400 \mu\text{g/日}$  添加) 上昇し、血漿ホモシステイン値はそれぞれ6%、12%低下したと報告している。さらに遺伝子多型では、(PtGlu<sub>1</sub>  $200 \mu\text{g/日}$  添加) 血清葉酸値は CC 型36%、CT 型30%、TT 型69%の上昇、血漿ホモシステイン値は CC 型10%、CT 型10%、TT 型9%低下していた。(PtGlu<sub>1</sub>  $400 \mu\text{g/日}$  添加) 血清葉酸値は CC 型77%、CT 型45%、TT 型68%の上昇、血漿ホモシステイン値は CC 型10%、CT 型10%、TT 型8%低下していた。(数値については著者が図より積算した) 本研究と同じ PtGlu<sub>1</sub>  $200 \mu\text{g/日}$  付加の変化率は本研究の方が高く、平岡らの  $200 \mu\text{g}$  と  $400 \mu\text{g}$  付加よりも高くなっていた。プロバイオティクス共存下でのビタミン、ミネラルの吸収に対する研究は少ないが、葉酸吸収に関する先行研究<sup>28)</sup> では、葉酸サプリメント、強化パンよりも乳製品に強化

された葉酸の吸収が良かったとの報告がされている。ラットの実験で、添加スフィンゴミエリンは<sup>29)</sup> 単独摂取より葉酸添加発酵乳と同時摂取の方が吸収を増加させたとの報告、葉酸添加発酵乳をラットに与えた群ではCa、Mg、乳蛋白質、の消化・吸収を促進していたという報告など<sup>30-31)</sup> あり、本研究が介入後の葉酸の吸収率が高いのは、ビフィズス菌発酵乳（プロバイオティクス）への影響の可能性が考えられた。

#### 4. MTHFR 遺伝子多型別の介入前後における巨赤芽球性貧血および動脈硬化症のリスク評価と血清葉酸値、血漿ホモシステイン値との関連

##### 1) 巨赤芽球性貧血

2010年の食事摂取基準<sup>32)</sup> から巨赤芽球性貧血のカットオフ値として、赤血球葉酸濃度300nmol/L 以上、血漿ホモシステイン値14nmol/mL 未満が示された。本研究対象者で介入前に血漿ホモシステイン値がカットオフ値以上のリスク者は2名(3.1%)で、その値はそれぞれ14.9nmol/mL、19.9nmol/mLであり、血清葉酸値は2.9ng/mL、3.8ng/mLと低値であった。さらに、葉酸摂取量も147μg/日、125μg/日と低値であり、この2名は酵素活性が低いTT型であった。この2名を除くと本対象者の葉酸栄養状態はほぼ良好であることが示唆された。平岡ら<sup>20)</sup> の報告でも(150名)、血漿ホモシステイン値が18.5μmol/L、22.9μmol/Lの2名(1.3%)がおり、本研究と同様にTT型であった。平岡らはTT型には、食事性葉酸200μg以上の摂取を勧めている。本研究介入後においても上記の2名の血漿ホモシステイン値はリスクのカットオフ値を下回ることにはなかった。その理由として、葉酸添加発酵乳飲用の低アドヒアランスが考えられるが、TT型は日頃から積極的に葉酸を摂取することが望ましいことが示唆された。

##### 2) 動脈硬化症

動脈硬化症の血漿ホモシステインのカットオフ値は10nmol/mL 未満の維持が重要である<sup>17)</sup>。本対象者でカットオフ値以上の者は、介入前は全体で9名(13.8%)であったが、介入後は2名(3.1%)に減少した( $p<0.054$ )。遺伝

子多型でみると介入前はCC型2名、TT型が7名で、介入後はTT型2名がカットオフ値以上であった。荒木らの報告<sup>33)</sup> の若年成人男性(22~30歳)では、血漿ホモシステインのカットオフ値を12nmol/mLとして、142名中14人(10%)にリスクがあった。このカットオフ値で本対象者をみると、全体で6名(9.2%)であり、CC型1名、TT型5名であった。一般に男性が動脈硬化症の罹患率が高いが、本対象者は男性と同じ様な動脈硬化症のリスクを有していた。

#### 5. 栄養教育の重要性

本対象者を血漿ホモシステイン値で評価すると、巨赤芽球性貧血に対する葉酸栄養状態はほぼ良好であった。動脈硬化症のリスクは、介入前はCC型10.5%、TT型50%と現状の葉酸では不足であることが示唆された。PtGlu<sub>1</sub> 200μgを付加すると、TT型2名のみがカットオフ値以上のリスク者として残った。このことから、動脈硬化症予防では、PtGlu<sub>1</sub> 200μg以上のサプリメントを利用することが有用であると考ええる。

厚生労働省は葉酸サプリメントの利用方法<sup>34)</sup> について、「まず食事で確保し、バランスのよい献立に気をつけ、その上で、葉酸が添加された特別用途食品や栄養機能食品、加工食品等を上手に利用し、それでも不足していた場合にはサプリメント(錠剤)の利用」という順番で推奨している。サプリメント(錠剤)は保健医療従事者の専門家であっても勧めにくいだが、今回用いた葉酸添加発酵乳(PtGlu<sub>1</sub> 200μg)のような食品は、日常的に摂取しやすく、抵抗感が低く、プロバイオティクス(腸内フローラの改善)の効果があり、カルシウムなど必要な栄養素が含まれており、栄養指導において勧められる食品の一つであると考えられる。

#### 6. 本研究の限界

本研究の限界として、対象者が少なく、介入期間が短いこと、巨赤芽球性貧血に対して、赤血球中葉酸の評価をしていないことが挙げられる。また、対象者が管理栄養士養成課程の学生であることを考慮すると、一般の若年層と比較して、結果に差がある可能性が考えられる。

## V. 結 語

本学女子大学生に、葉酸添加発酵乳 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg/日添加) を付加し、介入による効果を MTHFR 遺伝子多型別に、葉酸摂取量、血清葉酸値および血漿ホモシステイン値の関連を調べ、介入による巨赤芽球性貧血、動脈硬化症のリスクについて、それらの各カットオフ値を用いて評価した。

本学女子大学生は、巨赤芽球性貧血の血清葉酸、血漿ホモシステインのカットオフ値の観点からみると、いずれの遺伝子多型でも葉酸栄養状態はほぼ良好であった。動脈硬化症リスク者は13.8%みられた。これについては、食事性葉酸を十分、摂取したうえで、葉酸添加食品 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg/日) の利用は有効であり、特に動脈硬化症の予防の点からは PtGlu<sub>1</sub> 200μg 付加が有効であることが示唆された。

## 謝 辞

本研究に当たり、ご協力していただきました名古屋学芸大学管理栄養学部13期生の学生の皆様、先生方、助手の方に厚く御礼申し上げます。

また、葉酸添加発酵乳を提供していただいた(株)ヤクルト本社に御礼申し上げます。

なお、利益相反に相当する事項はない。

## 参考文献

- 1) Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1465-1469
- 2) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-483
- 3) Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007; 95: 285S-288S
- 4) 平岡真実, 景山光代, 百合本真弓 他. 葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテーラーメイド栄養学—さかど葉酸プロジェクト—. *Vitamins Japan* 2009; 83: 65-275
- 5) Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113
- 6) Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, RBC folate, and circulating total homocysteine concentration in the United States, analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-1994, 1999-2000, and 2001-2002. *J Nutr* 2006; 36: 153-158
- 7) Yang Q, Botto LD, Erickson JD, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 2006; 113: 1335-1343
- 8) Institute of Medicine ed. Dietary reference Intakes: For Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington DC, The National Academy Press 1998; 196-305
- 9) 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準2015年度版. 東京: 第一出版, 2014年
- 10) 厚生労働省. 平成26年国民健康・栄養調査報告. <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>, (Accessed on Sep.15, 2016)
- 11) 厚生労働省. 平成13年国民健康・栄養調査報告. [http://www.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk\\_14\\_8.html](http://www.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk_14_8.html)
- 12) ツツ口千代菊, 熊谷佳子, 安友裕子 他. 女子大学生における葉酸・神経管閉鎖障害に関する知識と葉酸摂取量および食物摂取構造解析. *日本食生活学会誌* 2017年; 28: 23-33
- 13) Tokudome S, Ikeda M, Tokudome Y, et al. Development of data-based semi-quantitative food frequency questionnaire for dietary studies in middle-aged Japanese. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 679-687
- 14) Yang TL, Hung J, Caudill M A, et al. A Long-Term Controlled Folate Feeding Study in Young Women Supports the Validity of the 1.7 Multiplier in the Dietary Folate Equivalency Equation. *Am Soc Nutr Sci. j. Nutr* 2005; 135: 1139-1145
- 15) De Benoist B. Conclusion of a WHO technical consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S238-S244
- 16) Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J Am Med Assoc* 1993; 270: 2693-2698

- 
- 17) Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst (e)inemia as risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992; 12: 279-298
  - 18) 厚生労働省. 健康日本21, 栄養・食生活. <http://www.kenkounippon21.go.jp>. (Accessed on Sep 16, 2016)
  - 19) Mitsuguchi C, Kumagai Y, Yasutomo H, et al. Effects of folate-fortified food consumption on serum folate levels according to methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism C677T in Japanese female university students. *Vitam Miner* 2017; 6(4) DOI:10.4172/2376-1316.1000170
  - 20) 平岡真実, 安田和人. 若年女性の葉酸栄養状態について. 厚生労働省報告2002年
  - 21) 平岡真実, 平原史樹. 若年女性の葉酸栄養状態—赤血球葉酸濃度, 血清葉酸濃度, 葉酸摂取量—. 厚生労働省報告 2009年
  - 22) 近藤厚生, 木村恭祐, 磯部安朗 他. 二分脊椎症と葉酸:葉酸経口摂取量と葉酸血清濃度. *日本泌尿会誌* 2003年; 94: 551-559
  - 23) 平岡真実, 平原史樹. 若年女性の葉酸栄養状態—赤血球葉酸濃度測定を中心に—. 厚生労働省報告 2010年
  - 24) 柴田克己, 福渡努. 妊婦における葉酸の摂取量と血中濃度. 厚生労働省報告 2012年
  - 25) 篠崎圭子. 若年女性における葉酸摂取量および赤血球葉酸値の実態. *日本栄養士会雑誌* 2010年; 53: 13-17
  - 26) 松本希美, 溝畑秀隆, 渡邊敏明 他. 女子大生における血清葉酸値と葉酸摂取量の比較検討. *Trace Nutrients Research* 2012; 29: 32-35
  - 27) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, et al. Gene-nutrient and gene-gene interections of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1210-1216
  - 28) Ohrvik VE1, Büttner BE, Rychlik M, et al. Folate absorption from folate-fortified and processed foods using a human ileostomy model. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 532-538
  - 29) Morifuji M, Kitade M, Oba C, et al. Milk Fermented by Lactic Acid Bacteria Enhances the Absorption of Dietary Sphingomyelin in Rats. *Lipids* 2017; 52: 423-431
  - 30) Chonan O1, Takahashi R, Watanuki M. Role of activity of gastrointestinal microflora in absorption of calcium and magnesium in rats fed betal-4 linked galactooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1872-1875
  - 31) 岩渕明, 牧野久美子, 務台方彦 他. 乳酸発酵粉乳投与時のラットにおける胃内窒素形態分布および門脈血漿遊離アミノ酸濃度. *日本栄養・食糧学会誌* 1986; 39: 449-455
  - 32) 厚生労働省策定. 日本人の食事摂取基準2010年度版. 東京: 第一出版, 2009年
  - 33) 荒木理沙, 丸山千寿子, 山口玲奈 他. 若年成人男性における血漿ホモシステイン濃度と血清葉酸, ビタミン B12濃度および食品群別食物摂取頻度の関連. *日本栄養・食糧学会誌* 2012年; 65: 145-158
  - 34) 国立健康・栄養研究所. 「健康食品」の安全性・有効性情報. <http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail1550.html>. (Accessed on Dec. 5 (2016))



## Abstract

# Associations of folate consumption with serum folate concentrations and plasma homocysteine levels according to methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in Japanese female university students — a single-arm intervention study using fermented milk with pteroylmonoglutamic acid

Chiyougiku Mitsuguchi<sup>1</sup>, Yoshiko Kumagai<sup>2</sup>, Hiroko Yasutomo<sup>2</sup>, Yuuki Ito<sup>2</sup>,  
Motoji Kitagawa<sup>1</sup>, Kotoyo Fujiki<sup>2</sup> and Yuko Tokudome<sup>1</sup>

**Objective:** Using fermented milk with probiotics of *Bifidobacterium breve* fortified with 200 µg of pteroylmonoglutamic acid (PtGlu<sub>1</sub>) (fermented milk), we studied associations of folate consumption with serum folate concentrations and plasma homocysteine (pHcy) levels, and evaluated risks of megaloblastic anemia and atherosclerosis using the cut off point (COP) according to methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) genotype.

**Methods:** The study subjects were 65 new-comers of the Course of Nutrition of Nagoya University of Arts and Sciences. A single arm intervention study was conducted from November-December 2014. Serum folate concentrations were measured with CLEIA, and pHcy with HPLC. Oral mucous membranes were sampled and genetic polymorphisms were assayed using PCR-RFLP. Food consumption was studied with FFQ. Paired t-test, one-way analysis of variance, Pearson correlation coefficient, Chi-square test, or Fisher's direct probability method was appropriately adopted.

**Results:** Average consumption of folate was 249µg at baseline. Folate consumption was positively associated with serum folate concentrations, but negatively with pHcy levels without statistical significance. Serum folate concentrations showed moderate negative correlations with pHcy both at baseline and after intervention ( $p<0.001$ ). Serum folate concentrations of CC type were statistically greater than those of CT and TT, and pHcy levels of TT type were statistically greater than those of CC and CT. Serum folate concentrations after intervention increased by 65% as a whole compared with baseline value (CC type 48%, CT type 72%, and TT type 74%). pHcy levels decreased by 22% as a whole compared with baseline value (CC type 19%, CT type 21%, and TT 28%). Change rates of serum folate and pHcy by MTHFR genotype were not statistically significant. The number of subjects having pHcy greater than COP of megaloblastic anemia (14 nmol/mL) were two (3.1%) both at baseline and after intervention. Folate nutrition status was acceptable. The number of subjects who have pHcy greater than COP of atherosclerosis (10 mol/L) were 9 (13.8%) at baseline decreased to 2 (3.1%) after intervention. Those who were at risk of atherosclerosis decreased from 2 to 0 for CC type, from 0 to 0 for CT type, and from 7 to 2 for TT type. These two subjects were the same persons being at risk of megaloblastic anemia, and their compliance of consumption of fermented milk were lower.

---

<sup>1</sup> Graduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences

<sup>2</sup> School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences

---

**Conclusions:** In view of serum folate concentrations and pHcy levels comparing with COP of megaloblastic anemia, folate nutritional status of NUAS university students were acceptably fine, irrespectively of MTHFR genotypes, but there were nine subjects (13.8%) being at risk of atherosclerosis. Those people are advised to sufficiently consume dietary folate, and to consume fermented milk fortified with PtGlu1 200µg/day.

**Key Words:** consumption of folate, Fermented milk, MTHFR C677T genotype, serum folate, and plasma homocysteine