

博士學位論文

若年女性の葉酸摂取行動、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の検討－メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T の影響－

2018年2月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

三ツ口 千代菊

## 目次

	頁 数
要旨	1
英文要旨	6
第 1 章	
序論	13
参考文献	20
第 2 章	
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	
1. 緒言	24
II. 方法	25
III. 結果	29
IV. 考察	34
V. 結語	42
VI. 参考文献	43
図表	49
英文要旨	56
第 3 章	
葉酸添加発酵乳の摂取と血清葉酸値との関連－メチレンテ トラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T 層化ランダム化比較 対照試験－	
1. 緒言	58
II. 方法	59
III. 結果	63
IV. 考察	66
V. 結語	71
VI. 参考文献	72
図表	78
英文要旨	85

## 第 4 章

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—

1. 緒言	88
II. 方法	90
III. 結果	93
IV. 考察	97
V. 結語	103
VI. 参考文献	104
図表	109
英文要旨	116

## 第 5 章

総括 119

謝辞 124

## 参考資料

資料 1 サプリメントに関する質問票	125
資料 2 食物摂取頻度調査票	127
資料 3 対象者へ研究の説明及び同意書	137
資料 4 対象者への結果報告	141

## 関連論文

1. 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
2. Effects of Folic Acid-Fortified Milk Consumption on Serum Folate Levels in Japanese Female Students: a Randomized Controlled Trial Stratified by Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genetic Polymorphism
3. 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—

## 博士学位論文

若年女性の葉酸摂取行動、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の検討ーメチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T の影響ー

### 要旨

近年、葉酸と神経管閉鎖障害 (neural tube defects: NTDs) との関連が報告され、2000年に初めて栄養所要量に葉酸摂取量が示された。続いて、厚生省 (現厚生労働省) 通知として「神経管閉鎖障害の発症リスク低減のために、妊娠を計画している女性に対して妊娠1か月以上前から妊娠3か月までの間、食品からの葉酸摂取に加えて、いわゆる栄養補助食品から葉酸400 $\mu$ g/日の摂取を推奨する」旨が出された。通知より、約15年過ぎているが、NTDsの発症率の低下はみられていない。

最近では、葉酸と動脈硬化症、認知症、がんとの関連の報告もあり、その重要性が注目されている。

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により差がある。わが国では、MTHFR 遺伝子多型と葉酸摂取量、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の関連をみた介入試験は少なく、葉酸を添加したプロバイオティクス食品による介入試験は見当たらない。

本研究では、妊娠可能な年齢にある女子大学生を対象に、葉酸・NTDsに対する知識と葉酸摂取量の関連を明らかにし、

葉酸添加 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg) 発酵乳 (葉酸添加発酵乳) による介入試験を行い、NTDs、巨赤芽球性貧血、動脈硬化症等予防も含めて、遺伝子多型と葉酸摂取量、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 1 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

某大学管理栄養士養成課程の女子大学生 337 名を対象に、葉酸・NTDs の知識と葉酸摂取量、食物消費構造との関連について検討した。特に新入生の葉酸、NTDs に関する知識は十分ではなかった。知識と葉酸摂取量との間には関連が認められなかった。食物消費構造解析では副食および主食パターンが抽出された。葉酸推奨量未満の摂取者 (約 60%) は葉酸ばかりではなく、他の栄養素の摂取量も低かった。これまで以上の葉酸・NTDs 予防のための知識の啓発・普及と食事全体の質 (食事量と食品バランス) に関する教育が重要であることが示唆された。

## 研究 2 葉酸添加発酵乳の摂取と血清葉酸値との関連－メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T 層化ランダム化比較対照試験－

某大学管理栄養士養成課程の女子大学生 143 名を対象に葉酸添加発酵乳が血清葉酸値に及ぼす影響を、MTHFR 遺伝子多型 C677T で層化し、ランダム化比較対照試験を行い、MTHFR 遺伝子多型別に葉酸摂取量、血清葉酸値の関連を検

討した。投与群は PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g を添加したビフィズス菌発酵乳（葉酸添加発酵乳）100mL を 4 週間飲用、対照群はこれまで通りの食生活をしてもらった。血清葉酸値は化学発光免疫法、食事は食物摂取頻度調査法を用いて測定した。全対象者の MTHFR 遺伝子多型の分布は、CC 群 25.2%、CT 群 52.4%、TT 群 22.4%であった。介入前の平均葉酸摂取量は 246 $\mu$ g/日であり、MTHFR 遺伝子多型群間に差はなかった。血清葉酸値は平均 9.8ng/mL であり、CC 群 > CT 群 > TT 群の順に有意に低値を示した。投与群の介入後の血清葉酸値は、すべての MTHFR 遺伝子多型群において介入前より約 1.5 倍上昇した。対照群は介入前後で変化はなかった。

NTDs 予防のための血清葉酸のカットオフ値 7ng/mL を下回る者（割合）は、介入前 19 名/143 名（13.3%）であった。その内訳は CC 群 1 名（2.8%）、CT 群 10 名（13.3%）、TT 群 8 名（25.0%）であり、MTHFR 遺伝子多型群間に差があった。投与群では、介入前 10 名/73 名（13.7%）から介入後 2 名（2.7%）（CT 群 1 名、TT 群 1 名）に減少した。介入後にカットオフ値未満であった 2 名の血清葉酸値は、わずかにカットオフ値を下回っていた。本研究からみると、PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g の添加食品で、NTDs リスク低減の可能性が示唆された。

### 研究 3 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—

某大学管理栄養士養成課程の女子大学生 65 名を対象に、上

記同様の葉酸添加発酵乳を投与したシングルアーム介入試験において、MTHFR 遺伝子多型別に葉酸摂取量、血漿ホモシステイン値の関連を検討した。その結果、葉酸摂取量は、前報同様、遺伝子多型群間に差がなかった。血漿ホモシステイン値は平均 8.0nmol/mL で TT 型が CC、CT よりも有意に高値であった。血漿ホモシステイン値は、介入前より介入後は、有意に 22.1%低下した。巨赤芽球性貧血の血漿ホモシステインのカットオフ値 14nmol/mL 以上の者は介入前後とも 2 名 (3.1%) であり、いずれも TT 型であった。動脈硬化症の血漿ホモシステインのカットオフ値 10nmol/mL 以上の者は、介入前において全体で 9 名 (13.8%) であり、介入後は 2 名 (3.1%) に減少した。カットオフ値以上の 2 名はいずれも TT 型で、巨赤芽球性貧血のリスクと同じ対象者であった。本対象者の葉酸の栄養状態は巨赤芽球性貧血の観点からみるとほぼ良好であり、動脈硬化症の予防の点からは PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g 付加が有効であることが示唆された。

## 結語

女子大学生を対象に葉酸摂取行動、葉酸添加発酵乳の介入による血清葉酸値、血漿ホモシステイン値への影響を MTHFR 遺伝子多型 C677T 別に検討した。その結果、女子大学生の葉酸、NTDs に対する知識は十分ではなく、知識と葉酸摂取量には関連はなかった。葉酸摂取量が推奨量未満の者は 6 割を占め、食生活の改善が必要であった。MTHFR 遺伝子多型別血清葉酸値は、TT 型が有意に低値を示し、血漿ホモ

システイン値は有意に高値を示した。しかし、低用量の葉酸（PtGlu<sub>1</sub> 200μg）添加発酵乳投与後の血清葉酸値は、NTDsリスクを回避できるレベルまで改善した。血漿ホモシステイン値においては、投与後は低下し、動脈硬化症のリスク低減が示唆された。なお、巨赤芽球性貧血に対しては、葉酸の栄養状態には大きな問題はなかった。MTHFR 遺伝子多型にかかわらず、望ましい食生活のために食事のアセスメントを基に、バランスのとれた食事指導を行うこと、その上で、NTDs、動脈硬化症のリスク低減のために、低用量葉酸付加の勧奨が望ましいと考えられた。



Folate Consumption, Serum Folate Concentrations, and  
Plasma Homocysteine Levels in Female Japanese  
University Students: Observations by  
Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genetic  
Polymorphism

**Abstract**

**Background**

Associations of folate with neural tube defects (NTDs) have been reported, and the reference value of folate was first noted in the Dietary Reference Intakes in 2000, in Japan. Then, the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan issued recommendations as follows: in order to reduce the onset of NTDs in women planning pregnancy, 400 µg/day of folic acid from so called nutritional supplementary food should be consumed in addition to dietary folate consumption from more than one month before - 3 months after the gestation. Although 15 years have passed since 2000, no reduction of the onset of NTDs was observed.

Recently, the relationships of folate with atherosclerosis, dementia, and cancer were reported, and the importance of consumption of folate was recognized. It is known that folate metabolisms differ according to

methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genetic polymorphisms. In Japan, few studies have been conducted to investigate the associations of folate consumption with serum folate concentrations and plasma homocysteine (pHcy) levels according to MTHFR genotype, and no randomized controlled trials (RCTs) have been done using folate-fortified food with probiotics.

In the present studies, we recruited female university students of the course of nutrition, and investigated relations of knowledge of folate and NTDs to folate consumption. We also conducted studies using Bifidobacterium fermented milk fortified with pteroylmonoglutamic acid [PtGlu<sub>1</sub>]) 200 µg/100mL (FF milk), and examined the associations of folate consumption with serum folate concentrations and pHcy levels to prevent NTDs, megaloblastic anemia and atherosclerosis.

## **Study 1**

Associations of Knowledge of Folate and Neural Tube Defects with Consumption of Folate and Food Consumption Structure Analyses in Female University Students

We enrolled 363 female Japanese university students (154

newcomers and 209 seniors [juniors plus senior]), and investigated the associations of knowledge of folate and NTDs with the intake of folate and food consumption structure. Newcomers had insufficient knowledge of folate and NTDs. No associations were observed between their acquaintance with folate and folate consumption for all students. Food consumption structure analyses extracted patterns of side-dish and staple food, and revealed that the folate consumption of approximately 60% of students was below the recommended value, and their consumption levels were lower for other nutrients as well as for folate. Both more intensive education concerning folate and NTDs and maintenance of the quantity and quality of food consumption appear to be warranted to prevent NTDs.

## **Study 2**

Effects of Folic Acid-Fortified Milk Consumption on Serum Folate Levels in Japanese Female Students: a Randomized Controlled Trial Stratified by Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genetic Polymorphism

To examine the associations of folate consumption with serum folate concentrations, an RCT stratified by MTHFR C677T genetic polymorphism was conducted in which 143 female students were recruited and FF milk was adopted

as an intervention factor. Subjects in the experimental group were requested to consume FF milk for 4 weeks; subjects in the control group were requested to consume usual meals. Serum folate was analyzed with a chemiluminescence immunoassay, and dietary surveys were conducted using a food frequency questionnaire FFQ. The proportions of MTHFR genotype were CC type (n = 36; 25.2%), CT type (75; 52.4%), and TT type (32; 22.4%). Average folate consumption was 246 µg/day without differences by MTHFR genetic polymorphism. The average serum folate level was 9.8 ng/mL with significant differences according to MTHFR genotype (CC type > CT type > TT type). The average serum folate concentration in the experimental group increased by a factor of 1.5 after the intervention. Serum folate concentrations did not differ between baseline and after the intervention in the control group.

At baseline, 19 participants had serum folate concentrations lower than the cutoff point (COP) for NTDs (7 ng/mL) - CC type, 1 of 36 participants; CT type, 10 of 75; and TT type, 8 of 32 - with significant differences according to MTHFR genotype. In the experimental group, such individuals decreased from 10 to 2 (CT type, 1; TT type, 1). The serum folate concentrations of two participants after the intervention were just lower than

the COP. The present study suggested that consumption of FF milk could reduce the risk of NTDs.

### **Study 3**

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

We invited 65 female university newcomers, and conducted a single-arm intervention study to examine the associations of folate consumption with serum folate concentrations and pHcy levels using FF milk. At baseline no differences of folate consumption were noted according to MTHFR genotype. The average of pHcy levels was 8.0 n mol/mL, and the concentrations were significantly higher for TT type than for CC and CT. pHcy levels decreased by 22.1 % compared with baseline as a whole. Two participants with TT type (3.1%) had pHcy levels greater than the COP of megaloblastic anemia (14 n mol/mL) at both baseline and after the intervention. The number of subjects with a pHcy concentration greater than the COP for atherosclerosis (10 n mol/mL) decreased from 9 (13.8%)

at baseline to 2 (3.1%) after the intervention. These 2 subjects were the same individuals at risk of megaloblastic anemia. In view of serum folate concentrations and pHcy levels compared with the COP for megaloblastic anemia, the folate nutritional statuses of the subjects were acceptable, irrespective of MTHFR genotype, but in terms of prevention of atherosclerosis, FF milk appeared effective in addition to dietary folate.

## **Conclusions**

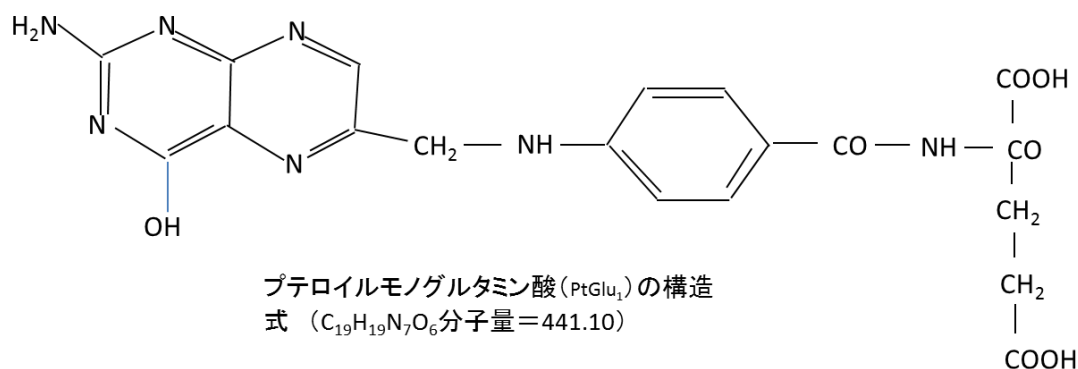
We recruited female university students of the course of nutrition, and investigated the folate consumption behavior, and studied the effects of FF milk consumption on serum folate concentrations and pHcy levels according to MTHFR C677T genotype. As a result, knowledge of folate and NTDs did not generally appear to be sufficient, and no relationship was noted between their level of awareness and folate consumption. Folate consumption was below the recommended level in approximately 60% of the students, and improvements in dietary habits were needed. Subjects having the MTHFR TT type had significantly lower serum folate concentrations and higher pHcy levels. After the intervention using FF milk with lower dose of folic acid (PtGlu<sub>1</sub> 200 µg), serum folate levels increased, and pHcy concentrations decreased. There was

no serious problem with the risk of megaloblastic anemia. Accordingly, we should first perform a nutritional assessment and provide nutritional guidance on balanced meals, and then recommend the consumption of FF milk and/or supplements to prevent NTDs and atherosclerosis.

## 第 1 章

### 序論

1928年イギリスの産婦人科医 Wills, L がインドのムンバイ地方で妊娠時の女性に多くみられた貧血を巨赤芽球性貧血と名づけ予防・治療をおこなった。この時、酵母を与えて改善したことにより、この栄養素を「ビタミン M」と名付けた。1941年 Mitchell, HK らによって、この物質がほうれん草に多く存在することから folic acid (葉酸) と命名された。天然に存在している葉酸には、グルタミン酸が 1 個から数個結合している。現在では、葉酸は狭義にはプテロイルモノグルタミン酸 (PtGlu<sub>1</sub>) を指すが、広義には生理活性がある葉酸補酵素を含めた成分の総称として使われている。食品中の葉酸は、緑葉の野菜類、豆類、キノコ類、肝臓、酵母、柑橘類などに多く含まれている。



食品中の葉酸の大半は補酵素型の一炭素単位置換のポリグルタミン酸型として存在し、酵素蛋白質と結合した状態で存在している。このポリグルタミン酸型の補酵素型葉酸は、いわゆる栄養補助食品（以下、サプリメント）として使用される PtGlu<sub>1</sub> に比べ、加熱調理によって活性が失われやすい。



消化過程は食品ごとに異なり、一緒に食べる他の食品によっても影響を受ける。食品中の葉酸の相対生体利用率は PtGlu<sub>1</sub> と比べ 25~81 %と報告によってばらつきが大きい<sup>2-4)</sup>。日本で食される平均的な食事の葉酸の遊離型 PtGlu<sub>1</sub> に対する相対生体利用率は 50%と報告されている<sup>5-6)</sup>。サプリメントとして使用される PtGlu<sub>1</sub> は、85%の生体利用率を有する。すなわち、葉酸サプリメントは、通常の食品の 1.7 倍の食事性葉酸当量 (dietary folate equivalent : DFE) とみなされている<sup>1,5-7)</sup>。

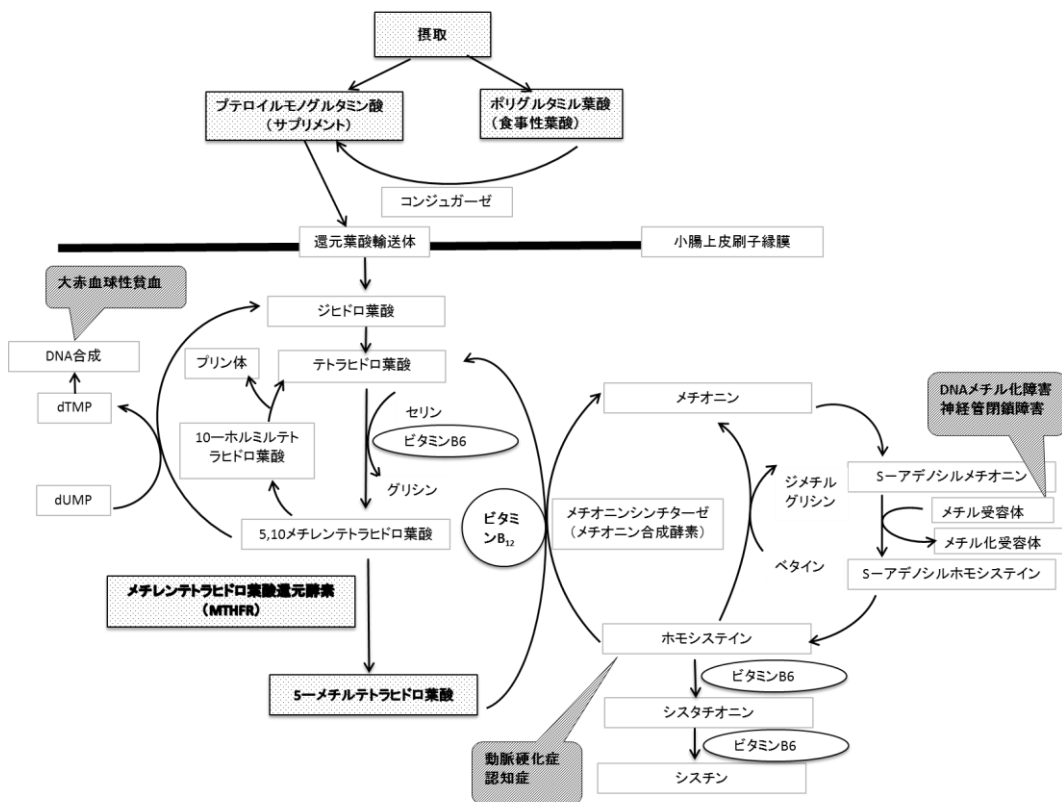


図1 葉酸・ホモシステインの代謝経路  
 (平岡真実. 葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテラーメイド栄養学. ビタミン2009;83:265-274) 一部改変

葉酸の吸収代謝は図 1 に示すように、食物として摂取された葉酸 (ポリグルタミン酸型) は、小腸での消化過程においてプテロイルポリグルタミン酸ヒドロラーゼ (コンジュガー

ぜと呼ぶ) の作用によってモノグルタミン誘導体となり吸収される。サプリメントの PtGlu<sub>1</sub> はそのまま吸収され小腸上皮刷子縁膜上にあるトランスポーターの還元葉酸輸送体により腸管から細胞内に取り込まれる。その後、細胞内の PtGlu<sub>1</sub> は一炭素転移反応および還元によりジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸となり、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素により 5-メチルテトラヒドロ葉酸に還元される。5-メチルテトラヒドロ葉酸とビタミン B<sub>12</sub> を補酵素とするメチオニン合成酵素によりホモシステインからメチオニンに転換され、その後メチル化反応によりメチオニンにアデノシンが付加し S-アデノシルメチオニン (SAM) が合成され、SAM はメチル基供与体として働き、脱メチル化体として S-アデノシルホモシステイン (SAN) を生じる。これが加水分解されて、ホモシステイン (中間産物) ができる。もう一方は DNA 合成の前駆体であるチミジル酸 (dTMP) の生合成に関与する。

5-メチレンテトラヒドロ葉酸の産生には、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) の遺伝子多型 C677T により産生に差があることがわかっている<sup>8)</sup>。MTHFR 遺伝子多型は、野性型同型 (ホモ) 接合体 CC 型、異型 (ヘテロ) 接合体 CT 型、変異型同型 (ホモ) 接合体 TT 型がある。この遺伝子多型により葉酸の代謝が異なり、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<sup>8)</sup>。

葉酸が不足すると巨赤芽球性貧血、神経管閉鎖障害 (二分脊椎、無脳症、脳瘤など; neural tube defects: NTDs)、動

脈硬化症、認知症<sup>9・10</sup>)などの発症に影響を与える。

巨赤芽球性貧血は葉酸欠乏により造血機能が障害される代表的な症状である。赤芽球から赤血球への成熟過程では、DNAとヘモグロビン合成が行われるが、巨赤芽球性貧血は赤芽球の段階で核の成熟が障害され大型細胞が出現し、早期に骨髄内で崩壊する無効造血を特徴としている。5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸は、DNAの4つのデオキシリボ核酸の1つであるチミジル酸の合成に必須であるため、欠乏状態ではDNA合成が障害を受け、細胞分裂の障害と細胞の大型化を招くことになる。

NTDsは、脳や脊髄などの中枢神経系のもと（神経管）が作られる妊娠の4~5週ごろにおこる先天異常である。わが国では、出生児の1万人に対して約6人の割合で見られる。神経管の下部に閉鎖障害が起きた場合、これを「二分脊椎」という。二分脊椎の起きた部位では、脊椎の骨が脊髄の神経組織を覆っていないため、神経組織が障害され、下肢の運動障害や膀胱・直腸機能障害がおきる。神経管の上部で閉鎖障害が起きると、脳が形成不全となり、「無脳症」をきたし、流産や死産の割合が高くなる。これらのNTDsはメチル基（CH<sub>3</sub>）の代謝メカニズムがかかわっている。

荒川ら<sup>11)</sup>によって先天葉酸代謝異常が見つけれられてから1960~1990年代にかけて諸外国でNTDsの発生リスク低減について研究報告が出され、妊娠可能な年齢の女性等へのPtGlu<sub>1</sub>を400μg以上摂取するように勧告している。米国では1998年から穀類に140 μg/100 gの葉酸添加を義務化<sup>12)</sup>して、

NTDs 発症頻度の低下に一定の効果を認めている<sup>13)</sup>。日本においては 2000 年に厚生省（現在の厚生労働省）が「NTDs の発症リスク低減のために、妊娠を計画している女性に関しては、妊娠 1 か月以上前から妊娠 3 か月までの間、当面、食品からの葉酸摂取に加えて、いわゆる栄養補助食品で 1 日 400  $\mu\text{g}$  の葉酸を摂取すれば、NTDs の発症リスクが集団として見た場合に低減することが期待できる旨情報提供を行うこと」という内容の通知を出した<sup>14)</sup>。

その他、葉酸不足は血漿ホモシステイン値を増加させ、LDL コレステロールの酸化、血小板の凝集、血栓の形成促進、平滑筋の増殖促進を招き、認知症、動脈硬化症の発症のリスク要因となることことから、葉酸の重要性が指摘されている<sup>15-16)</sup>。

なお、葉酸（プテロイルモノグルタミン酸）の過剰摂取は、ビタミン B<sub>12</sub> の欠乏を隠すため、悪性貧血が潜在化する危険性が指摘されている。

葉酸の食事摂取基準の経年変化を見ると、第 6 次改定日本人の栄養所要量（2000 年度）<sup>17)</sup> から葉酸の所要量が決められ、18 歳~29 歳までの所要量は 200 $\mu\text{g}$ /日で許容上限摂取量は 1,000 $\mu\text{g}$ /日となっている。妊婦はプラス 200 $\mu\text{g}$ /日である。2005 年に策定された日本人の食事摂取基準<sup>7)</sup>においては、18~29 歳の女性の推奨量（RDA）は 240 $\mu\text{g}$ /日であり、妊婦はプラス 200 $\mu\text{g}$ /日である。日本人の食事摂取基準 2010 年度<sup>18)</sup>では、18~29 歳の女性の RDA は、240 $\mu\text{g}$ /日であり、妊婦はプラス 240 $\mu\text{g}$ /日である。耐容上限量は 1,300mg であり、耐容上

限量はプテロイルモノグルタミン酸に対して定められたもので、食品に含まれるプテロイルポリグルタミン酸に対するものではない。

葉酸の栄養状態の評価は、2005年度の食事摂取基準<sup>7)</sup>において、巨赤芽球性貧血のリスク低減のために血清葉酸値 7 nmol/L (3ng/mL) 以上<sup>19)</sup>、赤血球葉酸 300nmol/L 以上<sup>20)</sup>、血漿ホモシステイン値 14 $\mu$ mol/L 未満<sup>21)</sup>としている。2010年<sup>18)</sup>からは葉酸の栄養状態を表す生体指標として、短期的指標である血清中葉酸ではなく、中・長期的指標である赤血球中葉酸値、血漿ホモシステイン値を用いるようになり、その値の維持を参考にして葉酸摂取量が策定された。

Dary (2009年)<sup>22)</sup>によって NTDs リスク低減のカットオフ値として、血清葉酸 7ng/mL、赤血球中葉酸 400nmol/L 以上が示されている。Marchetta ら<sup>23)</sup>のメタアナリシス (2015年) によれば、食物から食事性葉酸相当量 (dietary folate equivalent: DFE) 450~650  $\mu$ g/日を摂取すれば、赤血球中葉酸値が 472 (339-635) ~596 (419-825) ng/mL になると推定し、この範囲を保つことが NTDs の予防になると報告している。しかし、日本の現状は、国民健康・栄養調査 (2009年~2014年まで) において、葉酸摂取量は、女性 18~29歳で平均 247 $\pm$ 14.5  $\mu$ g/日であり、ここ 10年間増加していない<sup>24)</sup>。2010年の厚生省の研究報告<sup>25)</sup>では、妊娠前から葉酸サプリメントを使用している者は 18.6%であると報告している。厚生省が勧める 400 $\mu$ g/日の付加は、実際のところ、浸透が困難な状態である。

そこで、本研究では、妊娠可能な女性の NTDs 予防に着目して葉酸添加発酵乳 (PtGlu<sub>1</sub> 200 μg/日) による研究を行った。妊娠可能な女子大学生を対象に、葉酸に対する意識調査、葉酸摂取量、食事摂取状況の実態調査を行い、現状を把握した。さらに、葉酸添加発酵乳を付加して、血清葉酸値、血漿ホモシステイン値の動向を MTHFR 遺伝子多型別に検討し、妊娠可能な女性への葉酸摂取に対する方策の方向性を明らかにした。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省.日本人の食事摂取基準 2015年版. 第一出版, 2015: 215- 219
- 2) Tamura T, Stokstad EL. The availability of food folate in man. Br J Haematol 1973; 25: 513-532
- 3) Konings EJ, Troost FJ, Castenmiller JJ, et al. Intestinal absorption of different types of folate in healthy subjects with an ileostomy. Br J Nutr 2002; 88: 235-242
- 4) Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, et al. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. Am J Clin Nutr 1987; 46: 1016-1028
- 5) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamine, 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
- 6) 福渡努,柴田克己. パンを主食とした食事に含まれる水溶性ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率、日本家政学雑誌 2009 ; 60 : 57-63
- 7) 厚生労働省策定.日本人の食事摂取基準 2005年版. 第一出版, 2005: 92-95
- 8) 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

- 9) 木村修一, 香川靖男. 日本語版監修, 食品・栄養・食事療法事典, 産調出版. Krause's Food, Nutrition & Diet Therapy. 11th ed. W.B. Saunders, 2006: ビタミン: 75-119, 栄養ゲノム科学入門: 309-406
- 10) Fairfield KM, Fletcher RH, Vitamins for chronic disease prevention in adults: Scientific Review. JAMA 2002; 287 : 3116-3126
- 11) Arakawa T. Congenital Defects in Folate Utilization. AM. J.Med 1970; 48: 594-598
- 12) Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid, Fed Regist 1996;61:8781-8807
- 13) Stevenson RE, Allen WP, Pai GS, et al. Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States, Pediatrics 2000; 106:677- 683
- 14) 厚生労働省. 厚生労働省児童家庭局母子保健課, 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について(2000年)  
[http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1\\_18.html](http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1_18.html)  
(2000), (Accessed on Sep 2016;16)
- 15) Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et al. Association between plasma homocysteine concentration and



- extracranial carotid-artery stenosis. N Eng J Med  
1995 ; 332 : 286-291
- 16) Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. JAMA 1997 ; 277 : 1775-1781
- 17) 厚生労働省策定.日本人の食事摂取基準 2010 年版. 第一出版, 2010: 162-164
- 18) Herbert V. Making sense of laboratories tests of folate status, Folate requirements to sustain normality. Am J Hem 1987; 26: 199-207.
- 19) 厚生労働省策定.日本人の食事摂取基準 2000 年版. 第一出版, 2000 年
- 20) Herbert V. Experimental nutritional folate deficiency in man. Trans Assoc Am Physicians 1962; 75: 307-320
- 21) 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
- 22) Dary O. Nutrition interpretation of folic acid interventions . Nutrition Reviews 2009; 67: 235-244
- 23) Marchetta CM, Devine OJ, Crider KS, et al. Assessing the association between natural food folate intake and blood folate concentrations: a systematic review and Bayesian meta-analysis of trials and observational

studies, *Nutrients* 2015; 7: 2663-2686

- 24) 厚生労働省.平成 26 年国民健康栄養調査の結果.(2015 年) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>, Accessed on Sep.15 (2016 年)
- 25) 平原史樹.本邦における先天異常モニタリングによる先天異常発生要因の分析とその対応に関する研究.厚生労働科学研究(2010 年)

## 第 2 章

### 研究 1 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

#### I . 緒言

妊娠前および妊娠初期の十分な葉酸摂取は神経管閉鎖障害 (neural tube defects: NTDs) の予防に重要である<sup>1)</sup>。諸外国においては、妊娠可能な年齢の女性に対して、NTDs 発症リスク低減のために 400 $\mu$ g/日~500 $\mu$ g/日の葉酸栄養補助食品の摂取を勧告している<sup>2-3)</sup>。また、米国では 1998 年から穀類に 140 $\mu$ g/100 g の葉酸添加を義務化し<sup>4)</sup>、NTDs 発症頻度の低下に一定の効果を認めている<sup>5)</sup>。

一方、諸外国と比較して、わが国の NTDs の発症リスクは低いことから、葉酸の利用について特段の対応は取ってこなかった。しかし、1999 年に住吉らは厚生科学研究のもと、NTDs の発症率が上昇傾向にあることを報告した<sup>6)</sup>。また、同年に中国において妊娠を計画している女性を対象にして 400 $\mu$ g/日の葉酸介入試験が実施され、NTDs の発生を 40~80 %低下させたという報告<sup>7)</sup>等を踏まえ、2000 年に厚生省 (現厚生労働省) は、「NTDs の発症リスク低減のために、妊娠を計画している女性に関しては、妊娠 1 か月以上前から妊娠 3 か月までの間、当面、食品からの葉酸摂取 (以下、食事性葉酸とする。) に加えて、いわゆる栄養補助食品で 1 日 0.4mg の葉酸を摂取すれば、NTDs の発症リスクが集団として見た場合に低減することが期待できる旨情報提供を行うこと」という内

容の通知を出した<sup>2)</sup>。しかし、通知が出されて10年が経過した2009年のNTDs発生頻度は、分娩10,000当たり6.2であり、過去30年間にわたり低下傾向は認められていない<sup>8)</sup>。この状況から、妊娠可能な女性に、葉酸とNTDsに関する知識が十分に浸透していない可能性が考えられた。

最近の国民健康・栄養調査(2009年~2014年)<sup>9)</sup>によると、葉酸平均摂取量が成人女性の推奨量(240 $\mu$ g/日)[日本人の食事摂取基準(2015年版)]<sup>10)</sup>を下回っていること、また、今日の食生活の外部化、個々人の価値観の多様化などにより、食物摂取の個人間格差が拡大し、葉酸摂取不足者が増加することが懸念されている<sup>11-13)</sup>。

そこで、妊娠可能な年代の女性である管理栄養士養成課程の女子大学生を対象に、葉酸とNTDsの知識と葉酸摂取量および食物摂取構造などについて検討したので報告する。

## II. 方法

### 1. 対象者および調査期間

研究対象者は、某大学管理栄養士養成課程の女子大学生1年生154名(以下、新入生)、3・4年生209名(以下、上級生)、計363名で、調査期間は2014年7月(新入生)、2015年3月(上級生)である。新入生は、高校までの教育を受けた一般的な女性、上級生は栄養学の専門教育を受けた女性として募集した。

## 2. 調査内容

### 1) 対象者の特性

身体特性（年齢、身長、体重、BMI）および生活状況として、居住形態（一人暮らし／同居）、飲酒歴、喫煙歴について調べた。なお、身長、体重は実測し、他は調査票による集合自記式にて調査した。

### 2) 葉酸および NTDs に関する知識

調査内容は表 2 に示すように、葉酸、NTDs の知識・意識に関する 9 項目、サプリメントの使用状況に関する 2 項目、計 11 項目である。質問内容は①葉酸という栄養素を知っていますか（以下、「葉酸という栄養素」とする）②葉酸はどのような食品に含まれているか知っていますか「葉酸の供給源食品」。③必要な葉酸を食事から摂ることができていると思いますか「葉酸摂取量の自己評価」。④NTDs という病気を知っていますか「NTDs の知識」。⑤厚生労働省の NTDs 発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取を推奨する通知を知っていますか「厚生労働省からの通知」。⑥NTDs 発症リスク低減のために勧められている葉酸栄養補助食品の摂取量を知っていますか「厚生労働省からの通知量」。⑦NTDs 発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取の開始時期はいつだと思えますか「葉酸栄養補助食品の摂取開始時期」。⑧NTDs 発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取の終了時期はいつだと思えますか「葉酸栄養補助食品の摂取終了時期」。⑨NTDs を予防するために葉酸を摂取するなら、どのような摂

取方法を望みますか「葉酸の摂取方法」。⑩サプリメントを摂取していますか「サプリメントの摂取」。⑪サプリメントを摂取しない理由は何ですか「サプリメントを摂取しない理由」である。回答は、知識の有無を問う質問①、②、④、⑤、⑥およびサプリメントの摂取の有無を問う質問⑩は「はい」、「いいえ」の2段階、他の質問は3~6段階の選択肢を用意した。なお、質問項目⑩、⑪のサプリメントとは、錠剤、カプセル、粉末、顆粒状の形態の食品（普通の食品とは異なるもの）とし、栄養補助食品は、前述のサプリメントに加え、葉酸添加食品を含む。

### 3) 食事調査

食事調査は半定量食物摂取頻度調査票（Semi-quantitative food frequency questionnaire: FFQ）を用いた。当該のFFQは再現性・妥当性が確認されている<sup>14)</sup>。

FFQは、摂取頻度と1回の摂取量を問う調査票である。摂取頻度は1か月、1週間、1日当たりの摂取回数、摂取量については食品ごとに基準量が設定されており、基準量に対して、無し、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。50の栄養素等および19の食品群について、1日当たりの摂取量が出力されるが、ここでは、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。

#### 4) 食物摂取構造解析

食品群間の相互関係を包括的・構造的に検討するために、食品群を変量とした因子分析を行った。スクリー・プロットおよび因子寄与率より、重要な説明因子である第1因子と第2因子に対する各食品群の負荷量から、本対象者の食物摂取の特徴を把握し、葉酸供給源食品の位置づけおよび他の食品群との関係性について検討した。また、第1因子と第2因子に対する各個人の因子得点を用い、成人女性（非妊時）の葉酸の推奨量 240 $\mu$ g/日を基準に、葉酸高摂取群（推奨量以上の摂取者）と葉酸低摂取群（推奨量未満の摂取者）の2群に分けて表示した。

### 3. 統計解析

分布は  $\chi^2$  検定、平均値については  $t$  検定、一元配置分散分析を行い、中央値は Mann-Whitney  $U$  検定を行った。

17 食品群を用いた探索的因子分析において、因子抽出には最尤法（プロマックス回転）を用い、スクリー・プロットにより因子数を抽出した。食品群別摂取量は、体格や身体活動によるエネルギー摂取量の影響を除くためにエネルギー調整（1,000kcal 当たりの摂取量）を行い、正規分布に近似させるために  $\log_e$  変換した値を用いた。

統計ソフトは SPSS Statistics ver. 20 (IBM) を用い、有意水準は  $p < 0.05$ （両側）とした。

#### 4. 倫理的配慮

対象者には、調査の目的および調査方法、収集したデータは研究以外の目的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、途中で中止しても何ら不利益は生じ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、本研究は研究倫理委員会の承認（名古屋学芸大学承認 No.101）を受けた。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 対象者の特性

調査に参加した 363 名のうち、摂取エネルギー 700kcal/日以下の者 2 名、知識・意識に対する回答に欠損があった者 19 名および身長・体重のデータの無い者 5 名、計 26 名を除外し、337 名を用いて解析を行った。回収率は 100%、有効回答率は 92.8%であった。

対象者の身体特性と生活状況を表 1 に示した。年齢は全体で  $19.9 \pm 1.5$  歳（平均値  $\pm$  標準偏差）であった。BMI は全体で  $20.4 \pm 2.1 \text{ kg/m}^2$  であり、学年別では新入生 ( $20.1 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$ ) より上級生 ( $20.7 \pm 2.2 \text{ kg/m}^2$ ) が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。飲酒歴あり群は新入生 0%、上級生 72%、喫煙歴あり群は新入生 0%、上級生 11%で、いずれも上級生が新入生より高い割合であった ( $p < 0.001$ )。居住形態別では群間に差はなく、両群とも約 80%が同居であり、一人暮らしは約 20%であった。



## 2. 葉酸および NTDs に関する知識

「葉酸という栄養素」の知識あり群（表 2、4 では、はいと記載、以下同じ）は、新入生 70.3%、上級生 98.9%で、「葉酸の供給源食品」の知識あり群は、新入生 10.8%に対して、上級生は 81.0%で、いずれも上級生が有意に高い割合を示した（ $p<0.001$ ）（表 2）。「葉酸摂取量の自己評価」については、十分摂取していると回答した者は新入生 0.7%、上級生 2.1%と少なかったが、大体摂れていると回答した者はそれぞれ 40.5%、36.0%であった。しかし、その分布に有意差はなかった。

「NTDs の知識」のあり群は新入生 2.7%、上級生 93.7%であった（ $p<0.001$ ）。「厚生労働省からの通知」を知っていた者は、新入生 3.4%、上級生 55.0%（ $p<0.001$ ）あり、「厚生労働省からの通知量」を知っていた者は、新入生 1.4%、上級生 42.9%であった（ $p<0.001$ ）。

「葉酸栄養補助食品の摂取開始時期」（1 か月くらい前から）の正答率は、新入生 18.2%、上級生 68.8%（ $p<0.001$ ）で、「葉酸栄養補助食品の摂取終了時期」（妊娠 3 か月まで）の正答率は新入生 5.4%、上級生 28.0%（ $p<0.001$ ）で、いずれも上級生が知っている割合が高かった。

NTDs を予防するための「葉酸の摂取方法」に関する意識は、全体では食品から摂りたいが 61.2%、サプリメントからは 2.7%、食品とサプリメント両方から摂りたいが 27.8%、葉酸添加食品から摂りたいが 8.4%であった。学年別では新入生 73.0%、上級生 51.9%が食品から摂りたいと回答していた

( $p<0.001$ )。

現在の「サプリメントの摂取」は、新入生 12.2%、上級生 20.1%の利用率であった。「サプリメントを摂取しない理由」は、興味がないが新入生 62.1%、上級生 53.7%で、栄養は食品からが両群とも約 20%であった。いずれも両群間の分布に有意差は認められなかった。

### 3. 栄養素および食品群別摂取量

全体の栄養素等摂取量の平均値は、エネルギー  $1,557 \pm 416$  kcal/日、たんぱく質  $58.7 \pm 19.5$  g/日、脂質  $55.2 \pm 18.3$  g/日、炭水化物  $200.1 \pm 55.5$  g/日、葉酸  $238 \pm 104$   $\mu$ g/日であった(表 3)。

学年別に、エネルギーおよび栄養素摂取量を比較したが、いずれの栄養素(葉酸を含む)にも有意の差はなかった。居住形態別では、同居より一人暮らしの方が、エネルギー・たんぱく質・脂質( $p<0.001$ )、ビタミン B<sub>6</sub> およびビタミン B<sub>12</sub> ( $p<0.05$ ) 等の摂取量はいずれも有意に少なかった。なお、葉酸摂取量も一人暮らしの方が少なかったが統計的に有意ではなかった。

主な食品群別摂取量は、全体でめし類 250 (170.0-316.0) g/日 [中央値(四分位範囲)]、パン類・麺類(以下、パン類) 73.6 (48.6-105.7) g/日、豆類 30.4 (17.6-51.3) g/日、緑黄色野菜類 72.9 (51.4-107.9) g/日、その他の野菜類 97.1 (61.6-157.6) g/日、魚介類 37.5 (21.8-57.5) g/日、肉類 69.3 (48.0-96.4) g/日であった。学年別に比較すると、新入生は

卵類 ( $p<0.05$ )、嗜好飲料類 ( $p<0.001$ ) の摂取量、上級生はパン類 ( $p<0.001$ )、魚介類 ( $p<0.05$ ) の摂取量が多かった。それ以外の食品群の摂取量は両群間に差がなかった。居住形態別では、同居群がイモ類 ( $p<0.05$ )、豆類 ( $p<0.01$ )、その他の野菜類 ( $p<0.01$ )、藻類 ( $p<0.01$ )、魚介類 ( $p<0.001$ )、肉類 ( $p<0.01$ )、油脂類 ( $p<0.01$ ) の摂取量が有意に多かった。

#### 4. 葉酸および NTDs に関する知識と葉酸摂取量との関連

全体で葉酸摂取量との関連をみると「葉酸という栄養素」の項目で、はいと回答した群（知識あり群）が  $240 \pm 108 \mu\text{g}/\text{日}$ 、いいえと回答した群（知識なし群）では  $228 \pm 79 \mu\text{g}/\text{日}$  であり、「NTDs の知識」では、知識あり群が  $234 \pm 110 \mu\text{g}/\text{日}$ 、知識なし群は  $243 \pm 97 \mu\text{g}/\text{日}$  で、いずれも両群間に有意差はみられなかった。その他の知識に関する項目との関連性はなかった（表 4）。また、「葉酸摂取量の自己評価」の全体では、「十分摂れている」/「大体摂れている」/「摂れていない」の 3 群間の葉酸摂取量に有意差はみられなかった。以上のように、知識・意識と実際の摂取量の間には若干の乖離が観察された。

#### 5. 食物摂取構造解析

因子分析より抽出された第 1 因子と第 2 因子に対する各食品群の因子負荷行列を表 5 に示した。第 1 因子には、藻類、その他の野菜類、緑黄色野菜類、豆類、魚介類、イモ類に正の因子負荷（0.3 以上）が認められた。一般に、その他の野

菜類、緑黄色野菜類、藻類、いも類は副菜として使用され、魚介類、豆類は主菜として用いられるので、副菜・主菜をまとめて副食とした。対立する負の因子負荷（-0.3以下）を示す食品群はなかった。以上のことから、第1因子を「副食パターン」と命名した。第2因子では、パン類、魚介類に正の因子負荷（0.3以上）、めし類に負の因子負荷（-0.3以下）を示したので、「主食パターン」と命名した。第1、第2因子への寄与率は、それぞれ15.8%、9.6%であり、累積寄与率25.4%であった。

図1は、第1、第2因子に対する個人の因子得点をプロットした二次元空間図である。第1因子に藻類、その他の野菜類、緑黄色野菜、豆類、芋類、卵類などの葉酸供給源食品が大きく寄与していたので、葉酸高摂取群と葉酸低摂取群を分けて示した。なお、葉酸高摂取群は141名、葉酸低摂取群は196名であった。

全体では、第1因子の正の領域（第1、第4象限）に183名（54.3%）が、負の領域（第2、第3象限）に154名（45.7%）が分布していた。

表6に示すように、葉酸高摂取群は、第1因子の正の領域に141名中106名（75.2%）、負の領域に141名中35名（24.8%）が分布し、葉酸低摂取群は、正の領域に196名中77名（39.3%）、負の領域に196名中119名（60.7%）が分布していた（ $p < 0.001$ ）。

## 6. 葉酸高摂取群、葉酸低摂取群別の栄養素等および食品群別摂取量

表 7 では葉酸高摂取群（以下、高摂取群）の平均摂取量は、エネルギー  $1,793 \pm 424$  kcal/日、葉酸  $333 \pm 87$   $\mu$ g/日、葉酸低摂取群（以下、低摂取群）はそれぞれ  $1,387 \pm 317$  kcal/日、 $170 \pm 45$   $\mu$ g/日であり、低摂取群のエネルギー摂取量は高摂取群の約 77.4%であった（ $p < 0.001$ ）。エネルギー産生栄養素および他の栄養素摂取量も、低摂取群は高摂取群の 60~80%と有意に低値であった（ $p < 0.001$ ）。

葉酸供給源食品群の摂取量をみると、高摂取群は豆類 43.6（23.5-62.9）g/日、緑黄色野菜類 107.4（76.5-150.2）g/日、その他の野菜類 152.1（108.3-213.9）g/日、果実類 57.5（26.7-115.5）g/日であり、低摂取群は、高摂取群の 45~60%であり、有意に少なかった（ $p < 0.001$ ）。また、めし類、いも類、藻類、魚介類、肉類、卵類、乳類、油脂類、嗜好飲料類等も、低摂取群は高摂取群より、いずれも有意に少ない摂取量であった（ $p < 0.05$ ）。

エネルギー調整をしたビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> の摂取量は、高摂取群が低摂取群より有意に多く、めし類、パン類の摂取量は、粗データの結果とは逆に、低摂取群が高摂取群より有意に摂取量が多かった。

## IV. 考察

### 1. 葉酸および NTDs に関する知識

葉酸と NTDs については、厚生労働省の通知や日本人の食

事摂取基準（2015年版）<sup>10)</sup>に、「妊娠を計画している女性、または、妊娠の可能性のある女性は、NTDs のリスク低減のために、付加的に 400 $\mu$ g/日のプテロイルモノグルタミン酸の摂取が望まれる」と記載されている。

近い将来、食・栄養の専門家（管理栄養士）を目指し、また、妊婦となる可能性のある女子大学生のうち、新入生は、約 70% が「葉酸という栄養素」を知っていた。しかし、「NTDs の知識」および「厚生労働省からの通知」、「厚生労働省から通知量」については、ほとんど知らなかった。これは、一般の女性と同等の知識レベルと推測された。一方、ほとんどの上級生は「葉酸という栄養素」の知識（98.9%）および「NTDs の知識」（93.7%）は持っていた。「葉酸という栄養素」を知っていた者は、篠崎、佐藤ら医療系女子学生（看護師を含むは 90%以上）<sup>15)</sup>、管理栄養士・栄養士（100%）<sup>16)</sup>を対象とした先行研究と同程度であった。なお、「NTDs の知識」のある者は、本研究で 53.7%、医療系学生で 30.0%<sup>15)</sup>、「厚生労働省からの通知」を知っている者は、本研究で 32.3%、医療系学生で 26.9%、「厚生労働省からの通知量」について知っている者は、本研究で 24.6%、管理栄養士・栄養士で 17.4%、学生（管理栄養士・看護師養成校）で 11.4%<sup>16)</sup>であり、NTDs の関連の知識は本研究・先行研究とも低い結果であった。「葉酸栄養補助食品の摂取開始時期」「葉酸栄養補助食品の摂取終了時期」を知っている者は、新入生は 18%、6%で、上級生 68%、28%であった。上級生の開始時期、終了時期に関する正答率は、先行研究（管理栄養士・栄養士）<sup>16)</sup>のそれぞれ 66.7%、

33.3%とほぼ同じであった。この新入生と上級生の葉酸、NTDsに関する知識の調査結果は、栄養学系の学生として一定の教育効果が観察された。

葉酸およびNTDsに関する知識・意識と葉酸摂取量との関連は、学年別、居住形態別に有意差は認められなかった。葉酸摂取量の自己評価では、「摂取できている（十分にあるいは大体摂れている）」と「摂れていない」と回答した群間に摂取量の差はなく、自己評価と実際の摂取量の間乖離がみられた。この正確な理由は、本研究では明らかにできないが、若い年齢層では、ほとんど健康上の問題を感じるものがなく、この世代（10~20代）の栄養問題として、葉酸が注目されることがあまりなかったために、上記のような自己判断をしているのではないかと考えられる。

また、葉酸およびNTDsに関する知識を持つ上級生においても、大学生であり、妊娠する可能性が低く、妊娠や胎児の健康にさほど関心がないこと、NTDsより、糖尿病や腎臓病など、より一般的疾患の機序や食事療法に注目しており、葉酸が必要な栄養素であると知っていても、葉酸摂取に関心を持ち、葉酸摂取を増加させるような行動変容・食生活変容を起こすほど強いインパクト・緊迫感がないことが伺えた。

なお、佐藤ら<sup>16)</sup>の報告によると、妊婦の知識は、葉酸という栄養素を知っている96.2%、NTDsの勧告を知っている者は49%、葉酸摂取の開始時期70.2%、終了時期48.1%、栄養素名の知識以外は、管理栄養士・栄養士、医療系学生より高い値が報告されているが、妊婦当事者として十分な知識レベ

ルであるとは言えなかった。

## 2. 栄養補助食品の利用

NTDs のリスク低減を目的とした葉酸摂取方法については、食品から摂りたいが全体で 61.2%、何らかのかたちで栄養補助食品を利用するが 38.9%であった。佐藤らの報告では、管理栄養士・栄養士の栄養補助食品に対する態度は、積極的利用 11.6%、たまに利用 62.3%であった<sup>16)</sup>。最近のわが国の医療現場において、妊娠初期の葉酸栄養補助食品（主にサプリメント）の利用は、ここ 10 年で増加し、60~70%に至っている。しかし、妊娠 1 か月以上前からの摂取は 20~30%と低かった<sup>17-18)</sup>。

一方、米国、英国をはじめ欧米における妊娠初期の葉酸サプリメントの利用は 60~80%<sup>19-22)</sup>、妊娠前からの摂取は 10~50%と日本とほぼ同じ程度に低い利用率であった<sup>19-24)</sup>。妊娠前のサプリメント利用率の低さは、胎児の神経管が受胎後約 28 日で閉鎖することを考えると大きな問題である。米国、チリなどでは、サプリメントによる葉酸摂取がなかなか普及しないこと、また、動脈硬化や認知症に対する葉酸の効用<sup>25-26)</sup>などを考慮し、基本的食品である穀類に葉酸を添加することを義務付け、国民の葉酸摂取量の増加を図っている。しかし、最近、これらの国々で、サプリメントによる葉酸の過剰摂取に関する報告が散見されており、摂取不足と過剰摂取の両面の健康障害をはらんでいることが指摘されている<sup>19-27)</sup>。

NTDs のリスク低減に関する葉酸は通常の食事性葉酸に加



えて、プテロイルモノグルタミン酸（添加物）400 $\mu$ g/日の摂取が推奨されている。食事性葉酸（ポリグルタミン酸型）の相対生体利用率は約50%<sup>28)</sup>とみなされており、プテロイルモノグルタミン酸400 $\mu$ g/日を摂取するには、食品からその2倍の食事性葉酸800 $\mu$ g/日を摂取しなければならず、食事からは到達できない量である。国立健康・栄養研究所では、摂取方法として、まず、食事の充実、次に葉酸を添加した特別用途食品、栄養機能食品や加工食品などの利用、それでも不足していた場合にはサプリメントの利用という順番で推奨している<sup>29)</sup>。さらに、サプリメントを利用したい場合は、自己判断せずに医師や管理栄養士に相談するように勧めている<sup>29)</sup>。

妊婦が意識的に葉酸摂取をした理由として、医師・管理栄養士などの医療系専門家のアドバイス（妊娠前約15%、妊娠後約25%）より、マスメディア・インターネット（妊娠前約25%、妊娠後約60%）の情報などを挙げていた<sup>18)</sup>。また、サプリメントは医薬品ではないため、安全性と品質の担保がなされていないものもあるなどの問題を挙げている<sup>30)</sup>。管理栄養士・栄養士は、栄養教育・指導者として、NTDsのリスク低減を目的とした葉酸摂取の意義や摂取方法・時期の重要性を認識しなければならない。

### 3. 栄養素および食品群別摂取量

今回の研究で得られたFFQによる葉酸摂取量（238 $\pm$ 104 $\mu$ g/日）について、食事摂取基準（2015年版）<sup>10)</sup>に準拠して考慮すると、成人女性の推定平均必要量（200 $\mu$ g/日）<sup>10)</sup>を

下回る不足の者の割合は約 40%であった。同年代の女子の国民健康栄養調査（2009 年～2014 年まで）<sup>9)</sup> は平均  $247 \pm 14.5 \mu\text{g}/\text{日}$  であり、同じような FFQ による調査では、篠崎<sup>15)</sup> らは  $299 \pm 143 \mu\text{g}/\text{日}$ （2009 年）、松本<sup>31)</sup> らは  $208 \pm 87 \mu\text{g}/\text{日}$ （2012 年）と報告している。連続 3 日間の秤量記録法では、近藤<sup>32)</sup> らは  $217 \mu\text{g}/\text{日}$ （2003 年）、平岡<sup>33)</sup> らは  $253 \pm 141 \mu\text{g}/\text{日}$ （2011 年）、 $193 \pm 97 \mu\text{g}/\text{日}$ （2012 年）であると報告している。以上の摂取量の報告にはバラツキがあるが、本研究の結果は先行研究のおおむね平均的レベルにあり、本対象者は同年代の女性とほぼ同等な摂取状況であるとみなせよう。

葉酸の主な供給源食品として、野菜類（特に緑黄色野菜類）、豆類、果実類、レバー、緑茶など<sup>34)</sup> が挙げられるが、本対象者は緑黄色野菜類  $72.9$ （ $51.4-107.9$ ） $\text{g}/\text{日}$ 、その他の野菜類  $97.1$ （ $61.6-157.6$ ） $\text{g}/\text{日}$ 、計  $177.6$ （ $123.4-266.0$ ） $\text{g}/\text{日}$  摂取しており、健康日本 21<sup>35)</sup> で目標とされる野菜  $350\text{g}/\text{日}$  の約  $1/2$  の摂取量であった。大豆類は  $30.4$ （ $17.6-51.3$ ） $\text{g}/\text{日}$  で目標量（ $100\text{g}/\text{日}$ ）の約 30%、果実類は  $39.4$ （ $17.0-76.9$ ） $\text{g}/\text{日}$  で目標量（ $200\text{g}/\text{日}$ ）の約 40%であり、葉酸が多く含まれている食品群である野菜類、豆類、果実類の摂取が十分であるとは言えなかった。

#### 4. 食物摂取構造解析

女子大学生の食生活を説明する第 1 因子として「副食パターン」、第 2 因子として「主食パターン」が抽出された。「副食パターン」に関連した食品群には、葉酸供給源食品（野菜

類、豆類、果実類)、藻類、いも類、魚介類があり、これらの食品群は、一緒に摂取されることを示唆している。女子大学生全体の食生活の特徴を表す第 1 因子に葉酸供給源食品が抽出されていることは興味深い。なお、本研究結果は、池田ら<sup>36)</sup>の女子短期大学生の食生活を対象とした主成分分析においての、第 1 因子「主食型か副食型かを示す」、第 2 因子「食生活が伝統型か欧米型かを示す」とした報告と類似していた。

個人の因子得点に準拠した二次元空間図において、葉酸高摂取群は第 1 因子の正の領域に、低摂取群は負の領域にその多くが分布していた。低摂取群は、エネルギーならびにほとんどの栄養素において、高摂取群の 50~80%であり有意に少ない摂取量であった。食品群別摂取量をみると、低摂取群では穀類以外の主要な食品群において、高摂取群より有意に少なかった。低摂取群は成人女性として、葉酸だけでなくエネルギーおよび栄養素、食品群も十分に摂取されておらず、食事の絶対量が少ないことが示された。逆に、高摂取群は、葉酸をはじめ、エネルギーおよびその他の栄養素について、良好な摂取量であった。しかし、高摂取群においても主な葉酸供給源食品群の摂取量は、健康日本 21 が示す目標量にいずれも達していなかった。高摂取群の平均葉酸摂取量が  $333 \pm 87 \mu\text{g}/\text{日}$  であったことを考慮すると、健康日本 21 が推奨する供給源食品群の目標量を摂取すれば、妊娠期の巨赤芽球性貧血を予防するための推奨量  $480 \mu\text{g}/\text{日}$ <sup>10)</sup> は達成可能であることが示唆された。平岡<sup>27)</sup>らも女子栄養大学方式「4つの食品群点数法」を学習させ、食事を摂った学生の葉酸摂取量は  $465 \pm$

117 $\mu$ g/日であったと報告している。

## 5. 栄養教育の重要性

NTDs は妊娠の初期に生ずるので、妊娠前の葉酸の栄養状態が重要である。しかし、一般に妊娠に気づくのは妊娠 3~4 か月ころである。また、いつ妊娠するか正確に予知できない。本研究、妊婦（先行研究）<sup>18)</sup>は NTDs、葉酸に関する知識が十分ではなかったことから、中学・高等学校における健康・栄養教育および成人女性を対象とした地域保健活動の一つとして、NTDs に関する正しい知識、中でも NTDs 予防は妊娠前の葉酸を含めた栄養状態が重要なことに関する積極的な教育、知識の普及・啓発が必要であることが示唆された。

また、健康・栄養の専門家・指導者である管理栄養士・栄養士、教員（家庭科、保健体育）、医療従事者（医師、看護師、保健師）等が、葉酸と NTDs の関連および NTDs のリスク低減に対する食事性葉酸と葉酸栄養補助食品に関する正しい理解と知識を持ち、栄養教育・指導を行うことが重要である。

さらに、葉酸に関連する特定保健用食品（疾病リスク低減表示を含む）はほとんどなく、安全性と品質の担保（成分や原材料など）がされている葉酸栄養補助食品の情報提供が望まれる。

## 6. 本研究の限界

本研究の限界として、対象者が女子大学生で、妊娠する可能性が低く当事者感・緊迫感がなく、妊娠を計画している女

性を対象とした場合とは異なる結果になる可能性がある。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。また、食事調査が FFQ のため、食品・栄養摂取量の推定、料理・食品の組み合わせなど、食生活の検討が必ずしも十分とは言えなかったことなどが挙げられる。

## V 結語

女子大学生（新入生と上級生）を対象に、葉酸・NTDs に関する知識と葉酸摂取量、食物消費構造について検討した。

新入生は葉酸の栄養素名は知識があったが、NTDs という病気については、ほとんど知識がなかった。上級生は、NTDs という病気の知識はあるものの、予防のための適切な葉酸摂取量、摂取時期については、知っていた者は約 50%であった。葉酸摂取量は、平均 238 $\mu$ g/日、不足者は約 40%であり、葉酸および NTDs に関する知識と葉酸摂取量には関連がなかった。また、食物消費構造パターンは、推奨量以上の摂取者は葉酸の供給源食品ばかりではなく様々な食品をとっており、食事全体の質（食品バランス）が重要であることを示した。NTDs の発症率が減少傾向にないことを考えると、健康・栄養教育の専門家を目指す者として、NTDs リスク低減に対する食事（葉酸を含む）および葉酸栄養補助食品に関する正しい知識と理解の必要性が示唆された。

## 参考文献

- 1) MRC Vitamin Study Research group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study, *Lancet* 1991 ; 338 : 131- 137
- 2) 厚生労働省. 厚生労働省児童家庭局母子保健課, 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について (2000年)  
[http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1\\_18.html](http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1_18.html)  
(2000), (Accessed on Sep.15, 2016)
- 3) Food and Nutrition Board Institute of Medicine. A report of the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes and its panel on folate, other B vitamins, and choline and subcommittee on upper reference levels of nutrients. The National Academies Press, Washington, D.C., USA 1998; 11- 12
- 4) Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid, *Fed Regist* 1996; 61, 8781- 8807
- 5) Stevenson RE, Allen WP, Pai GS, et al. Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States, *Pediatrics* 2000; 106: 677- 683
- 6) 住吉好雄, 竹下研三, 中川英昭. 先天異常モニタリング等に

関する研究,厚生科学研究(子ども家庭総合研究事業) 総括研究報告書(1999)

- 7) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention, N Engl J Med 1999; 341: 1485- 1490
- 8) 日本産婦人科医会.平成 21 年度外表奇形等統計調査,国際クリアリングハウス先天異常監視研究機構日本支部, 横浜(2010)
- 9) 厚生労働省.平成 26 年国民健康栄養調査の結果(2015)  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>,  
(Accessed on Sep.15,2016)
- 10) 厚生労働省.日本人の食事摂取基準 2015 年版, 第一出版  
2015: 215- 219
- 11) 長島和子, 海老原純子. 大学生の健康と食生活に関する意識と実態,千葉大学教育部研究紀要 2002; 51: 301- 306
- 12) 鈴木節子, 塚原丘美, 服部健治. 女子学生と地域中高女性の食事摂取量調査 —食事バランスガイドを用いた評価—, 名古屋学芸大学健康・栄養研究所年報 2008; 2: 81- 88
- 13) 広井祐三, 安里龍右, 城田知子 他. 日本 7 地域における女子学生の摂取食品からみた食生活,日本栄養・食糧学会誌 1996; 49: 168- 179
- 14) 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

- 15) 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; 53: 13- 17
- 16) 佐藤陽子, 中西明子, 横谷 馨倫 他. 葉酸およびそのサプリメント摂取に対する妊婦,管理栄養士・栄養士,管理栄養士・看護師養成校の学生の認識, 栄養学雑誌 2013; 71: 204- 212
- 17) 平原史樹.本邦における先天異常モニタリングによる先天異常発生要因の分析とその対応に関する研究.厚生労働科学研究 (2010)
- 18) 佐藤陽子, 中西朋子, 千葉剛他.妊婦における神経管閉鎖障害リスク低減のための folic acid 摂取行動に関する全国インターネット調査,日本公衆衛生雑誌 2014; 61: 321- 332
- 19) Hoyo C, Murtha AP, Schildkraut JM, et al. Folic acid supplementation before and during pregnancy in the Newborn Epigenetics Study (NEST). *BMC Public Health* 2011; 21:11-46. doi: 10.1186/1471-2458-11-46  
(Accessed on Sep.15,2016)
- 20) Brough L, Rees GA, Crawford MA, et al. Social and ethnic differences in folic acid use preconception and during early pregnancy in the UK: effect on maternal folate status. *J Hum Nutr Diet* 2009; 22:100-7. doi: 10.1111/j.1365-277X.2008.00936.x.
- 21) Forster DA, Wills G, Denning A, et al. The use of folic



acid and other vitamins before and during pregnancy in a group of women in Melbourne, Australia. *Midwifery* 2009; 25:134- 146

- 22) McNulty B, Pentieva K, Marshall B, et al. Women's compliance with current folic acid recommendations and achievement of optimal vitamin status for preventing neural tube defects. *Hum Reprod* 2011; 26:1530-1536. doi: 10.1093/humrep/der078
- 23) Bestwick JP, Huttly WJ, Morris JK, et al. Prevention of neural tube defects: a cross-sectional study of the uptake of folic acid supplementation in nearly half a million women. *PLoS One* 2014;19: 9, e89354. doi: 10.1371 (Accessed on Sep.15, 2016)
- 24) Nilsen RM, Leoncini E, Gastaldi P, et al. Prevalence and determinants of preconception folic acid use. an Italian multicenter survey 2016;13: 42-65. doi: 10.1186/s13052-016-0278-z (Accessed on Sep.15, 2016)
- 25) Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, et al. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events. The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 2001;103:2674-2680
- 26) Weng LC, Yeh WT, Bai CH, et al. Is ischemic stroke risk related to folate status or other nutrients correlated with folate intake? *Stroke* 2008; 39:

3152-3158

- 27) Gómez MF, Field CJ, Olstad DL, et al. Use of micronutrient supplements among pregnant women in Alberta: results from the Alberta Pregnancy Outcomes and Nutrition (APrON) cohort. *Matern Child Nutr* 2015; 11: 497~510. doi: 10.1111/mcn.12038
- 28) 福渡努, 柴田克己. 遊離型ビタミンに対する食事の中のB群ビタミンの相対的利用率, *日本家政学会誌* 2008; 59: 403-410
- 29) 国立健康・栄養研究所. 「健康食品」の安全性・有効性情報 (2016)<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail1550.html>. (Accessed on Dec.5)
- 30) 小林千恵, 横山玲子, 高橋一則. 栄養補助食品(サプリメント)の成分および品質等について, *静岡県環境衛生科学研究所報告* 2010; 53: 45-48
- 31) 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 Nutr Res* 2012; 29: 32-35
- 32) 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, *日本泌尿器科学会雑誌* 2003; 94: 551-559
- 33) 平岡真実. 若年女性の葉酸栄養状態, *厚生労働省報告* (2012)
- 34) Imaeda N, Goto C, Tokudome Y, et al. Folate intake

and food sources in Japanese female dietitians, Environ  
Health Prev Med 2002;7: 156-161

35) 厚生労働省.健康日本 21, 栄養・食生活,  
<http://www.kenkounippon21.gr.jp>. (Accessed on Sep 16,  
2016)

36) 池田 順子, 浅野 弘明, 永田 久紀. 女子学生  
の食生活の実態(第1報) - 栄養摂取状況に関  
する居住形態と意識調査からの検討 -, 栄養学雑誌  
1983; 41: 103- 116

図表

表 1. 身体特性および生活状況

身体特性	全体 (n=337)		新入生 (n=148)		上級生 (n=189)		$p^{2)}$	
	平均値	SD <sup>1)</sup>	平均値	SD	平均値	SD		
年齢 (歳)	19.9	1.5	18.3	0.5	21.1	0.6	<0.001	
身長 (cm)	158.0	5.4	157.8	5.5	158.2	5.3	ns	
体重 (kg)	51.1	6.4	50.2	6.1	51.7	6.5	0.026	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.4	2.1	20.1	1.9	20.7	2.2	0.016	
生活状況	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
居住形態	一人暮らし	64	19.3	31	21.1	33	17.9	ns
	同居	264	79.8	113	76.9	151	82.1	
	その他	3	0.9	3	2.0	0	0.0	
	(回答無し)	(6)		(1)		(5)		
飲酒歴	有り	135	40.2	0	0.0	135	71.8	<0.001
	無し	201	59.8	148	100.0	53	28.2	
	(回答無し)	(1)				(1)		
喫煙歴	有り	22	6.6	0	0.0	21	11.2	<0.001
	無し	313	93.4	148	100.0	166	88.8	
	(回答無し)	(2)				(2)		

<sup>1)</sup> 標準偏差

<sup>2)</sup> 身体特性は  $t$  検定、生活状況は  $\chi^2$  検定

表2. 葉酸、神経管閉鎖障害(NTDs)に関する知識

項目	回答肢	全体 (n=337)		新入生 (n=148)		上級生 (n=189)		p <sup>1)</sup>
		n	%	n	%	n	%	
1. 葉酸について								
① 葉酸という栄養素を知っていますか。 (葉酸という栄養素)	はい	291	86.4	104	70.3	187	98.9	<0.001
	いいえ	46	13.6	44	29.7	2	1.1	
② 葉酸はどのような食品に含まれているか 知っていますか。 (葉酸の供給源食品)	はい	169	50.1	16	10.8	153	81.0	<0.001
	いいえ	168	49.9	132	89.2	36	19.0	
③ 必要な葉酸を食事から摂ることができている と思いますか。 (葉酸摂取量の自己評価)	十分摂れている	5	1.5	1	0.7	4	2.1	ns
	大体摂れている	128	38	60	40.5	68	36.0	
	摂れていない	204	60.5	87	58.8	117	61.9	
2. NTDs について								
④ NTDsという病気を知っていますか。 (NTDsの知識)	はい	181	53.7	4	2.7	177	93.7	<0.001
	いいえ	156	46.3	144	97.3	12	6.3	
⑤ 厚生労働省のNTDs発症リスク低減のための葉酸 栄養補助食品の摂取を推奨する通知を知っ ていますか。 (厚生労働省からの通知)	はい	109	32.3	5	3.4	104	55.0	<0.001
	いいえ	228	67.7	143	97	85	45.0	
⑥ NTDs発症リスク低減のために勧められている 葉酸栄養補助食品の摂取量を知っています か。 (厚生労働省からの通知量)	知っている	83	24.6	2	1.4	81	42.9	<0.001
	知らない	254	75.4	146	98.6	108	57.1	
⑦ NTDs発症リスク低減のための葉酸栄養補助食 品の摂取の開始時期はいつだと思いますか。  (葉酸栄養補助食品の摂取開始時期)	妊娠1か月くらい前	157	46.6	27	18.2	130	68.8	<0.001
	妊娠直後	21	6.2	10	6.8	11	5.8	
	妊娠3か月	44	13.1	14	9.5	30	15.9	
	妊娠中期(4~7か月)	25	7.4	8	5	17	9.0	
	妊娠後期(7か月以降)	1	0.3	1	1	0	0.0	
	知らない	89	26.4	88	60	1	0.5	
⑧ NTDs発症リスク低減のための葉酸栄養補助食 品の摂取の終了時期はいつだと思いますか。  (葉酸栄養補助食品の摂取終了時期)	妊娠1か月くらい前	23	6.8	4	2.7	19	10.1	<0.001
	妊娠直後	26	7.7	8	5.4	18	9.5	
	妊娠3か月	61	18.1	8	5.4	53	28.0	
	妊娠中期(4~7か月)	57	16.9	11	7.4	46	24.3	
	妊娠後期(7か月以降)	64	19	14	9.5	50	26.5	
	知らない	106	31.5	103	69.6	3	1.6	
⑨ NTDsを予防するために、葉酸を摂取するな ら、どのような摂取方法を望みますか。  (葉酸の摂取方法)	葉酸を多く含む食品から	205	61.2	108	73.0	97	51.9	0.001
	サプリメントから摂りたい	9	2.7	4	2.7	5	2.7	
	食品とサプリメント、両方から摂りたい	93	27.8	27	18.2	66	35.3	
	葉酸添加食品から摂りたい	28	8.4	9	6.1	19	10.2	
	(無回答)	(2)				(2)		
3. 現在のサプリメントの利用について								
⑩ サプリメントを摂取していますか。  (サプリメントの摂取)	摂取している	56	16.6	18	12.2	38	20.1	ns
	摂取していない	281	83.4	130	87.8	151	79.9	
⑪ サプリメントを摂取しない理由は何ですか。  (サプリメントを摂取しない理由)	栄養は食品から	59	21.0	25	18.9	34	22.8	ns
	お金が高いから	45	16.0	18	13.6	27	18.1	
	副作用があるから	1	0.4	1	0.8	0	0	
	サプリメントに興味がない	162	57.7	82	62.1	80	53.7	
	その他	14	5.0	6	4.5	8	5.4	
	(無回答)	(56)		(16)		(40)		

1)  $\chi^2$ 検定

表3. 栄養素等および食品群別摂取量

栄養素等/日	全体 (n=337)				学年別				居住形態別						
	新入生 (n=148)		上級生 (n=189)		一人暮らし (n=64)		同居 (n=264)		新入生 (n=148)		上級生 (n=189)		同居 (n=264)		
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	
総エネルギー (kcal)	1,557	416	1,552	374	1,561	448	1,409	450	1,592	404	0.002				
たんぱく質 (g)	58.7	19.5	57.4	17.4	59.7	21.0	50.5	19.4	60.7	19.3	<0.001				
脂質 (g)	55.2	18.3	55.0	17.8	55.3	18.7	46.8	16.1	57.3	18.3	<0.001				
炭水化物 (g)	200.1	55.5	200.8	48.4	199.6	60.6	190.1	63.3	202.4	53.7	ns				
ビタミンB <sub>6</sub> (mg)	1.0	0.6	0.9	0.3	1.0	0.8	0.8	0.4	1.0	0.7	0.011				
ビタミンB <sub>12</sub> (μg)	4.2	2.4	4.0	2.3	4.4	2.5	3.1	2.1	4.5	2.4	<0.001				
葉酸 (μg)	238	104	245	97	233	109	215	113	243	102	ns				
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)	中央値	(四分位範囲)	中央値	(四分位範囲)	中央値	(四分位範囲)	p <sup>1)</sup>
めし類	250.0	(170~316.0)	250.0	(180.0~330.0)	231.4	(150.0~305.0)	215.0	(130.0~290.0)	250.0	(170.0~318.0)	ns				
パン類	73.6	(48.6~105.7)	65.7	(43.0~95.7)	82.9	(51.1~121.4)	77.1	(40.7~132.0)	72.5	(48.6~102.1)	ns				
いも類	19.3	(10.7~32.1)	21.4	(12.8~32.9)	16.1	(9.6~30.4)	13.9	(5.5~25.0)	19.6	(10.7~33.6)	0.021				
砂糖・甘味料	0.0	(0.0~0.4)	0.0	(0.0~0.7)	0.0	(0.0~0.4)	0.0	(0.0~0.4)	0.0	(0.0~0.5)	ns				
豆類	30.4	(17.6~51.3)	34.0	(20.0~51.1)	28.6	(17.1~51.4)	22.1	(9.5~38.9)	34.0	(19.5~52.7)	0.005				
種実類	0.1	(0.0~0.9)	0.1	(0.0~1.1)	0.2	(0.0~0.8)	0.1	(0.0~0.6)	0.1	(0.0~1.0)	ns				
緑黄色野菜類	72.9	(51.4~107.9)	73.7	(54.1~102.9)	72.5	(48.6~115.6)	64.2	(39.5~100.3)	74.9	(52.2~112.5)	ns				
その他の野菜類	97.1	(61.6~157.6)	93.4	(60.6~159.4)	97.9	(62.5~157.2)	72.1	(45.4~109.1)	104.3	(63.6~167.7)	0.005				
果物類	39.4	(17.0~76.9)	38.7	(16.7~78.5)	40.2	(17.6~76.5)	34.1	(11.6~78.1)	41.1	(19.4~75.9)	ns				
藻類	4.3	(1.8~9.6)	4.6	(1.9~10.3)	3.6	(1.6~8.4)	2.3	(0.5~5.0)	4.5	(1.8~10.1)	0.005				
魚介類	37.5	(21.8~57.5)	35.0	(18.9~49.2)	41.4	(23.1~61.9)	24.7	(7.6~42.6)	40.5	(26.4~61.3)	<0.001				
肉類	69.3	(48.0~96.4)	67.9	(47.3~99.1)	71.8	(48.9~96.4)	56.8	(38.7~78.4)	72.9	(51.6~105.0)	0.003				
卵類	25.0	(20.0~50.0)	39.3	(25.0~50.0)	25.0	(10.7~50.0)	25.0	(25.0~47.3)	31.4	(19.6~50.0)	ns				
乳類	173.2	(84.6~260.3)	175.2	(75.4~278.0)	168.6	(97.4~250.5)	147.1	(78.6~231.0)	172.3	(84.1~265.7)	ns				
油脂類	15.5	(10.8~21.1)	16.6	(11.3~23.5)	14.9	(10.4~19.7)	14.1	(8.1~18.1)	15.7	(11.4~22.8)	0.004				
菓子類	29.3	(15.1~48.1)	29.5	(16.0~47.6)	29.3	(14.9~48.2)	25.2	(11.9~41.8)	30.1	(15.3~48.5)	ns				
嗜好飲料類	112.5	(50.0~250.0)	150.0	(79.0~320.3)	87.5	(35.7~182.1)	134.8	(57.9~238.9)	111.6	(50.0~250.0)	ns				

1) 栄養素はt検定

2) 食品群はMann-Whitney u検定

表4. 葉酸・神経管閉鎖障害 (NTDs) に関する知識と葉酸摂取量との関連

項目	回答肢	学年別																			
		全体 (n=337)				新入生 (n=148)			上級生 (n=189)			一人暮らし (n=64)		同居 (n=264)							
		n	平均値	SD <sup>1)</sup>	p <sup>2)</sup>	n	平均値	SD	p <sup>2)</sup>	n	平均値	SD	p <sup>2)</sup>	n	平均値	SD	p <sup>2)</sup>				
① 葉酸という栄養素	はい	291	240	108	ns	104	253	103	ns	187	232	110	ns	54	218	116	ns	231	245	106	ns
	いいえ	46	228	79		44	225	79		2	286	37		10	198	100		33	231	69	
② 葉酸の供給源食品	はい	169	242	111	ns	16	276	94	ns	153	239	112	ns	32	224	126	ns	134	248	108	ns
	いいえ	168	234	97		132	241	97		36	208	95		32	207	100		130	239	97	
③ 葉酸摂取量の自己評価	十分摂れている	5	191	89	ns	1	285		ns	4	167	83	ns					5	191	89	ns
	大体摂れている	128	241	112		60	241	87		68	242	130		20	247	125	ns	102	240	112	
④ NTDsの知識	摂れていない	204	237	100		87	246	104		117	230	96		44	201	105		157	247	97	
	はい	181	234	110	ns	4	185	29	ns	177	235	111	ns	31	221	127	ns	145	237	108	ns
⑤ 厚生労働省からの通知	いいえ	156	243	97		144	246	98		12	199	78		33	210	100		119	251	95	
	はい	109	241	118	ns	5	266	45	ns	104	240	120	ns	14	222	149	ns	93	244	114	ns
⑥ 厚生労働省からの通知量	いいえ	228	236	97		143	244	98		85	224	95		50	213	102		171	243	96	
	知っている	83	242	116	ns	2	186	51	ns	81	243	117	ns	9	194	86	ns	74	248	119	ns
	知らない	254	237	100		146	245	97		108	225	103		55	219	117		190	242	96	

1) 平均葉酸摂取量±標準偏差 (μg)/日

2) 群間比較は t 検定、3群間比較は一元配置分散分析

表5 因子負荷行列

変数名	第1因子	第2因子	共通性
	副食パターン	主食パターン	
藻類	<b>0.589</b>	-0.107	0.320
その他の野菜類	<b>0.586</b>	-0.107	0.316
緑黄色野菜類	<b>0.579</b>	0.097	0.379
豆類	<b>0.504</b>	-0.230	0.235
魚介類	<b>0.380</b>	<b>0.399</b>	0.398
いも類	<b>0.376</b>	0.227	0.246
パン類	-0.290	<b>0.568</b>	0.155
油脂類	-0.044	0.279	0.060
肉類	0.112	0.227	0.026
果実類	0.275	0.209	0.080
嗜好品類	-0.042	0.146	0.022
菓子類	-0.113	0.144	0.008
砂糖・甘味料	-0.020	0.091	0.019
卵類	0.096	0.088	0.072
種実類	0.254	-0.041	0.115
乳類	0.169	-0.074	0.023
めし類	-0.073	<b>-0.309</b>	0.305
固有値	3.338	1.607	
寄与率 (%)	15.8	9.6	25.4

因子抽出法：最尤法 プロマックス回転による

因子負荷|0.3|以上を太字とした

解析の際にはエネルギー1,000kcal当たりの食品群別摂取量の $\log_e$ 変換値を用いた。



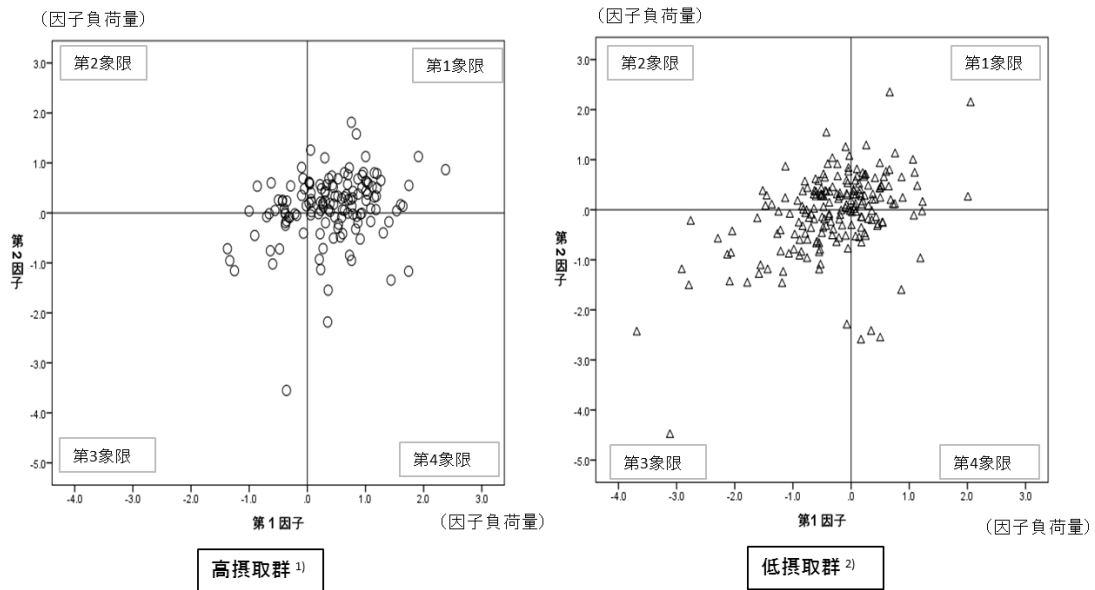


図1 抽出因子が葉酸摂取量に及ぼす影響

解析はエネルギー1,000kcal当たりの食品群摂取量のlog<sub>e</sub>変換値を用いた。

- 1) 葉酸推奨量240μg/日以上
- 2) 葉酸推奨量240μg/日未満

表6 第1因子における高摂取群、低摂取群の各象限の分布

	高摂取群(240μg以上)	低摂取群(240μg未満)	<i>p</i>
正の領域: 1、4象限 (n)	106	77	0.001
負の領域: 2、3象限 (n)	35	119	

χ<sup>2</sup>検定

表7. 葉酸高摂取群、葉酸低摂取群別の栄養素・食品群別摂取量の比較  
相データ

栄養素等	高摂取群 (n=141)			低摂取群 (n=196)			エネルギー調整値 (1,000kcal当たり)			p <sup>1)</sup>	
	平均値	SD	(四分位範囲)	平均値	SD	(四分位範囲)	平均値	SD	(四分位範囲)		
総エネルギー (kcal)	1,793	424	(185.0~330.0)	1,387	317	(150.0~290.0)	39.5	5.2	(113.1~178.8)	<0.001	
たんぱく質 (g)	70.9	20.2	(51.4~108.2)	50.0	13.4	(44.6~104.8)	35.9	5.3	(29.2~63.0)	<0.001	
脂質 (g)	64.5	18.7	(14.3~36.3)	48.5	14.7	(7.5~25.0)	126.7	14.9	(8.2~20.8)	<0.001	
炭水化物 (g)	226.3	55.9	(0.0~0.9)	181.3	47.0	(0.0~0.4)	0.7	0.1	(0.0~0.4)	<0.001	
ビタミンB <sub>6</sub> (mg)	1.3	0.4	(23.5~62.9)	0.8	0.7	(14.0~39.0)	3.0	1.2	(13.7~35.4)	<0.001	
ビタミンB <sub>12</sub> (µg)	5.4	2.8	(0.1~1.1)	3.4	1.6	(0.0~0.6)	193	55	(0.0~0.6)	<0.001	
葉酸 (µg)	333	87	(76.5~150.2)	170	45	(39.5~78.5)	126	37.0	(10.4~28.6)	<0.001	
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)	中央値	(四分位範囲)	p <sup>2)</sup>
めし類	260.0	(185.0~330.0)	227.5	(150.0~290.0)	145.4	(113.1~178.8)	161.0	(112.0~214.8)	0.016		
パン類	75.7	(51.4~108.2)	72.9	(44.6~104.8)	42.6	(29.2~63.0)	54.7	(34.9~74.9)	0.003		
いも類	25.0	(14.3~36.3)	14.3	(7.5~25.0)	14.5	(8.2~20.8)	10.2	(5.9~18.8)	0.005		
砂糖・甘味料	0.0	(0.0~0.9)	0.0	(0.0~0.4)	0.0	(0.0~0.4)	0.0	(0.0~0.3)	ns		
豆類	43.6	(23.5~62.9)	25.7	(14.0~39.0)	23.5	(13.7~35.4)	18.6	(10.4~28.6)	0.002		
種実類	0.3	(0.1~1.1)	0.1	(0.0~0.6)	0.2	(0.0~0.6)	0.1	(0.0~0.4)	<0.001		
緑黄色野菜類	107.4	(76.5~150.2)	62.1	(39.5~78.5)	62.9	(43.9~89.7)	41.6	(28.8~60.7)	<0.001		
その他の野菜類	152.1	(108.3~213.9)	69.3	(44.7~100.7)	89.5	(62.8~124.9)	49.8	(33.8~74.8)	<0.001		
果物類	57.5	(26.7~115.5)	33.1	(14.3~60.6)	32.7	(14.5~66.2)	23.4	(10.5~44.3)	0.001		
藻類	5.6	(2.3~11.2)	2.6	(1.4~5.5)	3.7	(1.4~6.4)	1.9	(1.0~4.2)	<0.001		
魚介類	50.5	(31.5~74.1)	30.7	(19.1~46.0)	28.3	(18.7~41.0)	22.8	(14.4~34.1)	0.002		
肉類	84.0	(57.9~125.4)	62.2	(43.5~81.0)	47.9	(34.7~66.0)	46.6	(33.2~59.7)	ns		
卵類	39.3	(22.5~50.0)	25.0	(19.6~39.8)	20.2	(11.1~28.6)	21.3	(13.8~30.0)	ns		
乳類	205.7	(105.0~301.6)	147.3	(78.6~243.9)	112.7	(56.4~168.8)	118.0	(59.6~174.7)	ns		
油脂類	16.9	(11.6~24.1)	14.6	(10.3~19.3)	9.8	(7.3~13.0)	10.6	(7.7~14.0)	ns		
菓子類	31.8	(15.7~53.5)	27.2	(14.3~42.7)	17.6	(10.2~29.2)	19.7	(11.6~31.5)	ns		
嗜好飲料類	160.7	(76.8~310.7)	96.4	(35.7~176.3)	89.8	(41.3~171.4)	69.6	(27.6~137.6)	0.007		

高摂取群は成人女性の葉酸推奨量 (240µg) 以上の摂取者、低摂取群は推奨量未満の摂取者

1) 栄養素は t 検定

2) 食品群は Mann-Whitney の U 検定

## **Abstract**

Associations of Knowledge of Folate and Neural Tube Defects with Consumption of Folate and Food Consumption Structure Analyses in Female University Students

**[Objective]** We studied the associations of knowledge of folate and NTDs with the intake of folate, and food consumption structure in female university students, including newcomers and senior students (juniors plus seniors).

**[Methods]** Study subjects were 363 female university students (154 newcomers and 209 seniors). The study was done in July 2014. We surveyed 11 items (9 items of folate and NTDs, and 2 items of supplement use) by a questionnaire. A semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) was adopted for dietary survey. We used a factor analysis for food consumption structure analysis. For statistical analyses, Chi-square test, t-test, one-way of analysis of variance (ANOVA), or Mann-Whitney *U* test was appropriately used.

**[Results]** Newcomers had insufficient knowledge of folate and NTDs. No associations were observed between their acquaintance with folate and folate consumption for all students. Food consumption structure analyses revealed that students having folate of more than the recommended

value were consuming not only folate-contributing food but also a variety of food items.

**[Conclusions]** It was suggested that not only providing more intensive education concerning folate and NTDs but also keeping quality of food consumption as a whole (amount of meal and food balance) are warranted for prevention of NTDs.

### 第 3 章

## 研究 2 葉酸添加発酵乳の摂取と血清葉酸値との関連－メチレンテトラヒドロ還元酵素遺伝子多型 C677T 層化ランダム化比較対照試験 ー

### 1. 緒言

胎児の神経管は受胎後おおよそ 4 週で閉鎖する。この期間に葉酸が不足すると神経管閉鎖障害 (neural tube defects: NTDs) のリスクが高まる。妊娠前から妊娠初期において葉酸 (プテロイルモノグタミン酸: PtGlu<sub>1</sub>) を摂取すると、NTDs 発生リスクが低減するという多くの疫学研究の結果が報告された<sup>1-5)</sup>。その結果を受け、1990 年代より欧米を中心に、NTDs 予防のため妊娠前 4 週間以上前から妊娠 12 週の間、通常の食事に加え、PtGlu<sub>1</sub> 400 µg/日またはそれ以上をサプリメントや強化食品で摂取するように勧告されている<sup>6-7)</sup>。1999 年に中国で行われた大規模介入試験で、妊娠前後に葉酸サプリメント 400µg/日を摂取することにより、NTDs 発生を 40% (低発生地域) ~80% (高発生地域) 低下させることが報告された<sup>8)</sup>。2000 年より、わが国においても妊娠可能な年齢の女性、妊娠を計画している女性および妊婦等に NTDs 発生リスク低減のために、普段の望ましい食生活に加えて、欧米と同様に葉酸サプリメント 400µg/日の摂取の勧告がされている<sup>9)</sup>。

一般に、妊娠に気づくのは徴候が出現する妊娠 8~12 週以降が多く、妊娠が分かってからサプリメントを利用する女性が多い<sup>10-16)</sup>。妊娠初期に神経管が閉鎖することを考慮すると、

これでは十分な効果が得られない。日本人は、食品の安全・安心の観点から、化学的に合成されたサプリメントより食事（食品）から摂りたいと考えており、日本女性の妊娠初期のサプリメント摂取率は 50~70 %<sup>15-16)</sup>であり、欧米の 70~95 %<sup>11-14)</sup>と比較して低く、妊娠前は、欧米および日本のいずれも、20~30 %<sup>10-16)</sup>とさらに低い。

一方、国民健康・栄養調査（2015年）<sup>17)</sup>によると、妊娠可能な女性（15~49歳）の食事由来の葉酸摂取量（食事性葉酸）は平均 230 $\mu$ g~240 $\mu$ g/日であり、約 50%が日本人の食事摂取基準（2015年版）の推奨量（非妊時；240 $\mu$ g/日）未満の摂取量であった<sup>18)</sup>。葉酸の必要量が増す妊娠期（推奨量 480 $\mu$ g/日）においては、一層、葉酸の不足が懸念される。

本研究では妊娠可能な女子大学生を対象に、葉酸の摂取状況の評価を行い、妊娠前の良好な葉酸栄養状態の確保のために、プロバイオティクス製品であるビフィズス菌発酵乳に低用量葉酸（PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g/100 mL）が添加された食品を導入し、葉酸代謝に影響を及ぼす MTHFR C677T 別に血清葉酸値の変化を検討した。

## II. 方法

### 1. 対象者

調査対象者は、妊娠していない愛知県 N 市某大学管理栄養士養成課程の女子大学生 1 年生 154 名（年齢 18~19 歳）である。解析対象者は、血液検体に溶血がみられた 2 名、介入後の採血を拒否した 9 名、計 11 名を除外した 143 名である。

本研究のプロトコルは、名古屋学芸大学研究倫理委員会の承認（No.101）を受け、対象者には文書と口頭による十分な説明を行い、文書にて同意を得た。

## 2. 研究デザイン

研究デザインは MTHFR 遺伝子多型による層化ランダム化比較対照試（stratified randomized controlled trial：RCT）である。対象者の割り付けは、図 1 に示すように、MTHFR 遺伝子多型 C677T の 3 タイプ（CC、CT、TT）により、投与群、対照群に層化無作為割付けを行った。なお、対象者には遺伝子多型に対する情報は伝えていない。研究は 2014 年 10 月~11 月（4 週）の間に実施した。投与群は普段の食事に加えて、葉酸が添加されたビフィズス菌発酵乳を摂取させ、対照群は従来どおりの食事とした。

## 3. 対象者の特性

身長、体重は実測し、body mass index（BMI）を算出した。生活習慣として、喫煙歴、飲酒歴、サプリメント摂取状況について調査した。

## 4. 葉酸添加食品

介入には、PtGlu<sub>1</sub> 200µg/100 mL を添加した市販のビフィズス菌発酵乳 [Bifidobacterium breve ヤクルト株を 1×10<sup>10</sup> cfu/100 mL 以上を含有した食品（fermented milk fortified with folic acid：葉酸添加発酵乳）を用いた。摂取時間は指

定せず、毎日 1 本 (100 mL) を 4 週間飲用させた。栄養成分については表 1 に示すとおりである。

## 5. 食事調査

食事調査は、過去約 1 ヶ月間を想起して回答する自記式食物摂取頻度調査票 (FFQ) を用いて介入前後に実施した。当該の FFQ は再現性・妥当性が確認されている<sup>19)</sup>。

栄養素は、葉酸と葉酸に関連する栄養素であるエネルギー、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> を取りあげ、エネルギー 1,000 kcal 当たりの摂取量 (エネルギー調整値) を求めた。

葉酸摂取量の評価は、日本人の食事摂取基準 (2015 年版) の推定平均必要量 (非妊時 200 $\mu$ g/日, 妊娠期 400 $\mu$ g/日) に基づき行った<sup>18)</sup>。介入前の葉酸摂取量は食事性葉酸のみ、介入後は、葉酸添加発酵乳中の PtGlu<sub>1</sub> (200 $\mu$ g) の体内利用率を 1.7 倍とし、食事性葉酸相当量 (Dietary folate equivalent : DFE) として食事性葉酸に 340 $\mu$ g を加算して示した<sup>6,21-22)</sup>。

## 6. 血液生化学検査

早朝、空腹時に採血し、血清葉酸は、化学発光免疫測定法 (chemiluminescence immunoassay : CLIA 法) (ダイアグノスティック社、ケミカル ACS-葉酸 II キット使用) にて測定した。なお、測定は株式会社 BML に依頼した。

血清葉酸値は、巨赤芽球性貧血のカットオフ値 4ng/mL 以上<sup>23)</sup>、NTDs のカットオフ値 7ng/mL 以上<sup>24)</sup>を用い評価した。



## 7. MTHFR 遺伝子多型 C677T 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'、Reverse; 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°C 15 秒 (変性)、60°C 30 秒 (アニーリング)、68°C 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 208 bp、多型を持つ場合 85bp と 123bp に切断される)。

## 8. 統計解析

葉酸摂取量は正規分布とみなせたが、血清葉酸値の分布は偏っていたので、自然対数 (ln) 変換して正規分布に近似させ解析に用いた。離散量は  $\chi^2$  検定、Fisher の直接確率検定、正規分布とみなせる連続量は算術平均 [標準偏差]、ln 変換値は幾何平均 [幾何標準偏差] を求め、3 群間の比較は一元

配置分散分析と *post hoc* Bonferroni 検定、介入前後の 2 群間の比較 *paired t-test* を行った。血清葉酸値と葉酸摂取量との関連については、血清葉酸値 (ln 変換値) とエネルギー調整葉酸値を用いて Pearson の相関係数を求めた。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。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 介入前の対象者の特性、生活習慣および血清葉酸値

解析対象者 143 名の MTHFR C677T 遺伝子多型の頻度は、CC 群 36 名 (25.2%)、CT 群 75 名 (52.4%)、TT 群 32 名 (22.4%) で、Hardy-Weinberg 平衡内にあった。

介入前の対象者の特性、生活習慣および血清葉酸値を表 2 に示した。全対象者の BMI は 20.1 [1.9] kg/m<sup>2</sup> (平均値 [標準偏差]) であった。

法的規制があり、喫煙歴、飲酒歴はほとんどの対象者 (いずれも約 98%) にその習慣はなかった。サプリメント利用は、全対象者で 16 名 (11.1%) であったが、葉酸の利用者はいなかった。なお、身体的特性、生活習慣は MTHFR 遺伝子多型 3 群間に有意の差はなかった。

対象者全体の栄養素等摂取量は、エネルギー 1,559 [367] kcal/日、ビタミン B<sub>6</sub> 0.61 [0.14] mg/1,000 kcal/日、ビタミン B<sub>12</sub> 2.6 [1.1] μg/1,000 kcal/日、食事性葉酸摂取量は 159 [59] μg/1,000 kcal/日であった。食事性葉酸を含む栄養素等摂取量は MTHFR 遺伝子多型 3 群間で有意差はなかった。

介入前における全対象者の血清葉酸値は 9.8 [1.4] ng/ mL であった。遺伝子多型別では、CC 群は 12.1 [1.3] ng/ mL、CT 群は 9.9 [1.4] ng/ mL、TT 群は 7.7 [1.4] ng/ mL で、CC 群 > CT 群 > TT 群の順で低下していた ( $p < 0.001$ )。NTDs 予防のための血清葉酸カットオフ値 (7ng/mL) を下回る者は、全体で 19 名 (13.3 %) であった。CC 群 1 名 (2.8 %)、CT 群 10 名 (13.3 %)、TT 群 8 名 (25.0 %) で、その割合は遺伝子多型群間で有意差 (CC 群 < CT 群 < TT 群) があつた ( $p < 0.05$ )。特に、TT 群は 4 人に一人に NTDs リスクがあることが示唆された。

## 2. 介入前後の MTHFR 遺伝子多型群別葉酸摂取量および血清葉酸値

### 1) 葉酸摂取量

投与群・対照群別、MTHFR 遺伝子多型群別に、介入前後のエネルギーおよび葉酸摂取量を示した (表 3)。介入前の摂取エネルギーは、投与群・対照群すべてを通して 1,400~1,600kcal/日であり、両群間に差はなかった。介入前後の比較では、すべての遺伝子多型群 (対照群の CT 群を除く) で差はなかった。

介入前の葉酸摂取量は、投与群、対照群のいずれの遺伝子多型群間に有意差はなかったが、介入後の葉酸摂取量は、投与群が対照群より有意に高かつた ( $p < 0.001$ )。遺伝子多型別にみると、投与群では CC 群 137 [31]→375 [83]  $\mu\text{g}/1,000$  kcal /日、CT 群 161 [46]→395 [87]  $\mu\text{g}/1,000$  kcal/日、TT

群 167 [89]→419 [136]  $\mu\text{g}/1,000 \text{ kcal}/\text{日}$ であり、すべての遺伝子多型群で約 2.5 倍の増加を示した ( $p<0.001$ )。なお、その増加率は遺伝子多型群間に差はなかった。

対照群の介入前後の比較では、いずれの遺伝子多型群間にも差はなかった。

## 2) 血清葉酸値

介入前の血清葉酸値は投与群、対照群とも、いずれの遺伝子多型群間にも有意差はなかった (表 4)。遺伝子多型群間の比較では、投与群、対照群とも一貫して有意に CC 群 > TT 群であった。

介入前後の遺伝子多型別血清葉酸値は、投与群の CC 群 12.2 [1.3]→18.5 [1.3]  $\text{ng}/\text{mL}$ 、CT 群 9.8 [1.5]→14.7 [1.3]  $\text{ng}/\text{mL}$ 、TT 群 7.9 [1.4]→11.0 [1.3]  $\text{ng}/\text{mL}$  であり、すべての遺伝子多型群で介入前より有意に増加していた

( $p<0.001$ )。その変化率は CC 群 152.3 [1.4] %、CT 群 150.8 [1.4] %、TT 群 144.2 [1.3] % であり、遺伝子多型群間の差はなかった。なお葉酸添加発酵乳による副作用がなかった。

一方、対照群における介入前後の血清葉酸値は、いずれの遺伝子多型群間に差はなく、変化率にも差はなかった。

## 3. 葉酸摂取量と血清葉酸値の関連

遺伝子多型別にエネルギー調整葉酸摂取量と血清葉酸値 (ln 変換) の散布図および回帰直線を図 2 に示した。介入前は、全対象者および各遺伝子多型群において 2 変量間に有意

な相関はなかった。介入後は、全対象者で  $r=0.463$  ( $p<0.001$ ) であり、遺伝子多型別では CC 群  $r = 0.652$  ( $p<0.001$ )、CT 群は  $r = 0.512$  ( $p<0.001$ )、TT 群は  $r = 0.378$  ( $p<0.05$ ) であった。

#### 4. 介入前後の NTDs リスクの基準値 (血清葉酸値 7ng/mL) 未満者の頻度

NTDs リスクカットオフ値未満者の出現状況は、投与群では全体で介入前 10 名 (13.7%) から、介入後は 2 名 (2.7%) に減少した ( $p<0.05$ ) (表 5)。遺伝子多型別では、CC 群については介入前後とも 0 名 (0%)、CT 群は介入前後で 6 名 (14.6%) から 1 名 (2.4%) へ、TT 群は 4 名 (25.0%) から 1 名 (6.3%) に減少していた。

対照群は全体および遺伝子多型群において、NTDs リスクのカットオフ値未満者の出現状況に変化はなかった。

#### IV 考察

女子大学生 143 名を対象に、葉酸添加発酵乳を用いたランダム化比較対照試験を行い、MTHFR 遺伝子多型別に血清葉酸値に及ぼす影響について検討した。葉酸の栄養状態として赤血球中葉酸ではなく、血清葉酸値を用いたのは介入期間が 4 週間と短く、半減期が 3 カ月と長い赤血球中葉酸では、介入の影響を十分に評価できないと考えたからである。介入前の全対象者の葉酸摂取量は 246 [97]  $\mu\text{g}/\text{日}$  であり、投与群と対照群間、遺伝子多型群間に差はなかった。投与群の介入後

の血清葉酸値は介入前より約 1.5 倍増加し、NTDs (7ng/mL) のカットオフ値以下の者は介入前の 5 分の 1 (介入前 10 名 → 介入後 2 名) に減少した。通常の食生活に低用量 (PtGlu<sub>1</sub> 200 μg/日) の葉酸添加食品を摂取することで、NTDs リスク低減に資することが示唆された。

介入前の食事性葉酸摂取量は 159 [59] μg/ 1,000 kcal/日であり、遺伝子多型間に有意差はなかった。日本人の食事摂取基準 (2015 年版) による推定平均必要量 (200 μg/日) 以下の不足の者は 36.9%であった。

介入前の全対象者の血清葉酸値には、遺伝子多型群間に有意差 (CC 群 > CT 群 > TT 群) がみられた。先行研究では、CC 群, CT 群 > TT 群の報告<sup>25-26)</sup>、CC 群 > CT 群, TT 群の報告<sup>27)</sup>、CC 群 > TT 群の報告<sup>28)</sup>など、報告間に若干の差異がみられたが、CC 群 > TT 群の差異は一貫していた。他の報告と同様に葉酸代謝は遺伝子多型により影響されることが示された。NTDs 予防のための血清葉酸カットオフ値 (7ng/mL) を下回る者は、全体で 13.3%であり、特に、TT 群は 4 人に一人に NTDs リスクが示唆された。

投与群における介入後の血清葉酸値は、介入前より CC 群は 152.3 %、CT 群は 150.8 %、TT 群は 144.2%と増加し、NTDs のカットオフ値未満の者は、全体で介入前 10 名 (13.7%) から介入後 2 名 (2.7%) に有意に減少した。しかも、当該 2 名の血清葉酸値は 6.7ng/mL および 6.8ng/mL と NTDs カットオフ値をわずかに下回るものであった。PtGlu<sub>1</sub> 200 μg/日の葉酸添加食品の付加に満足すべき効果があることが分かった。

Daly ら<sup>29)</sup>は NTDs 予防のための葉酸サプリメントの最少用量を明らかにする目的で、妊娠可能な年齢の女性を対象とした 10 週間の試験で、葉酸サプリメント 200 $\mu$ g/日および 400  $\mu$ g/日とも赤血球中葉酸の濃度を上昇させ、血漿中ホモシステインを低下させることを報告した。Daly ら<sup>24)</sup>は、レビューの中で 200 $\mu$ g/日の葉酸サプリメントは、一般の人々にとって費用対効果、費用対便益、リスク対ベネフィット評価の観点からより望ましく、また、サプリメント 100 $\mu$ g/日の量でも継続的に摂取すると NTDs リスク低減に寄与すると報告している。すなわち、NTDs 予防には、PtGlu<sub>1</sub> 200  $\mu$ g/日の添加食品で達成可能であることを示唆するものである。そこで本研究では、この論文を参照し、また、日本人はサプリメントに抵抗感があることも考慮し、低用量 (PtGlu<sub>1</sub>200 $\mu$ g) を介入試験に採用した。

日本人を対象とした介入試験についてみると、Hiraoka ら<sup>27)</sup>は、女子学生を対象とした 4 週間の葉酸サプリメント PtGlu<sub>1</sub> 200  $\mu$ g/日、400  $\mu$ g/日を用いて介入をおこなった結果、血清葉酸値は介入前より、それぞれ平均 140%、150%と増加したとを報告している。Kawashima ら<sup>30)</sup>は、20 代成人を対象に普段の食生活に加えて、葉酸約 420 $\mu$ g/日を含む野菜・果物のミックスジュース濃縮カプセルを 28 日間摂取させる介入試験を行ったところ、介入前に比較して血清葉酸値は 22.4 [1.26] ng/ mL (介入前の 174%) に上昇、血漿ホモシステイン値は 8.14 [0.44] nmoL/ mL (介入前の 81.1%) 低下し、巨赤芽球性貧血および NTDs を回避できることを示唆した。こ

の結果は、自然食品から葉酸 450 $\mu$ g/日以上摂取すると、NTDs 予防レベルの赤血球中葉酸下限値 1,070nmol/ L 以上となるという Marchetta らによるメタアナリシスの結果とほぼ同様であった<sup>31)</sup>。

国際比較を行うために、本研究では欧米と同じように PtGlu<sub>1</sub> の DFE を 1.7 倍としている。食事性葉酸の PtGlu<sub>1</sub> に対する相対生体利用率は、食品により、あるいは一緒に食べる食品により異なる。一方、福渡らは日本人の食事の相対利用率を PtGlu<sub>1</sub> に対して約 50%と報告している<sup>32)</sup>。日本の食事摂取基準は福渡らの報告に準拠し、PtGlu<sub>1</sub> の DFE 2 倍を採用している。いずれにしても PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g/日の DFE は 340~400  $\mu$ g/日に相当し、Kawashima ら、Marchetta らの摂取量に近似していた<sup>30-31)</sup>。

わが国の多くの若年女性および妊婦においても、NTDs に関する知識、NTDs リスクと葉酸の関連性、特に妊娠前・妊娠早期の葉酸摂取が重要であるという知識が不足している。さらに栄養はサプリメントからではなく食品から摂取したいと考えている。妊娠の可能性のある女性、妊娠を計画している女性および妊娠初期の女性に対し、400 $\mu$ g/日以上のサプリメントが勧められているが、計画して妊娠する女性は 20~30 %と低い<sup>10-16)</sup>。特に神経管が妊娠初期に閉鎖することを考慮すると、NTDs 予防には妊娠前から良好な葉酸栄養状態を維持することが重要である。米国をはじめ、多くの国々ではポピュレーションアプローチとして穀類に葉酸添加を義務づけている。近年、米消費量の低下があることから、日本



人の主食である米への葉酸添加は、有効な方法とは考えられない。そこで、食事バランスガイドにおいて、毎日一定量の摂取が推奨されている乳製品の一部を葉酸添加の乳製品に置き換えて摂取することは、NTDs リスク低減に一定の効果が期待できると考えられる。また、日本人に不足しがちなカルシウムも同時に摂取することができる。国立健康・栄養研究所では、市販サプリメントの成分、品質（原材料を含む）はさまざま、安全性や品質の保証がないことから、「葉酸の摂取方法として、まず、食事の充実、次に葉酸を添加した特別用途食品、栄養機能食品や加工食品などの利用、それでも不足した場合は、サプリメントの摂取」という順序で推奨している<sup>33)</sup>。

MTHFR 遺伝子多型の判定に関しては、葉酸を十分摂る指導を行えば、必要でないことが示唆された。

本研究の限界として、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。介入期間が短いこと、葉酸の栄養状態の中・長期的な指標である赤血球中葉酸、血漿ホモシステインによる評価がなされていないことなどが挙げられる。今後は、対象者数を増やし、妊娠可能な広い年代の女性を対象にすること、さらに、食品によって吸収率が異なるので、今回使用した葉酸添加発酵乳を含め、葉酸添加食品の吸収率および介入効果などについて検討することが望まれる。

## V 結語

葉酸摂取量は遺伝子多型間の差はなく、血清葉酸値は遺伝子多型 CC 群>CT 群>TT 群の順に低値を示した。PtGlu<sub>1</sub> 200 µg/100 mL を添加した葉酸添加発酵乳の介入試験は、妊娠の可能性ある女性、妊娠を計画している女性の血清葉酸値を NTDs カットオフ値レベルまで上昇させ、NTDs リスク低減効果があることが示唆された。この葉酸添加発酵乳は、乳製品のの一つとして、日常の食生活、特に NTDs 予防のため、妊娠前の食品として受け入れ易いと考えられる。

## VI 謝辞

本研究にご協力いただきました対象者の方々に厚くお礼申し上げます。

また、葉酸添加発酵乳を提供いただいた（株）ヤクルト本社に御礼申し上げます。

## VII 利益相反

本研究における利益相反はない。

## 参考文献

- 1) Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. Arch Dis Child 1976; 51: 944-950
- 2) MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. Lancet 1991; 338: 131-137
- 3) Czeizel AE, Dudás I . Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N Engl J Med 1992; 327: 1832-1835
- 4) Milunsky A, Jick H, Jick SS, et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. JAMA 1989; 262: 2847-2852
- 5) Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. JAMA 1993; 269: 1257-1261
- 6) Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press. Washington DC (1998)
- 7) Scientific Advisory Committee on Nutrition . Report on Health and Social Subjects 41 Dietary Reference Values (DRVs) for Food Energy and Nutrients for the UK. London 2006

[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/338892/SACN\\_Folate\\_and\\_Disease\\_Prevention\\_Report.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338892/SACN_Folate_and_Disease_Prevention_Report.pdf)

- 8) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 1991; 341: 1485-1490
- 9) 厚生労働省. 厚生労働省児童家庭局母子保健課, 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について (2000),  
[http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1\\_18.html](http://www1.mhlw.go.jp/houdou/1212/h1228-1_18.html)  
(2000) (Accessed on Sep 16, 2016)
- 10) Bixenstine PJ, Cheng TL, Cheng D, et al. Association between preconception counseling and folic acid supplementation before pregnancy and reasons for non-use. *Matern Child Health J* 2015; 19: 1974-1984
- 11) Bestwick JP, Huttly WJ, Morris JK, et al. Prevention of neural tube defects: a cross-sectional study of the uptake of folic acid supplementation in nearly half a million women. *PLoS One* 2014; 19: 9, e89354. doi: 10.1371 (Accessed on Sep.15, 2016)
- 12) McNulty B, Pentieva K, Marshall B, et al. Women's compliance with current folic acid recommendations and achievement of optimal vitamin status for preventing neural tube defects. *Hum Reprod* 2011; 26: 1530-1536

- 13) Forster DA, Wills G, Denning A, et al. The use of folic acid and other vitamins before and during pregnancy in a group of women in Melbourne, Australia. *Midwifery* 2009; 25: 134-146
- 14) Sato Y, Nakanishi T, Chiba T, et al. Prevalence of inappropriate dietary supplement use among pregnant women in Japan. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013; 22: 83-89
- 15) 佐藤陽子, 中西朋子, 千葉剛他. 妊婦における神経管閉鎖障害リスク低減のための folic acid 摂取行動に関する全国インターネット調査. *日本公衆衛生雑誌* 2014; 61: 321-332
- 16) Kondo A, Morota N, Date H, et al. Awareness of folic acid use increases its consumption, and reduces the risk of spina bifida. *Br J Nutr* 2015; 14: 84-90. doi: 10.1017/S0007114515001439
- 17) 厚生労働省. 平成 27 年国民健康・栄養調査報告(2017). <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>. (Accessed on Sep.15,2016)
- 18) 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)
- 19) 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: 679-87
- 20) 文部科学省. 科学技術学術審議会, 資源調査分科会報告.

日本食品標準成分（2010年）医歯薬出版社（2010）

- 21) Bailey LB. Dietary reference intakes for folate: the debut of dietary folate equivalents. *Nutr Rev* 1998; 56: 294-299
- 22) Yang TL, Hung J, Caudill M A, et al. 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 Nutr* 2005; 135: 1139- 1145
- 23) Selhub J, Jacques PF, Dallal G, et al. The use of blood concentrations of vitamins and their respective functional indicators to define folate and vitamin B<sub>12</sub> status. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S67-73
- 24) Dary O. Nutrition interpretation of folic acid intervention. *Nutr Rev* 2009; 67: 235-244
- 25) Crider KS, Zhu JH, Yang QH, et al. MTHFR 677C→T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 1365-1372
- 26) Nishio K, Goto Y, Kondo T, et al . Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake. *J Epidemiol* 2008; 18: 125-131
- 27) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, et al. Gene-nutrient and

- gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1210-1216.
- 28) Ashfield-Watt PAL, Pullin CH, Whiting JM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 180-186
- 29) Daly S, Mills JL, Molloy AM, et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet* 1997; 350: 1666-1669
- 30) Kawashima A, Madarame T, Koike H, et al. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16: 411-421
- 31) Marchetta CM, Devine OJ, Crider KS, et al. Assessing the association between natural food folate intake and blood folate concentrations: a systematic review and Bayesian meta-analysis of trials and observational studies, *Nutrients* 2015; 7: 2663-2686:
- 32) 福渡 努, 柴田克己. パンを主食とした食事に含まれる水溶性ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率、日本家政学雑誌 2009 ; 60 : 57-63

33) 国立健康・栄養研究所.「健康食品」の安全性・有効性情報(2016)<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail1550.html>.  
(Accessed on Dec.5 (2016))



図表

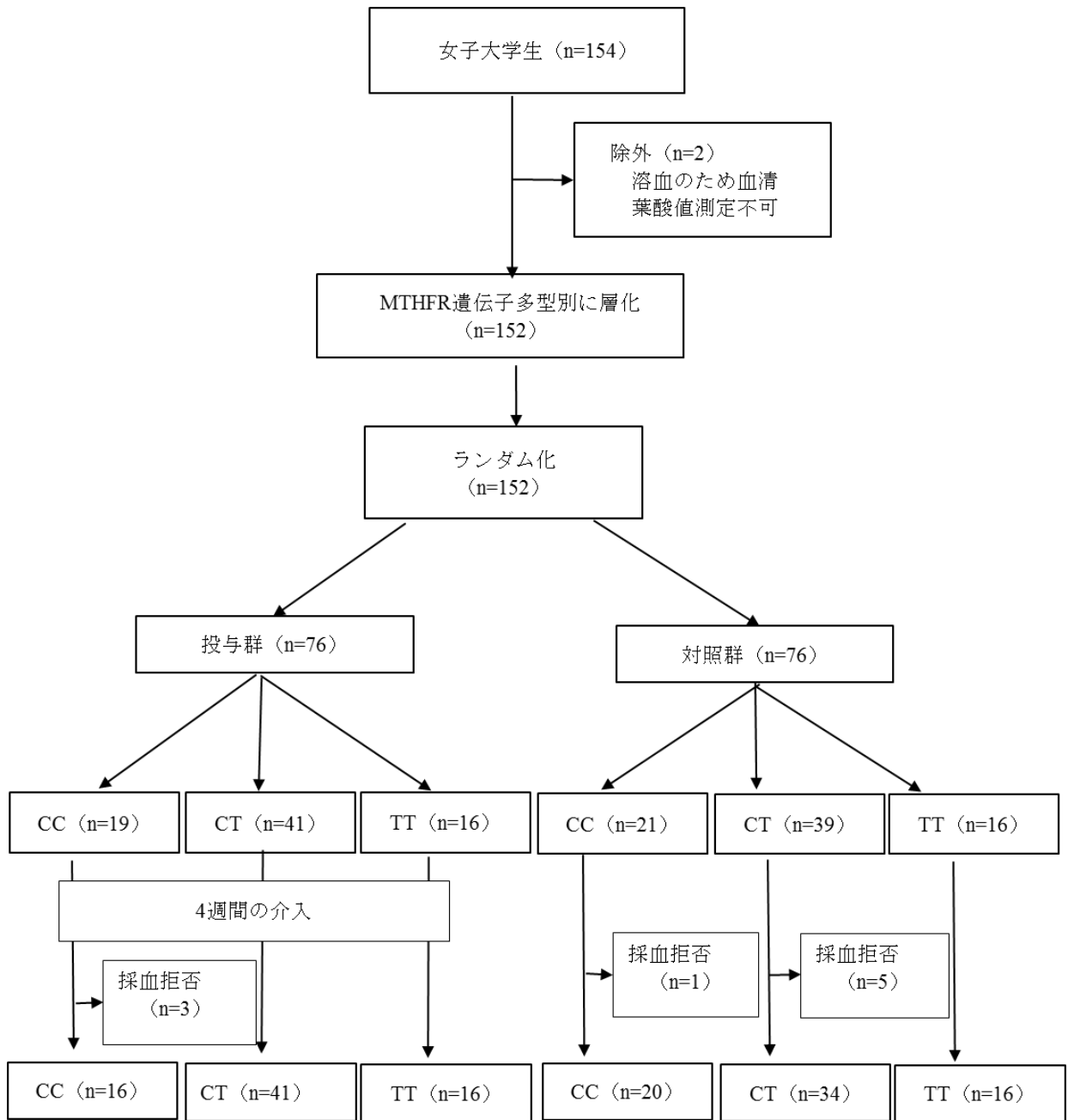


図1 RCTの流れ図

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

<sup>1)</sup> プテロイルモノグタミン

表2 介入前におけるMTFHR遺伝子多型群別対象者の特性、栄養摂取量および血清葉酸値

特性	全体 (n=143)	CC群 (n=36)	CT群 (n=75)	TT群 (n=32)	p <sup>1)</sup>
年齢 (歳) (最小値—最大値)	18 (18-19)	18 (18-19)	18 (18-19)	18 (18-19)	n.s.
身長 (cm)	157.9 [ 5.7]	156.9 [ 6.2]	157.4 [ 7.3]	158.5 [ 5.3]	n.s.
体重 (kg)	50.2 [ 6.3]	50.2 [ 8.3]	50 [ 6.6]	50.5 [ 5.4]	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.1 [ 1.9]	20.4 [ 1.9]	20.3 [ 4.2]	20.1 [ 1.8]	n.s.
生活習慣 (n(%))					
喫煙歴					
有り	1 ( 0.7)	1 ( 2.8)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	n.s.
無し	140 (97.9)	34 (94.4)	74 (98.7)	32 (100)	
(回答無し)	2 ( 1.4)	1 ( 2.8)	1 ( 1.3)	0 ( 0 )	
飲酒歴					
有り	1 ( 0.7)	1 ( 2.8)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	n.s.
無し	140 (97.9)	34 (94.4)	74 (98.7)	32 (100)	
(回答無し)	2 ( 1.4)	1 ( 2.8)	1 ( 1.3)	0 ( 0 )	
サプリメントの摂取					
有り	16 (11.1)	4 (11.1)	9 (12.0)	3 ( 9.4)	n.s.
無し	125 (87.4)	32 (88.9)	64 (85.3)	29 (90.6)	
(回答無し)	2 ( 1.3)	0 ( 0 )	2 ( 2.7)	0 ( 0 )	
栄養摂取量					
総エネルギー (kcal/日)	1,559 [367]	1,556 [379]	1,591 [367]	1,487 [356]	n.s.
ビタミン B <sub>6</sub> (mg/1,000kcal/日)	0.61 [0.14]	0.61 [0.14]	0.61 [0.13]	0.61 [0.18]	n.s.
ビタミン B <sub>12</sub> (μg/1,000kcal/日)	2.6 [ 1.1]	2.8 [ 1.0]	2.6 [ 1.2]	2.4 [ 1.1]	n.s.
食事性葉酸 (μg/1,000kcal/日)	159 [59]	165 [68]	153 [46]	169 [73]	n.s.
食事性葉酸 (μg/日)	246 [97]	251 [93]	246 [106]	240 [82]	n.s.
血清葉酸値					
血清葉酸値 (ng/mL) <sup>2)</sup>	9.8 [ 1.4]	12.1 [ 1.3] <sup>a,b</sup>	9.9 [ 1.4] <sup>a,c</sup>	7.7 [ 1.4] <sup>b,c</sup>	<0.001
血清葉酸値 7ng/mL未満者数 (n(%))	19 (13.3)	1 ( 2.8)	10 (13.3)	8 (25.0)	0.026

<sup>1)</sup> 連続量は一元配置分散分析と *post hoc* Bonferroni 検定; 同じ記号間に有意差あり, 不連続量は  $\chi^2$  検定

<sup>2)</sup> 幾何平均 [標準偏差]

表3 投与群・対照群の介入前後におけるMTHFR遺伝子多型別葉酸摂取量（1,000kcal 当たり）

	投与群				対照群				P <sup>1)</sup>
	CC群 (n=16)	CT群 (n=41)	TT群 (n=16)	CC群 (n=20)	CT群 (n=34)	TT群 (n=16)	TT群 (n=16)		
総エネルギー (kcal/日)									
介入前	1,629 [383]	1,577 [385]	1,552 [445]	1,497 [375]	1,607 [349]	1,421 [235]	1,421 [235]	n.s.	
介入後	1,627 [419]	1,563 [407]	1,570 [410]	1,534 [395]	1,370 [417]	1,440 [407]	1,440 [407]	n.s.	
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.001	n.s.	n.s.		
葉酸 (μg/1,000kcal/日)									
介入前 (食事性葉酸)	137 [31]	161 [46]	167 [89]	187 [81]	143 [44]	170 [56]	170 [56]	n.s.	
介入後 (食事性葉酸+DFE) <sup>3)</sup>	375 [83] <sup>abc</sup>	395 [87] <sup>def</sup>	419 [136] <sup>ghi</sup>	167 [51] <sup>adg</sup>	149 [58] <sup>b,ce,h</sup>	170 [41] <sup>e,fi</sup>	170 [41] <sup>e,fi</sup>	<0.001	
	<0.001	<0.001	<0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		

1) 一元配置分散分析と *post hoc* Bonferroni 検定: 同じ記号間に有意差有り

2) 遺伝子多型内介入前後: 対応のある *t* 検定

3) 投与群は食事性葉酸+FF発酵乳からのPtGlu,200μg [Dietary folate equivalent (DFE) として340μg], 対照群は食事性葉酸

表4 投与群・対照群におけるMTHFR遺伝子多型別血清葉酸値

	投与群			対照群			$p^1)$
	CC群 (n=16)	CT群 (n=41)	TT群 (n=16)	CC群 (n=20)	CT群 (n=34)	TT群 (n=16)	
介入前	12.2 [1.3] <sup>ab</sup>	9.8 [1.5]	7.9 [1.4] <sup>ac</sup>	12.0 [1.4] <sup>cd</sup>	10.1 [1.4]	7.5 [1.4] <sup>bd</sup>	<0.001
介入後	18.5 [1.3] <sup>ab,c,d</sup>	14.7 [1.3] <sup>efg</sup>	11.0 [1.3] <sup>a</sup>	10.6 [1.4] <sup>be</sup>	9.6 [1.4] <sup>cf</sup>	8.0 [1.4] <sup>d,e</sup>	<0.001
変化率	152.3 [1.4] <sup>ab,e</sup>	150.8 [1.4] <sup>d,e,f</sup>	144.2 [1.3] <sup>g,h</sup>	88.3 [1.4] <sup>de,g</sup>	95.6 [1.3] <sup>be,h</sup>	106.7 [1.4] <sup>c,f</sup>	<0.001
$p^2)$	<0.001	<0.001	<0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

血清葉酸値はanti-In値

1) 一元配置分散分析と *post hoc Bonferroni* 検定：同じ記号間に有意差有り

2) 遺伝子多型群内介入前後：対応のある *t* 検定

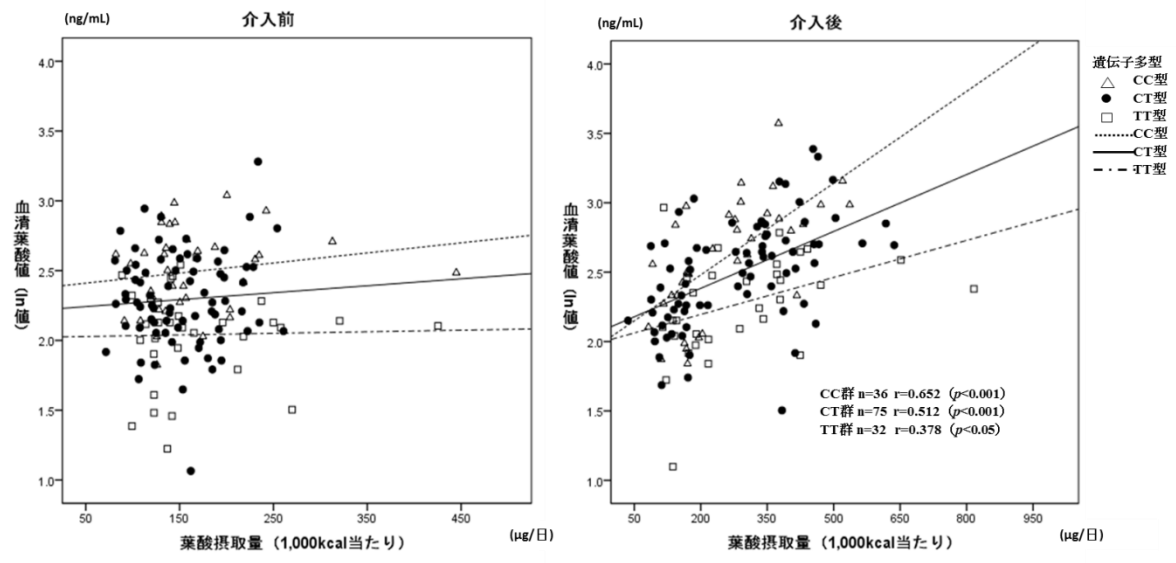


図2 介入前後、MTHFR遺伝子多型群別エネルギー調整葉酸摂取量と血清葉酸値 (ln値) との関連

<sup>1)</sup> 介入後は食事性葉酸 + PtGlu, 200μg [Dietary folate equivalent (DFE) として 340μg]

表5 血清葉酸値7ng/mL未満者の頻度

	投与群						対照群									
	全体 (n=73)		CC群 (n=16)		CT群 (n=41)		TT群 (n=16)		全体 (n=70)		CC群 (n=20)		CT群 (n=34)		TT群 (n=16)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
介入前	10 (13.7)	0 (0)	6 (14.6)	4 (25.0)	4 (25.0)	n.s.	9 (12.9)	1 (5.0)	4 (11.8)	4 (25.0)	n.s.	4 (25.0)	4 (25.0)	n.s.		
介入後	2 (2.7)	0 (0)	1 (2.4)	1 (6.3)	1 (6.3)	n.s.	11 (15.7)	2 (10.0)	5 (14.7)	4 (25.0)	n.s.	4 (25.0)	4 (25.0)	n.s.		
$p^2)$	0.031		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

<sup>1)</sup>  $\chi^2$ 検定

<sup>2)</sup> 遺伝子多型群内介入前後の比較：Fisherの直接確率検定

## **Abstract**

Effects of Folic Acid-Fortified Milk Consumption on Serum Folate Levels in Japanese Female Students: a Randomized Controlled Trial Stratified by Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genetic Polymorphism

**[Objective]** In order to reduce the risk of neural tube defects (NTDs), effects of a fermented milk with probiotics of *Bifidobacterium breve* fortified with 200 µg of pteroylmonoglutamic acid (PtGlu<sub>1</sub>) (FF fermented milk) on serum folate levels.

**[Methods]** The study subjects were 143 university women students of the Nagoya University of Arts and Sciences. Adopting an FF fermented milk as an intervention factor, a randomized controlled trial (RCT) stratified by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype was conducted. Experimental group subjects were requested to consume FF fermented milk for 4 weeks; control group subjects to consume usual meals. Dietary surveys were conducted using a semi-quantified food frequency questionnaire and serum folate was analyzed using chemiluminiscence immunoassay method. Oral mucous membranes were sampled and genetic polymorphisms were assayed using PCR-RFLP. Paired t-test, one-way analysis of variance, Pearson correlation



coefficient, Chi-square test, or Fisher's direct probability method was appropriately adopted.

**[Results]** MTHFR genetic polymorphisms were distributed to CC type 36 (25%), CT type 75 (52.4%) and TT type 32 (22.4%) as a whole. 143 subjects were randomly stratified into 73 experimental group (CC type: 16, CT type: 41, TT type 16) and, control group 70 (CC type 20, CT type 34, TT type 16). Average folate consumption was 246 µg/day without difference by MTHFR genetic polymorphism. Average serum folate level was 9.8 ng/mL with statistically significant difference by MTHFR genotype (CC type > CT type > TT type). Serum folate concentrations in experimental group increased by 1.5 on average after intervention; no differences in control group.

At baseline, there were 19 subjects (13.3%) having serum folate concentrations lower than reference value of NTDs (7 ng/mL): CC type 1/36 (2.8%), CT type 10/75 (13.3%) and TT type 8/32 (25.0%) with statistical difference by MTHFR genotype. In experimental group those subjects decreased from 10 to 2 (CT type 1 and TT type 2). Two subjects having lower serum folate levels were just below the reference value.

**[Conclusion]** Average folate consumption was 246 µg/day on average without difference by MTHFR genetic polymorphism. Average serum folate levels differed by

MTHFR genotype (CC type>CT type>TT type with statistically significant difference. Serum folate levels increased in experimental group subjects, suggesting consumption of FF fermented milk sufficiently elevated serum folate concentrations for prevention of NTDs irrespectively of genetic polymorphisms of MTHFR.

**[Keyword]** university women students, neural tube defects, methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism, folate consumption, serum folate concentrations

## 第 4 章

### 研究 3 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—

#### 1. 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参与している。また、血漿ホモシステインの代謝は、上記の再メチル化経路とイオウ転移経路がある。イオウ転移経路はビタミン B<sub>6</sub> を補酵素としてシスチンへ変換される（図 1）。したがって、葉酸に限らず、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub> のいずれかの欠乏で血中の血漿ホモシステイン値が上昇する。

高血漿ホモシステイン値は、動脈硬化症、認知症、神経管閉鎖障害のリスク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中長期の葉酸の栄養状態を表す指標として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（ホモ）接合体 CC 型、異型（ヘテロ）接合体 CT 型、変異型同型（ホモ）接合体 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140 $\mu$ g/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400 $\mu$ g/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240 $\mu$ g/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400 $\mu$ g/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 $\pm$ 14.5 $\mu$ g/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. 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> 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）。

### 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。当該の FFQ は再現性・妥当性が確認されている<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。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、葉酸に関係するエネルギーと 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> 200 $\mu$ g は、DFE として 340 $\mu$ g 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 (chemiluminescence 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 4ng/mL 以上<sup>15)</sup>、血漿ホモシステイン値 14nmol/mL 未満<sup>16)</sup>、動脈硬化症予防のカットオフ値は血漿ホモシステイン値 10nmol/mL 未満<sup>17)</sup>を用いた。

## 5. 遺伝子解析

MTHFR 遺伝子多型は研究 2 と同様に、介入前に対象者の口腔粘膜から DNA を抽出し、PCR-RFLP 法で DNA を増幅し、その反応生成物を制限酵素 Hinf 1 で切断し遺伝子多型を決定した。

## 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群間に差はなかった。

## 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  $164 \pm 62 \mu\text{g}/1,000 \text{ kcal/日}$ 、介入後は  $\text{PtGlu}_1 200 \mu\text{g/日}$  ( $\text{DFE} 340 \mu\text{g/日}$ ) (表 3) を加えた  $386 \pm 83 \mu\text{g}/1,000 \text{ kcal/日}$  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  $417 \pm 115 \mu\text{g}/1,000 \text{ kcal/日}$  へ (以下、同様)、CT 型  $146 \pm 44 \rightarrow 355 \pm 56 \mu\text{g}/1,000 \text{ kcal/日}$  へ、TT 型  $177 \pm 56 \rightarrow 412 \pm 57 \mu\text{g}/1,000 \text{ kcal/日}$  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 ( $p < 0.05$ )。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  $p < 0.001$ )、遺伝子多型群間の比較では、介入前、介入後いずれも差はなかった。

## 2) MTHFR 遺伝子多型別血清葉酸値

血清葉酸値（全体）は、介入前  $7.1 \pm 1.5$  ng/mL → 介入後  $11.7 \pm 1.5$  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  $9.0 \pm 1.4$  ng/mL → 介入後  $13.3 \pm 1.4$  ng/mL へ、CT 型は  $6.8 \pm 1.4$  ng/mL →  $11.8 \pm 1.4$  ng/mL へ、TT 型は  $5.7 \pm 1.4$  ng/mL →  $9.8 \pm 1.6$  ng/mL へといずれも介入後が有意に高値を示した (いずれも  $p < 0.001$ )。遺伝子多型群間では介入前 CC > CT ( $p < 0.05$ )、CC > 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群間に差はなかった。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群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  $8.0 \pm 1.3$  nmol/mL → 介入後  $6.2 \pm 1.3$  nmol/mL へ低下した ( $p < 0.001$ ) (表 3)。遺伝子多型別では CC 型  $7.4 \pm 1.2$  nmol/mL →  $6.1 \pm 1.2$  nmol/mL、CT 型は  $7.4 \pm 1.2$  nmol/mL →  $5.8 \pm 1.2$  nmol/mL)、TT 型は  $10.4 \pm 1.4$  nmol/mL →  $7.5 \pm 1.5$  nmol/mL といずれも有意に低下した ( $p < 0.001$ )。遺伝子多型群間では介入前 CC < TT ( $p < 0.05$ )、CT < TT ( $p < 0.01$ ) と TT 型が高くなっていた。介入後も同様に有意差がみられた。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±1.1%、TT 型 71.9±1.2%といずれも低下したが、遺伝子多型群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(4ng/mL)未満と血漿ホモシステイン値(14nmol/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%)→介入後 1 名(1.5%)に減少したが有意差はなかった(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→0 名(介入前→介入後)、TT 型 3 名→1 名(介入前→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。

## 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±342kcal/日、葉酸249±96μg/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±474kcal/日、237±101μg/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 200μg/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 1.0mg/日以下の者)、ビタミンB<sub>12</sub>(EAR 2.0μg/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。

葉酸添加発酵乳は葉酸だけではなく、ビタミンB<sub>6</sub>1.2mg、

ビタミン B<sub>12</sub> 2.4 $\mu$ 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。すなわち、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た。

## 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、1000kcal 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、1000kcal 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 $\mu$ g/日を添加したためである。

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の相関はなかった。しかし、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は有意な相関はなかったが、PtGlu<sub>1</sub> 添加葉酸添加発酵乳の介入後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関連があったという報告<sup>20-22)</sup>、関連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 $\mu$ g/日）の範囲では、摂取量と血清葉酸値間に、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 $\mu$ g/日）の葉酸摂取量と血清葉酸

値との関連性が明確になったのは、摂取量の範囲が大きいいためか、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 165%、遺伝子多型別では CC 型 148%、CT 型 172%、TT 型 174%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 $\mu$ g、400 $\mu$ 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 140% (PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g/日添加) および 150% (PtGlu<sub>1</sub> 400 $\mu$ 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 $\mu$ g/日添加の血清葉酸値は CC 型 136%、CT 型 130%、TT 型 169%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 $\mu$ g/日添加の血清葉酸値は CC 型 177%、CT 型 145%、TT 168%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 $\mu$ g/日付加の変化率は本研究の方が高く、平岡らの 200 $\mu$ g と 400 $\mu$ 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あり<sup>30-31)</sup>、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）への影響の可能性もあるかもしれない。

#### 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 147 $\mu$ g/日、125 $\mu$ g/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に対する体内栄養状態はほぼ良好であった。平岡ら<sup>20)</sup>の報告でも（150名）、血漿ホモシステイン値が 18.5 $\mu$ mol/L、22.9 $\mu$ mol/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 200 $\mu$ g 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

動脈硬化症の予防には血漿ホモシステインのカットオフ値 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。介入後は、血漿ホモシステインから評価すると、MTHFR C677T 多型にかかわらず、動脈硬化症の予防のカットオフ値以下であり、リスクはほぼ回避できることが示唆された。

Holmes らは、MTHFR 677C $\rightarrow$ T 多型はホモシステイン濃度の上昇と関連している。ホモシステイン濃度に対する MTHFR677C $\rightarrow$ T 多型の影響は、低葉酸摂取量の地域では大きく、葉酸強化を行っている国々は遺伝子多型による影響はなかったと報告している<sup>33)</sup>。これは、本研究と一致した結果であった。



## 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の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/日を付加すると、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 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のが、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の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、低用量の葉酸添加食品 (PtGlu<sub>1</sub> 200μg/日) の利用により改善した。、動脈硬化症予防の点からは低用量の葉酸強化食品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あげます。

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. 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),  
(Accessed on Sep.15,2016)
- 12) 三ツ口千代菊,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; 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. J. Nutr 2005; 135: 1139-1145
- 15) De Benoist B. Conclusion of a WHO technical consultation on folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies,

- Food Nutr Bull 2008; 29: 238-244S
- 16) Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. JAMA 1993; 270: 2693-2698
- 17) Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a 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 folic acid-fortified milk consumption on serum folate levels in Japanese female students: a randomized controlled trial stratified by methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphism. 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
- 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
- 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; 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
- 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
- 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; 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 Nutr Res 2012; 29: 32-35
- 27) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, et al. Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. Biochem Biophys Res Commun 2004; 316: 1210-1216
- 28) Ohrvik VE, 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 OI, Takahashi R, Watanuki M. Role of activity of gastrointestinal microflora in absorption of calcium and magnesium in rats fed beta1-4 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
- 33) Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. Lancet.2011;378:584-594.
- 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)

図表

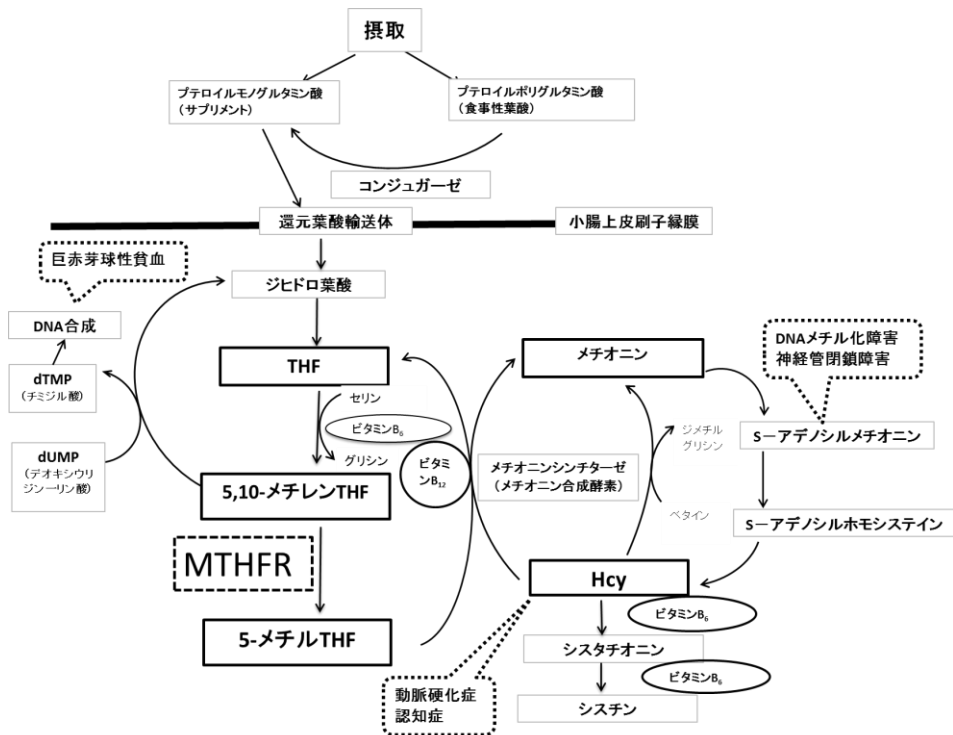


図1 葉酸・ホモシステインの代謝経路  
 (平岡真実. 葉酸代謝関連遺伝子多型に基づくテラーメイド栄養学. ビタミン2009;83:265-274) 一部改変

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)



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

<sup>1)</sup> プテロイルモノグタミン

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)		$p^{1)}$	
	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	} ns	
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)										
食品群	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)	} ns	
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)		
豆类	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)		

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

$p^{2)}$  Mann-Whitney u検定

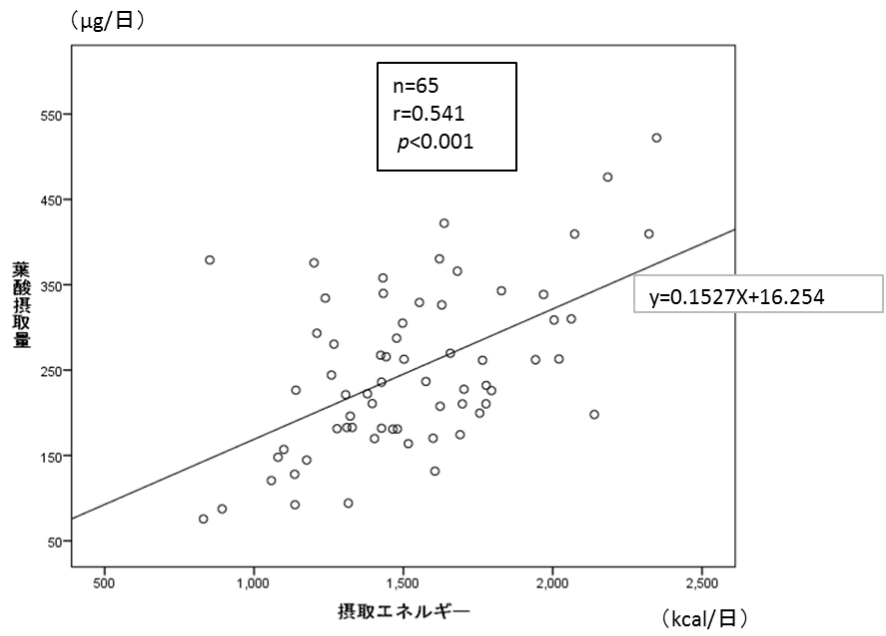


図2 摂取エネルギーと葉酸摂取量の関連

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ステリン値

		全体 (n=65)				CC (n=19)				CT (n=32)				TT (n=14)				p <sup>2)</sup>
		平均値		SD		平均値		SD		平均値		SD		平均値		SD		
		平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD			
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								
血漿ホモステリン値 (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、血漿ホモステリン値についてはlog値を用いて行い表示はもとに戻した値を示す

p<sup>1)</sup>介入前後の t 検定

p<sup>2)</sup> 遺伝子多型群間(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あり)

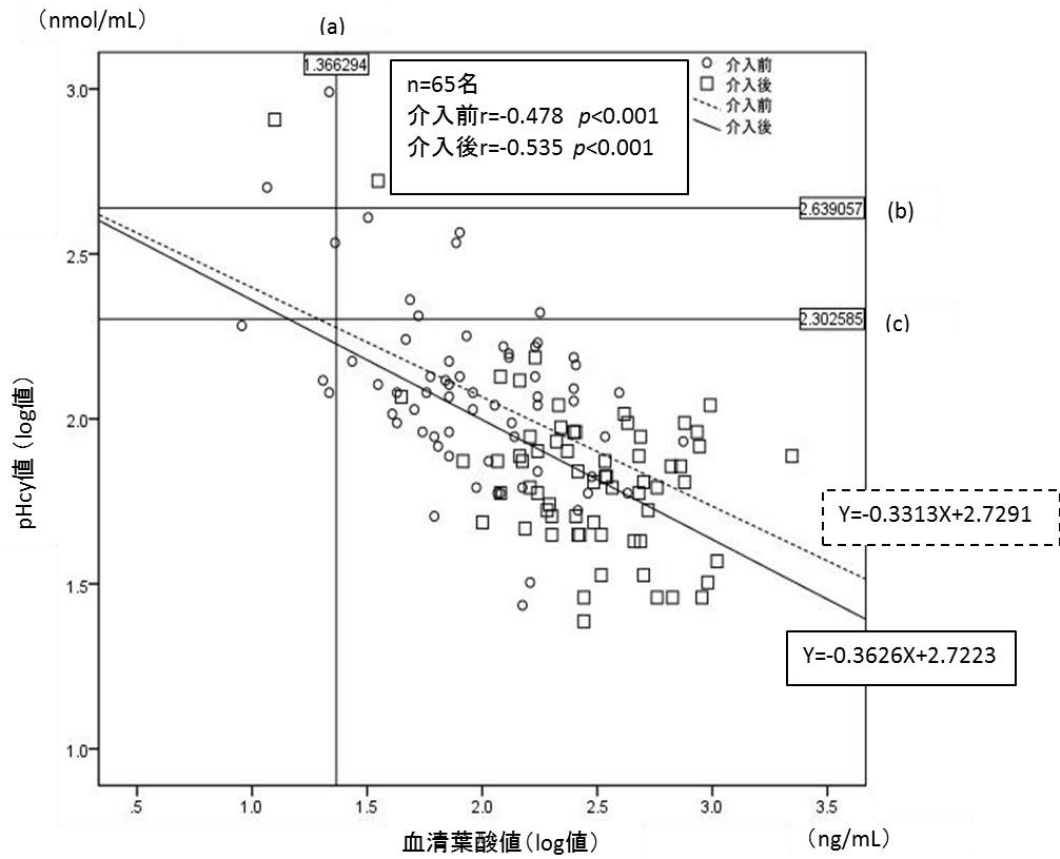


図3 血清葉酸値と血漿ホモシステイン値(pHcy)との関連

- (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、血漿ホモステイン値

MTHFR遺伝子多型 n	血漿ホモステイン値 ( $\geq 14\text{nmol/mL}$ )				血清葉酸値 ( $< 4\text{ng/mL}$ )			
	全体 (65)	CC (19)	CT (32)	TT (14)	全体 (65)	CC (19)	CT (32)	TT (14)
介入前 n (%)	2 (3.1)	0	0	2 (14.3)	6 (9.2)	0	3 (9.4)	3 (21.4)
介入後 n (%)	2 (3.1)	0	0	2 (14.3)	1 (1.5)	0	0	1 (7.1)
$p^2)$	1.000			1.000	0.115		0.238	0.596
<b>動脈硬化症の予防のカットオフ値 (<math>\geq 10\text{nmol/mL}</math>)</b>								
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				

$p^1)$  遺伝子多型群間の差 Pearsonの $\chi^2$

$p^2)$  介入前後の差 Fisherの直接確率法

## **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

**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 chemiluminescent enzyme immunoassay method, 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 249 $\mu$ g 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 nmol /mL) 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.

**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 PtGlu<sub>1</sub> 200µg/day.

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

## 第 5 章

### 総括

20 世紀前半に巨赤芽球性貧血に有効な葉酸が発見され、20 世紀後半には葉酸と NTDs リスク低減に関する疫学研究、さらに動脈硬化、認知症との関連が報告され、葉酸の重要性が注目されている。わが国の葉酸の食事摂取基準では、まず、巨赤芽球性貧血を予防するための食事性葉酸摂取量が示され、2000 年には厚生省（現厚生労働省）から「神経管閉鎖障害予防のために、妊娠可能な年齢の女性に対して妊娠 1 か月以上前から妊娠 3 か月までの間、食品からの摂取に加え、いわゆる栄養補助食品から葉酸 400 $\mu$ g/日の摂取を推奨する」通知が出された。通知後 20 年近くになるが、NTDs の発症率に低下がみられない。国民健康・栄養調査によると、ここ 10 年、葉酸の平均摂取量は食事摂取基準の推奨量に達していない。また、日本人は、サプリメントに対する抵抗感が強く、疾病予防のために積極的に摂る習慣がない。なお、葉酸代謝は MTHFR 遺伝子多型 C677T により差がある。わが国では、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の関連をみた介入試験は少なく、葉酸を添加したプロバイオティクス食品による介入試験は見当たらない。

そこで本研究では、妊娠可能な年齢にある女子大学生を対象に、NTDs のリスク低減を中心に、葉酸・NTDs に対する知識と葉酸摂取量の関連を明らかにし、葉酸添加（PtGlu<sub>1</sub> 200  $\mu$ g）ビフィズス菌発酵乳（葉酸添加発酵乳）による介入試験を行い、NTDs、巨赤芽球性貧血、動脈硬化症等予防も含めて、

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を検討し、妊娠可能な女性への葉酸摂取に対する問題点を明らかにすることにした。

研究 1 では、女子大学生 337 名（新入生と 3・4 年生）を対象に、サプリメントのアンケート調査、FFQ による食事頻度調査を行い女子大学生の葉酸・NTDs の知識を把握し、葉酸摂取量、食物消費構造との関連について検討した。その結果、新入生は、約 70%が「葉酸という栄養素」を知っていた。しかし、「NTDs の知識」および「厚生労働省からの通知」、「厚生労働省から通知量」については、ほとんど知らなかった。これは、一般の女性と同等の知識レベルと推測された。一方、ほとんどの上級生は「葉酸という栄養素」および「NTDs の知識」は有していた。しかし、「厚生労働省からの通知」、「厚生労働省から通知量」に関する知識はなかった。上級生は葉酸、NTDs の知識があり、教育の効果が示された。しかし、対象者が女子大学生で、妊娠する可能性が低く、当事者感・緊迫感がないため、NTDs の通知、葉酸の通知量は認知していなかった。また、葉酸、NTDs の知識および葉酸摂取の自己評価と葉酸摂取量との間には、関連が認められなかった。成人女性の推定平均必要量（200 $\mu$ g/日）を下回る不足の者の割合は約 40%であった。

食物摂取構造解析からみると、女子大学生の食生活は、第 1 因子として「副食パターン」、第 2 因子として「主食パターン」が抽出された。「副食パターン」に関連した食品群には、葉酸供給源食品（野菜類、豆類、果実類）、藻類、いも類、魚

介類が示されていた。また、葉酸 240 $\mu\text{g}$  以上を摂取した群では、葉酸をはじめ、エネルギーおよびその他の栄養素の摂取量は良好であったことから、葉酸供給源食品だけでなく、さまざま食品を摂取することが葉酸摂取の増加につながっていた。すなわち、NTDs 予防に関する情報は、これまで以上の啓発・普及と食事全体の質、量（食品バランス）の摂り方の教育が重要であることが示唆された。

次に、本研究では女子大学生 143 名を対象に MTHFR 遺伝子多型 C677T で層化し、低用量の葉酸添加発酵乳、PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu\text{g}$  を含む）の食品を付加するランダム化比較対照試験を行った。MTHFR 遺伝子多型別割付は、投与群 73 名（CC 群 16 名、CT 群 41 名、TT 群 16 名）、対照群 70 名（CC 群 20 名、CT 群 34 名、TT 群 16 名）である。投与群には PtGlu<sub>1</sub> 200  $\mu\text{g}$ /100mL を添加した葉酸添加発酵乳 100mL を毎日 4 週間飲用してもらい、対照群にはこれまで通りの食生活をしてもらった。血清葉酸値を測定して、NTDs 発症リスク低減に有用であるか否かの検討を行った。

MTHFR 遺伝子多型の頻度は、CC 25.2%、CT 52.4%、TT 22.4%であった。葉酸摂取量は全体で 246 $\mu\text{g}$ /日であり、葉酸推定平均必要量の（EAR 200 $\mu\text{g}$ /日）の不足の者の割合は 3 人に 1 人であった。葉酸摂取量と血清葉酸値は介入後において相関がみられた。

投与群の血清葉酸値は全体で介入前 9.8ng/mL から介入後は 14.7ng/mL となり、ベースライン時に比べ 1.5 倍有意に上昇していた。その内訳は CC、CT は 1.5 倍、TT は 1.4 倍と上

昇していたが有意差はなかった。遺伝子多型群間の比較では、CC 群>CT 群>TT 群であり TT 群が低値であった。女子学生は、2 例を除き巨赤芽球性貧血の血清葉酸下限カットオフ値（4 ng/mL）を超えており、葉酸の栄養状態はほぼ満足できるものであった。NTDs 発症リスク低減のカットオフ値とされている血清葉酸値 7ng/mL 未満の者は、全体では介入前は 19 名/143 名（13.3%）であった。TT 型は 4 人に 1 人に NTDs リスクが示唆された。介入後においては、投与群 73 名では 10 名（13.7%）→2 名（2.7%）に減少した。その内訳は CC 型 0 名、CT 型 6 名→1 名、TT 型 4 名→1 名であった。介入後のこの 2 名の血清葉酸値は、カットオフ値をわずかに下回るものであった。葉酸添加発酵乳を摂取した投与群では、いずれの MTHFR 遺伝子多型群においても血清葉酸値は有意に上昇し、NTDs リスクを低減しうることが分かった。

2010 年の日本人の食事摂取基準から体内の葉酸栄養状態を表す生体指標（巨赤芽球性貧血）として、短期的な指標である血清中葉酸ではなく、中・長期的な指標である赤血球中葉酸値（300nmol/L 以上）、血漿ホモシステイン値（14nmol/mL 未満）を用い、その値の維持を参考にして葉酸摂取量が策定された。

研究 3 においては、女子学生 65 名を対象に葉酸添加発酵乳（PtGlu<sub>1</sub> 200 μg を含む）を付加してシングルアーム介入試験を行い、血漿ホモシステイン値を測定し巨赤芽球性貧血、動脈硬化症のリスク低減の有用性を MTHFR 遺伝子多型別に評価した。

血漿ホモシステイン値は介入前 8.0 nmol/mL で CC、CT<TT の順に TT 型が有意に高値であった。葉酸添加発酵乳付加により介入後は 6.2nmol/mL で 22%の有意な低下がみられた。遺伝子多型別においても、CC 型 19%、CT 型 21%、TT 型 28% と有意に低下したが、遺伝子多型間には差はなかった。巨赤芽球性貧血の血漿ホモシステインカットオフ値 14nmol/mL 以上のリスク者は、介入前後いずれも 2 名であった。このことから、女子大学生の巨赤芽球性貧血に対する葉酸の栄養状態はほぼ良好であった。動脈硬化症予防の血漿ホモシステインのカットオフ値（10nmol/mL 未満）を用いてカットオフ値以上のリスク者を評価すると、介入前には 9 名（13.8%）のリスク者があったが、葉酸添加発酵乳付加により 2 名（3.1%）に減少した。遺伝子多型で見ると介入前は CC 型 2 名、TT 型 7 名であった。介入後は TT 型 2 名に減った。動脈硬化症のリスク低減に PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g の付加が有用であることが示唆された。

研究 1~3 の結果を総括すると、妊娠可能な女子大学生の葉酸、NTDs に対する認知、知識は十分ではなかった。NTDs 予防は妊娠前の葉酸を含めた栄養状態が重要であることから、積極的な教育、知識の啓発・普及が必要であると考えられた。また、巨赤芽球性貧血においては、女子大学生は葉酸の栄養状態がほぼ良好であった。NTDs、動脈硬化症は、葉酸推奨量 + 葉酸添加発酵乳（PtGlu<sub>1</sub> 200 $\mu$ g/100 mL/日）の摂取でリスク低減が可能であった。このことから、まずは食事の栄養アセスメントを行い、その上でバランスのとれた食事指導を行

い、特に NTDs、動脈硬化症のリスク低減のためには、低用量（PtGlu<sub>1</sub>200μg）の葉酸添加食品などの勧奨が効果的であることが示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、調査に協力して頂いた名古屋学芸大学管理栄養学部の学生の皆様に深く感謝します。

本研究を進めるうえで、遺伝子解析では本学藤木理代教授に多大なご指導、ご支援を頂きました。

大学院入学以来 4 年間、研究計画、調査の実施、英文指導をはじめ、原著論文執筆、学術雑誌への投稿に至るまで、終止変わらぬ熱心なご指導およびご鞭撻を頂きました本学徳留裕子教授、北川元二教授に深く感謝し心よりお礼申し上げます。

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

1. 研究 1 用

サプリメントに関するアンケート調査票

No.1-1

「葉酸に関する研究」において、食事調査資料の使用ならびにアンケート調査協力へ同意します。

1. 同意します 2. 同意しません

サプリメントに関するアンケート調査

名古屋学芸大学 公衆栄養学研究室  
徳留 裕子

サプリメントに関するアンケート調査を行うことにしました。  
お忙しい中、大変恐縮ですが、アンケートにご協力くださるようお願いいたします。

学籍番号( ) 年齢( ) 性別：女・男 喫煙：有、無（1カ月以内）  
住居形態：一人暮らし・実家通い・その他( ) 飲酒：有、無（1カ月以内）

「このアンケートのサプリメントは錠剤、カプセル、顆粒、ドリンク状のビタミン・ミネラルのことで。」

- 1、サプリメントを摂取していますか。  
①摂取している ②摂取していない
- 2、サプリメントを摂取しない理由は何ですか。  
①栄養は食品から  
②お金が高いから  
③副作用があるから  
④サプリメントに興味がない  
⑤その他

3、葉酸および神経管閉鎖障害についてお答えください。

- 3-1、葉酸という栄養素を知っていますか。  
①はい ②いいえ
- 3-2、葉酸はどのような食品に含まれているか知っていますか。  
①はい ②いいえ
- 3-3、必要な葉酸を食事から摂ることができていると思いますか。  
①十分摂れている。  
②大体取れている。  
③取れていない。



3-4、神経管閉鎖障害という病気を知っていますか。

- ①はい ②いいえ

3-5、厚生労働省の神経管閉鎖障害発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取を推奨する通知を出したのを知っていますか。

- ①はい ②いいえ

3-6、神経管閉鎖障害発症リスク低減のために勧められている葉酸栄養補助食品の摂取量を知っていますか。

- ①知っている  
②知らない

3-7、神経管閉鎖障害発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取の開始時期はいつだと思いますか。

- ①妊娠1ヶ月くらい前  
②妊娠直後  
③妊娠3ヶ月  
④妊娠中期（4～7ヶ月）  
⑤妊娠後期（7ヶ月以降）  
⑥知らない

3-8、神経管閉鎖障害発症リスク低減のための葉酸栄養補助食品の摂取の終了時期はいつだと思いますか。

- ①妊娠1ヶ月くらい前  
②妊娠直後  
③妊娠3ヶ月  
④妊娠中期（4～7ヶ月）  
⑤妊娠後期（7ヶ月以降）  
⑥知らない

3-9、神経管閉鎖障害を予防するために、葉酸を摂取するなら、どのような摂取方法を望みますか。

- ①葉酸を多く含む食品から  
②サプリメントから摂りたい  
③食品とサプリメント、両方から摂りたい  
④葉酸添加食品から摂りたい

ご協力ありがとうございました。

2. 研究 1～3 用

資料 2

食物摂取頻度調査票 (FFQ)

No.2-1

ID

# 食物摂取頻度調査票

最近 1 ヶ月の食習慣についてお尋ねします。

この質問票はそれぞれの食品について、**食べる回数** および **1 回あたりの食べる量** についてお尋ねします。

食べる回数 : 1 ヶ月、1 週間、1 日当たりの単位で当てはまる回数を選んで、○印をつけてください。  
 1 回あたりの食べる量 : 各料理、食品について 1 回あたりに食べる量を、基準量を「1」として、  
 0.5 倍、0.8 倍、同量、1.5 倍、2 倍以上の中から選んで、○印をつけてください。

食習慣に関する調査票(記入例)

最近 1 ヶ月間の朝食・昼食・夕食・間食・夜食などを思い出して、記入漏れの内容にご回答ください

回答方法

- 1) 卵を 1 日おきに 1 個食べるならば ⇨ 食べる回数は「週に 3～4 回」  
 1 回あたりの食べる量は、「同量 (基準量と同じ)」にそれぞれ○印をつけます。
- 1) 牛乳を  
 毎朝コップ 1 杯、風呂上りに 1 杯飲むならば ⇨ 食べる回数は「1 日 2 回」  
 1 回あたりの食べる量は、「同量 (基準量と同じ)」にそれぞれ○印をつけます
- 3) アイスクリームをほとんど食べないならば ⇨ 食べる回数は「ほとんど食べない」  
 1 回あたりの食べる量は、「なし」にそれぞれ○印をつけます

食品名	食べる回数							1 回あたりの食べる量 (基準の目安量を基に)						
	食 ほ べ と な ん ど	月 に 1 ～ 3 回	週 に 1 ～ 2 回	週 に 3 ～ 4 回	週 に 5 ～ 6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以 上	基 準 量	な し	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 じ	1.5 倍	2 倍 以 上
1 卵	a	b	c	○	e	f	g	1 個	なし	0.5	0.8	○	1.5	2
2 牛乳	a	b	c	d	e	f	○	200ml	なし	0.5	0.8	○	1.5	2
3 アイスクリーム	○	b	c	d	e	f	g	個 100g	○	0.5	0.8	同量	1.5	2

**ご飯・味付けご飯・丼物**  
朝食、昼食、夕食、間食・夜食ごとにお答えください

	食品名 精白米以外を食べている方は その種類に○印を付けてください	食べる回数						1回あたりのたべる量（基準量を目安に）				
		食 ほ べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量
1	朝食 精白ご飯	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼 (140g)・(170g)・	( ) 杯			
2	その他のご飯（玄米、胚芽米、 麦飯、〔 〕付き米）	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
3	昼食 精白ご飯	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
4	その他のご飯（玄米、胚芽米、 麦飯、〔 〕付き米）	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
5	夕食 精白ご飯	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
6	その他のご飯（玄米、胚芽米、 麦飯、〔 〕付き米）	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
7	夜間食 精白ご飯	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			
8	その他のご飯（玄米、胚芽米、 麦飯、〔 〕付き米）	a	b	c	d	e	f	女性用・男性用・丼	( ) 杯			

**確認質問 1**

9	朝食は毎日食べますか。	1 ほぼ毎日食べる	2 時々食べない	3 ほとんど食べない	
10	朝食は、和食・パン食のどちらですか。	1 和食	2 和食が多い	3 パン食	4 パン食が多い
		5 どちらともいえない			

**パン類**

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	毎 日 2回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
11 食パン、ロールパン	a	b	c	d	e	f	g	6枚切り食パン1枚 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
12 クロワッサン	a	b	c	d	e	f	g	1個 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
13 菓子パン、あんパン	a	b	c	d	e	f	g	1個 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
14 調理パン、サンドイッチ、ピザ	a	b	c	d	e	f	g	1個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
15 パンにつけるバター	a	b	c	d	e	f	g	小さじ2杯 8g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
16 パンにつけるマーガリン	a	b	c	d	e	f	g	小さじ2杯 8g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

**めん類など**  
具については、それぞれの食品のところでお答えください。

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	毎 日 2回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
17 うどん、そうめん、きしめんなど	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
18 そば	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
19 スパゲティ	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
20 インスタント麺 （乾燥麺、カップ麺）	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
21 中華麺（ラーメン、焼きそば、 ちゃんぽんなど）	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
22 お好み焼き	a	b	c	d	e	f	g	1人前	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

**卵・牛乳・乳製品**

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と な い ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
23 卵	a	b	c	d	e	f	g	1個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
24 低脂肪牛乳	a	b	c	d	e	f	g	コップ1杯 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
25 普通（脂肪）牛乳	a	b	c	d	e	f	g	コップ1杯 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
26 濃厚（脂肪）牛乳	a	b	c	d	e	f	g	コップ1杯 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
27 カルシウム強化の牛乳・ヨーグルト	a	b	c	d	e	f	g	コップ1杯 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
28 スkimミルク	a	b	c	d	e	f	g	大匙3杯 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
29 乳酸菌飲料	a	b	c	d	e	f	g	紙パック1箱 100ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
30 ヨーグルト	a	b	c	d	e	f	g	カップ1個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
31 チーズ	a	b	c	d	e	f	g	スライスチーズ1枚 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
32 アイスクリーム	a	b	c	d	e	f	g	カップ1個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

**肉類・肉加工品**

33 確認質問2  
最近1ヶ月の肉の摂取頻度についてお答えください。

食べる回数							
食 ほ べ と な い ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以上	
a	b	c	d	e	f	g	

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と な い ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
34 鶏肉 （唐揚、照り焼き、筑前煮など）	a	b	c	d	e	f	g	唐揚2個 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
35 ひき肉 （ハンバーグ、肉団子、ギョウザなど）	a	b	c	d	e	f	g	ハンバーグ1人前 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
36 豚肉 （生姜焼き、とんかつ、炒め物など）	a	b	c	d	e	f	g	薄切り4枚 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
37 牛肉 （すき焼き、ステーキ、肉炒めなど）	a	b	c	d	e	f	g	薄切り4枚 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
38 ハム	a	b	c	d	e	f	g	1枚 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
39 ソーセージ	a	b	c	d	e	f	g	ウィンナーソーセージ 2本 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
40 ベーコン	a	b	c	d	e	f	g	1枚 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
41 レバー	a	b	c	d	e	f	g	1串 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

魚類

42 確認質問3  
最近1ヶ月の魚の摂取頻度についてお答えください。

食べる回数							
食べない	月に1~3回	週に1~2回	週に3~4回	週に5~6回	毎日1回	毎日2回以上	
a	b	c	d	e	f	g	

食品名	食べる回数							1回あたりの食べる量 (基準量を目安に)						
	食べない	月に1~3回	週に1~2回	週に3~4回	週に5~6回	毎日1回	毎日2回以上	基準量	なし	0.5倍	0.8倍	基準量と	1.5倍	2倍以上
43 さけ	a	b	c	d	e	f	g	中1切 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
44 うなぎ	a	b	c	d	e	f	g	蒲焼2切 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
45 青身の魚 (さば、いわし、あじ、ぶり、さわらなど)	a	b	c	d	e	f	g	中1切 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
46 赤身の魚 (まぐろ、かつおなど)	a	b	c	d	e	f	g	中1切 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
47 白身の魚 (たい、たら、かれいなど)	a	b	c	d	e	f	g	中1切 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
48 いか、たこ	a	b	c	d	e	f	g	さしみ1人前 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
49 えび、かに	a	b	c	d	e	f	g	えび中2尾 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

## 魚介類・魚介加工品

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と なん い ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	毎 日 2回 以上	基準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
50 しらすぼし	a	b	c	d	e	f	g	大さじ1杯 5g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
51 骨ごと食べる小魚 (ししゃも、めざし)	a	b	c	d	e	f	g	めざし1尾 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
52 ツナ油漬缶	a	b	c	d	e	f	g	大さじ山盛り1杯 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
53 たらこ、いくら	a	b	c	d	e	f	g	たらこ1/2本 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
54 かき	a	b	c	d	e	f	g	中2個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
55 あさり、しじみ等の貝類	a	b	c	d	e	f	g	あさり15個 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
56 さきいか、するめ	a	b	c	d	e	f	g	小皿1皿 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
57 さつま揚げ・黒はんぺん	a	b	c	d	e	f	g	1枚 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
58 かまぼこ、ちくわなど	a	b	c	d	e	f	g	ちくわ小1本 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

## 大豆・大豆製品

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 ほ べ と なん い ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	毎 日 2回 以上	基準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
59 豆腐（みそ汁の具として）	a	b	c	d	e	f	g	1杯分 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
60 豆腐（奴豆腐、湯豆腐）	a	b	c	d	e	f	g	1/3丁 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
61 生揚げ、がんもどき、 揚げだし豆腐など	a	b	c	d	e	f	g	生揚げ1枚 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
62 油揚げ	a	b	c	d	e	f	g	ずし揚げ 1/2枚	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
63 納豆、大豆	a	b	c	d	e	f	g	1人前 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
64 みそ（みそ汁、酢みそなど）	a	b	c	d	e	f	g	1杯 10g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
65 高野豆腐	a	b	c	d	e	f	g	乾1/2枚 10g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

## 緑黄色野菜

野菜類は「和え物」、「酢の物」、「サラダ」、「煮物」、「炒め物」、「揚げ物」などの他、「つけあわせ」などの野菜料理すべてを含みます。

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量（基準量を目安に）						
	食 べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1回	毎 日 2回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
66 ほうれん草、小松菜などの青菜	a	b	c	d	e	f	g	おひたし1皿 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
67 かぼちゃ	a	b	c	d	e	f	g	煮物3切 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
68 にんじん	a	b	c	d	e	f	g	輪切3cm 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
69 ブロッコリー	a	b	c	d	e	f	g	付け合せ3個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
70 ピーマン	a	b	c	d	e	f	g	1個 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
71 枝豆、さやいんげん	a	b	c	d	e	f	g	小鉢 1杯	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
72 トマト	a	b	c	d	e	f	g	中1/4個 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
73 野菜ジュース、トマトジュース	a	b	c	d	e	f	g	1缶 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
74 漬物（たくあん、青菜漬け）	a	b	c	d	e	f	g	小皿1皿 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

## 淡色野菜・きのこ類など

食品名	食べる回数							1回あたりの食べる量(基準量を目安に)						
	食 べ と ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以 上	基 準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
75 キャベツ	a	b	c	d	e	f	g	付け合せ用 せんキャベツ 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
76 大根(煮物や大根おろし)	a	b	c	d	e	f	g	小鉢1杯 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
77 ごぼう、たけのこ	a	b	c	d	e	f	g	きんぴら1皿 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
78 上記以外の淡色野菜(きゅうり、ナス、レタス、もやし、玉葱、白菜など)	a	b	c	d	e	f	g	酢の物、サラダ、 和え物など 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

79 切り干し大根	a	b	c	d	e	f	g	小鉢1杯 乾 10g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
80 しいたけ、シメジなどのきのこ類	a	b	c	d	e	f	g	生椎茸 1/5袋 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
81 ノンオイルドレッシング	a	b	c	d	e	f	g	大さじ1杯 15g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
82 ドレッシング	a	b	c	d	e	f	g	大さじ1杯 15g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
83 マヨネーズ	a	b	c	d	e	f	g	大さじ1杯 15g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

## いも類・海草・種実類・調味料

食品名	食べる回数							1回あたりの食べる量(基準量を目安に)						
	食 べ と ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以 上	基 準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
84 いも類(じゃがいも、里芋、さつまいも、山芋など)	a	b	c	d	e	f	g	じゃがいも1/2個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
85 こんにゃく	a	b	c	d	e	f	g	おでん1枚 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
86 焼きのり、味付けのり	a	b	c	d	e	f	g	1袋 2g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
87 ひじき、昆布	a	b	c	d	e	f	g	小鉢 1皿 40g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
88 わかめ	a	b	c	d	e	f	g	酢の物1皿 生 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
89 ごま	a	b	c	d	e	f	g	小さじ1/2杯 1g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
90 ピーナッツ、アーモンド	a	b	c	d	e	f	g	約20粒 15g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2



果実類

91 確認質問4 最近1ヶ月の果物の摂取頻度についてお答えください。	食べる回数						
	食べ ないと ない	月に 1~3 回	週に 1~2 回	週に 3~4 回	週に 5~6 回	毎日 1回	毎日 2回 以上
	a	b	c	d	e	f	g

\*印の果物は出まわり期の頻度でお答えください。

食品名	食べる回数							1回あたりの食べる量 (基準量を目安に)						
	食べ ないと ない	月に 1~3 回	週に 1~2 回	週に 3~4 回	週に 5~6 回	毎日 1回	毎日 2回 以上	基準量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 同 準 量 と	1.5 倍	2 倍 以上
92 みかん、オレンジ等柑橘類	a	b	c	d	e	f	g	みかん中1個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
93 みかん果汁100%ジュース	a	b	c	d	e	f	g	コップ1杯 200ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
94 柿*	a	b	c	d	e	f	g	中1/2個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
95 バナナ	a	b	c	d	e	f	g	中1本 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
96 りんご*	a	b	c	d	e	f	g	中1/2個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
97 いちご*	a	b	c	d	e	f	g	中8粒 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
98 キウイフルーツ	a	b	c	d	e	f	g	1/2個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
99 上記以外の果物 (もも、ぶどう、すいか、メロン、なしなど)	a	b	c	d	e	f	g	ももなら 1個 100g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

菓子類

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量 (基準量を目安に)						
	食 べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2回 以上	基準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
100 カステラ	a	b	c	d	e	f	g	1枚 30g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
101 せんべい、あられ	a	b	c	d	e	f	g	せんべい2枚 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
102 和菓子 (まんじゅうなど)	a	b	c	d	e	f	g	1個 50g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
103 ポテトチップス	a	b	c	d	e	f	g	30枚 25g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
104 ドーナツ	a	b	c	d	e	f	g	1個 60g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
105 チョコレート、チョコ菓子	a	b	c	d	e	f	g	板チョコ 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
106 クッキー	a	b	c	d	e	f	g	中3枚 20g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
107 洋菓子 (ケーキ、シュークリームなど)	a	b	c	d	e	f	g	小ケーキ1個 80g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2

飲み物類

食品名	食べる回数							1回あたりのたべる量 (基準量を目安に)						
	食 べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2回 以上	基準 量	なし	0.5 倍	0.8 倍	基 準 量 と 同 量	1.5 倍	2倍 以上
108 コーヒー (レギュラー、インスタント)	a	b	c	d	e	f	g	カップ1杯 160ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
109 紅茶	a	b	c	d	e	f	g	カップ1杯 160ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
110 コーヒーや紅茶の砂糖	a	b	c	d	e	f	g	スティック1本 5g	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
111 コーヒーや紅茶のフレッシュ	a	b	c	d	e	f	g	1個	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
112 ビタミンC強化の清涼飲料水	a	b	c	d	e	f	g	1缶 350ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
113 清涼飲料水	a	b	c	d	e	f	g	1缶 350ml	なし	0.5	0.8	同量	1.5	2
114 緑茶	a	b	c	d	e	f	g	1回に飲む量は、湯のみ ( ) 杯						

最近 1 ヶ月の「油脂」の摂取頻度についてお尋ねします。  
 油脂を使わないテフロン加工のフライパン料理は含めません。

食品名	食べる回数						
	食 ほ べ と な ん ど	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回	毎 日 2 回 以 上
115 揚げ物(天ぷら、フライ、唐揚げなど)	a	b	c	d	e	f	g
116 炒め物、ステーキ、ソテー、ムニエル	a	b	c	d	e	f	g
117 目玉焼き、卵焼き、オムレツなど	a	b	c	d	e	f	g
118 チャーハン、ピラフ	a	b	c	d	e	f	g
119 カレーライス	a	b	c	d	e	f	g

アルコール類

あなたはアルコール(酒)類を飲みますか、該当する回答を○で囲んでください

飲む 飲む

飲む方はどのくらいの頻度で飲みますか?

120

アルコールを飲む方は、 どのくらいの頻度で飲みますか?	月 に 1~3 回	週 に 1~2 回	週 に 3~4 回	週 に 5~6 回	毎 日 1 回 以 上
	a	b	c	d	e

お酒を飲む方におたずねします。あなたはどのような種類のお酒を平均して召し上がりますか。  
 この1ヶ月間で、1回に飲んだ平均的な量をお答えください。

種類	量	備考
日本酒	コップで( )杯	
カクテル	コップで( )杯	甘いカクテル全て
ビール	ジョッキ( )杯	大1杯=中0.8杯=小0.5杯で換算
ビール	コップで( )杯	缶ビールなどはコップ(200ml)に換算
ワイン(グラス)	グラスで( )杯	赤・白ワイン全て
しょうちゅう(水割り)	グラスで( )杯	
ウイスキーオンザロック	コップで( )杯	
ウイスキー 水(お湯)割り	コップで( )杯	
その他( )	コップで( )杯	

☆☆☆ ご協力ありがとうございました。 ☆☆☆

### 3. 研究 2～3 用

資料 3

#### 本研究の対象者への説明書

No.3-1

「女子学生の血清葉酸濃度とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）遺伝子多型ならびに葉酸摂取量との関連」についての説明書

【背景】葉酸について、2000年12月28日付で厚生省（現 厚生労働省）から、「神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」という通知が出された。通知の内容は、赤ちゃんの脳や脊椎の形成に関わる神経管の先天異常である神経管閉鎖障害の予防のために、妊娠初期までに栄養補助食品1日0.4mgの葉酸を摂取することを勧奨するというものでした。

欧米では、穀類などに葉酸を添加して、神経管閉鎖障害の予防に一定の効果を上げています。一方、最近の女性の食生活は瘦身志向、野菜摂取不足、不規則な生活からくる欠食などから、葉酸摂取不足が懸念されています。

#### 1. 研究の目的

研究は、本学女子学生を対象にした研究Ⅰと研究Ⅱより成り立っています。

研究Ⅰでは、葉酸摂取量と食習慣、血清葉酸濃度、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）遺伝子多型などを調べ、葉酸の栄養状態とその要因について検討します。

研究Ⅱでは、血清葉酸濃度が低い学生ならびに葉酸摂取が十分でない学生を対象に、2群に分けて、葉酸強化食品（ヤクルトミルミルS）を摂取する群と強化されていない食品（ヤクルトミルミル）を摂取する群に割り付けて、その食品を4週間飲んでいただき、血清葉酸濃度への影響を評価します。

最終的には、葉酸の栄養状態（血清葉酸濃度）に関連する要因について検討し、実態に基づいた食育・栄養指導の方策について検討します。

なお、MTHFR 遺伝子多型は3つのタイプがあり、葉酸の代謝に関連しています。いわば、葉酸代謝に関する体質を示します。体質を知ることで、食生活の改善への意欲や理解を深めて、将来の赤ちゃんの先天異常である神経管閉鎖障害の予防に役立てていただきたいと思います。

#### 2. 調査方法

研究は、研究Ⅰと研究Ⅱより成り立っています。

##### 1) 研究Ⅰ：葉酸の栄養状態に関する横断研究

- ① 平成26年7月に、研究協力の同意が得られた女子学生（管理栄養士専攻）を対象に食習慣・食意識調査、食物摂取頻度調査（FFQ）、血液生化学検査（葉酸を含む）を行います。
- ② 葉酸摂取量、血清濃度、遺伝子多型、生活習慣等の関連を検討します。
- ③ 遺伝子多型の試料は、侵襲性の低い口腔粘膜です。

##### 2) 研究Ⅱ：4週間の短期介入試験

- ① 介入試験に同意が得られた方々を介入群、非介入群に割り付け、介入群にはヤクルトミルミルS（100ml中、葉酸200 $\mu$ g強化）を、非介入群には葉酸を含まないヤクルトミルミル飲料を4週間摂取してもらいます。
- ② 4週間の介入後、再度 FFQ、採血（血清葉酸値の測定）します。

なお、調査は、介入試験以外は平成26年度管理栄養学部学生セルフ・ヘルスプロモーション・プランの中で実施します。

### 3. 倫理的配慮

研究Ⅰ、研究Ⅱにおいて、それぞれにおいて同意書をいただきます。

知り得た個人情報については、個人が特定されないように配慮し、その取り扱いには十分注意して、研究目的（学術論文や学会での発表を含む）のみに使用させていただきますのでご理解、ご協力をお願いいたします。

遺伝子多型を含むすべてのデータは、個人が特定されないように ID 番号化し、個人情報が漏れないように厳重に管理いたします。

本調査について参加されなくとも、また、途中で中止されても、何ら不利益を被ることはありません。何かご不明なこと、ご質問等があれば、下記へご連絡ください。

### 記

#### 調査内容

1. 調査対象者 本学1年生ならびに他の学年の参加希望者
2. 研究Ⅰ
  - 1)食物摂取頻度調査
  - 2)食習慣調査
  - 3)血清葉酸濃度：採血（約4ml）
  - 4)メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）遺伝子多型：  
綿棒を使って口腔粘膜を採取して試料として、MTHFRの遺伝子多型をしらべます。
3. 研究Ⅱ
  - 1) 葉酸の介入試験：低葉酸摂取群について、介入群と対照群に無作為化割付して、介入群には葉酸 200 $\mu$ g が強化されている乳酸菌飲料（ヤクルトミルミルS）を、対照群は葉酸が強化されていない乳酸菌飲料（ヤクルトミルミル）を4週間飲んでいただきます。
  - 2) 血清葉酸濃度：介入4週間後に再度採血して測定します。
3. 調査期間：2014年 6月～10月（研究Ⅱの期間は学生に相談して決めます）
4. その他：平成26年度管理栄養学部学生セルフ・ヘルスプロモーション・プランで得られたデータとリンクして解析することがあります。
5. 研究責任者  
実施責任者：徳留裕子  
研究室 241 公衆栄養学研究室(2号館4階)  
Tel 0561-75-7111 Mail [tokudome@nuas.ac.jp](mailto:tokudome@nuas.ac.jp)



2014年7月12日（土）

「女子学生の血清葉酸濃度とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）遺伝子多型  
ならびに葉酸摂取量との関連」についての説明書（簡易版）

1. 女子学生の「血清葉酸濃度と葉酸の代謝に関連のあるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子多型ならびに葉酸摂取量との関連について」研究しています。
2. まず、血清葉酸濃度、遺伝子多型、葉酸摂取量などの実態調査を行います。
3. 先日、早戸先生・立花先生の授業時間に、詳細な研究内容について文書と口頭で説明し、同意書を頂きました。そして、意識調査と食物摂取頻度調査を済ませ、現在、調査票の確認をしているところです。
4. 今日は、女子学生を対象に血清中葉酸濃度を測定するための採血と遺伝子多型を検査するために口のなかの粘膜を採取させて貰います。採血は、今日の健康調査の採血に組み込まれているもので、特別に行うものではありません。  
遺伝子多型のための粘膜試料は、お口のほほの粘膜を複数回擦るだけで採取できます。いずれも大きな負担はないので安心してください。
5. 男子学生については、すみませんが、今日の検査には参加できません。先日、お願いした食物摂取頻度調査の結果についてはお返しいたします。女子学生には食物摂取頻度調査、血清葉酸濃度、遺伝子多型の結果について、個人にお知らせいたします
6. 遺伝子多型を含むすべてのデータは、個人が特定されないように番号化し、個人情報が入らないように厳重に管理いたします。研究目的のみに使用させていただきます。
7. 同意書は頂いていますが、途中で中止されても、何ら不利益を被ることはありません。  
しかし、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子多型、血清葉酸濃度などめったに知る機会はありません。将来の赤ちゃんの健康、自分の健康に役立てることが出来ますので、最後までご協力をお願いいたします。
8. この調査終了後、一部の女子学生を対象に、葉酸強化食品（ヤクルトミルミル S：葉酸 200 $\mu$ g 強化）を4週間摂取してもらい、葉酸の栄養状態への影響を評価する介入試験を計画していますが、対象学生への説明と同意書については別途行います。

## 記

目的：血清葉酸濃度、遺伝子多型、葉酸摂取量などの実態調査

対象者：1年女子学生

実施内容：採血（血清葉酸濃度）

口腔粘膜採取（遺伝子多型）

食物摂取頻度調査票記入漏れなど確認

以上

## 同意書

名古屋学芸大学管理栄養学部 徳留 裕子 殿

私は、研究内容について口頭並びに文書で説明を受け、その内容を十分理解しました。

私は、本研究「女子学生の血清中葉酸濃度と葉酸摂取量および Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T 遺伝子多型との関連」のために、研究に参加することを同意します。

氏名(学籍番号) \_\_\_\_\_

ご本人の住所 \_\_\_\_\_

同意年月日 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

## 4. 学生への結果報告

## 結果報告

No.4-1

## 「葉酸に関する研究」のご報告



学籍番号 氏名 様

このたびは、「女子学生の血清葉酸濃度とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)遺伝子多型ならびに葉酸摂取量との関連（略称：「葉酸に関する研究」）」にご協力いただき、ありがとうございました。

7月から12月にかけて実施いたしました研究の結果をご報告します。

<内容>

1. 葉酸代謝にかかわる遺伝子について
2. 血清葉酸濃度の推移(7月と10~12月の採血の結果)  
コラム 葉酸について&葉酸を摂取するためのアドバイス

今後の生活で参考にさせていただければ幸いです。

名古屋学芸大学 管理栄養学部  
公衆栄養学研究室 徳留 裕子



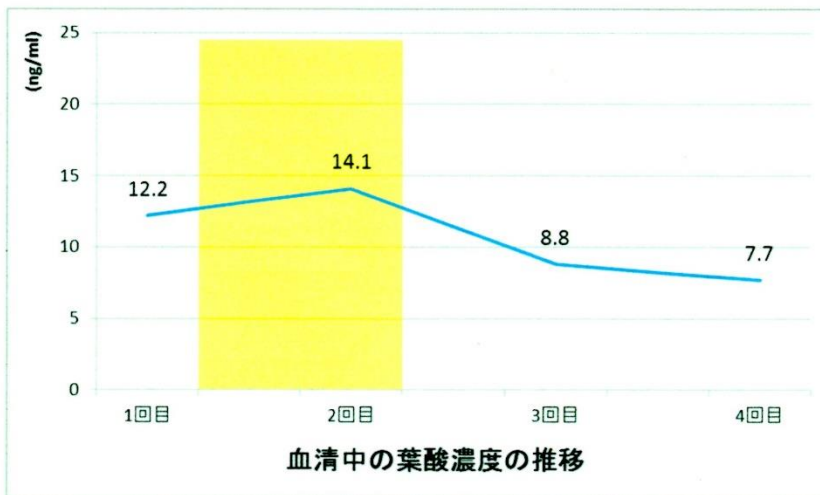
1. 葉酸代謝にかかわる遺伝子について 見本 花子さんの遺伝子タイプは TT 型でした。

葉酸は、食品中ではプテロイルポリグルタミン酸、血漿中ではメチルテトラヒドロ葉酸の形で存在しています。  
 食品中の葉酸(プテロイルポリグルタミン酸)を摂取すると、小腸において5-10メチレンテトラヒドロ葉酸に変換されます。核酸の合成にはこの5-10メチレンテトラヒドロ葉酸が利用されています。その後、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)によって5-10メチレンテトラヒドロ葉酸から5-メチルテトラヒドロ葉酸となり、ビタミンB12と一緒にホモシステインからメチオニンへの変換を行います。  
 今回解析した遺伝子は、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)を構成する遺伝子です。その配列のうち677番目の塩基がCからTに変異したものを調べています。

- CC型・・・葉酸の代謝が得意なタイプです。
- CT型・・・葉酸の代謝は普通のタイプです。
- TT型・・・葉酸の代謝があまり得意ではないタイプです。

2. 血清葉酸濃度の推移 (ng/ml)

採血した日	1回目 (7月12日)	2回目 (11月10日)	3回目 (11月24日)	4回目 (12月22日)
血清葉酸濃度	12.2	14.1	8.8	7.7




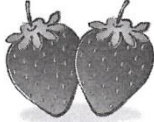


オレンジ色がついている部分は、あなたがミルミルを飲んだ期間を示しています。

介入辞退了の方) 今回は遺伝子解析とベースライン時の採血のみを行ったため、グラフの表示はありません。

3. 葉酸について&葉酸を摂取するためのアドバイス

葉酸の主な働きに、①赤血球の成熟(DNAの合成)、②アミノ酸の代謝が挙げられます。葉酸が十分に取れていないと、巨赤芽球性貧血や動脈硬化、高齢者では認知症になるリスクが高くなります。また、妊娠時に葉酸が不足すると、胎児の神経管閉鎖障害が起こりやすくなります。2000年に厚生省(現在の厚生労働省)から、「妊娠可能な年齢の女性に対して、妊娠1か月以上前から妊娠初期までの間、通常の食事に加え栄養補助食品で1日400 $\mu$ gの葉酸摂取を推奨する」旨の内容も通知されています。葉酸が多く含まれている食品は、肉類(レバー)、緑黄色野菜、果物です。

			
鶏レバー 100g 650 $\mu$ g	ほうれん草 100g 210 $\mu$ g	アスパラガス 100g 190 $\mu$ g	いちご 100g 90 $\mu$ g

ほうれん草やアスパラガス等、緑色の濃い野菜を1品つけてみてください。  
 なお、今回の調査で飲んでいただいたミルミルSは以下の栄養素が含まれています。



ミルミルS 100ml中の栄養量

エネルギー	49kcal	鉄	4mg
タンパク質	3.2g	ビタミンE	8mg
脂質	0.1g	ビタミンB <sub>6</sub>	1.2mg
炭水化物	10.6g	ビタミンB <sub>12</sub>	2.4 $\mu$ g
ナトリウム	40mg	葉酸	200 $\mu$ g
カルシウム	100mg	コラーゲン	100mg