

日本女子大学博士学位論文

動脈硬化の新規危険因子候補である高ホモシステイン血症の  
効果的な予防及び改善のための食事摂取法に関する研究

2014.3

荒木 理沙

## 目 次

序論 .....	1
第1章 日本人における高ホモシステイン血症の実態および血中ホモシステイン濃度 とホモシステイン代謝に関わる諸因子に関する検討	
[研究 1] 20 代勤労男性における検討	
1-1. 緒言 .....	4
1-2. 対象 .....	5
1-3. 方法 .....	5
1-4. 結果 .....	9
1-5. 考察 .....	12
1-6. 要旨 .....	16
1-7. 図表 .....	17
[研究 2] 30～40 代勤労男性における検討	
2-1. 緒言 .....	23
2-2. 対象 .....	23
2-3. 方法 .....	24
2-4. 結果 .....	25
2-5. 考察 .....	27
2-6. 要旨 .....	29
2-7. 図表 .....	30
[研究 3] 2 型糖尿病患者における検討	
3-1. 緒言 .....	35
3-2. 対象 .....	35
3-3. 方法 .....	36
3-4. 結果 .....	37
3-5. 考察 .....	42
3-6. 要旨 .....	47
3-7. 図表 .....	48
第 1 章 結語 .....	55

## 第2章 葉酸とビタミン B<sub>2</sub>の相互作用がホモシステイン代謝に及ぼす影響に関する検討

### [研究 4] 若年成人男性における葉酸、ビタミン B<sub>2</sub>サプリメント短期投与のホモシステイン代謝指標に対する影響

4-1. 緒言	57
4-2. 対象	57
4-3. 方法	58
4-4. 結果	60
4-5. 考察	63
4-6. 要旨	66
4-7. 図表	67

### [研究 5] ラット肝細胞培養上清中ホモシステイン濃度、葉酸濃度に及ぼす 5-メチルテトラヒドロ葉酸またはテトラヒドロ葉酸とビタミン B<sub>2</sub>、メチオニンの影響

5-1. 緒言	73
5-2. 培養条件設定	74
5-3. 本実験	
5-3-1. 方法	76
5-3-2. 結果	77
5-3-3. 考察	79
5-3-4. 要旨	84
5-3-5. 図表	85

第 2 章 結語	90
----------	----

総括	92
----	----

Summary	95
---------	----

参考文献	98
------	----

謝辞	108
----	-----

## 序論

血中ホモシステイン(Hcy)濃度の上昇は、血管内皮障害や平滑筋細胞増殖を介して動脈硬化促進的に作用することが報告されている<sup>1,2)</sup>。また、Hcy 濃度高値と認知機能障害<sup>3)</sup>や悪性腫瘍<sup>4)</sup>との関連も示唆されており、前者は脳の微小血管障害や酸化ストレス増大による脳の萎縮<sup>3)</sup>、後者は低葉酸状態に起因する DNA の低メチル化<sup>4)</sup>が原因と考えられている。

欧米諸国では高 Hcy 血症が動脈硬化の危険因子とされている<sup>5)</sup>。一方、日本の動脈硬化性疾患予防ガイドラインでは、Hcy は動脈硬化性疾患の確立された危険因子ではなく、その他の考慮すべき因子とされている<sup>6)</sup>。

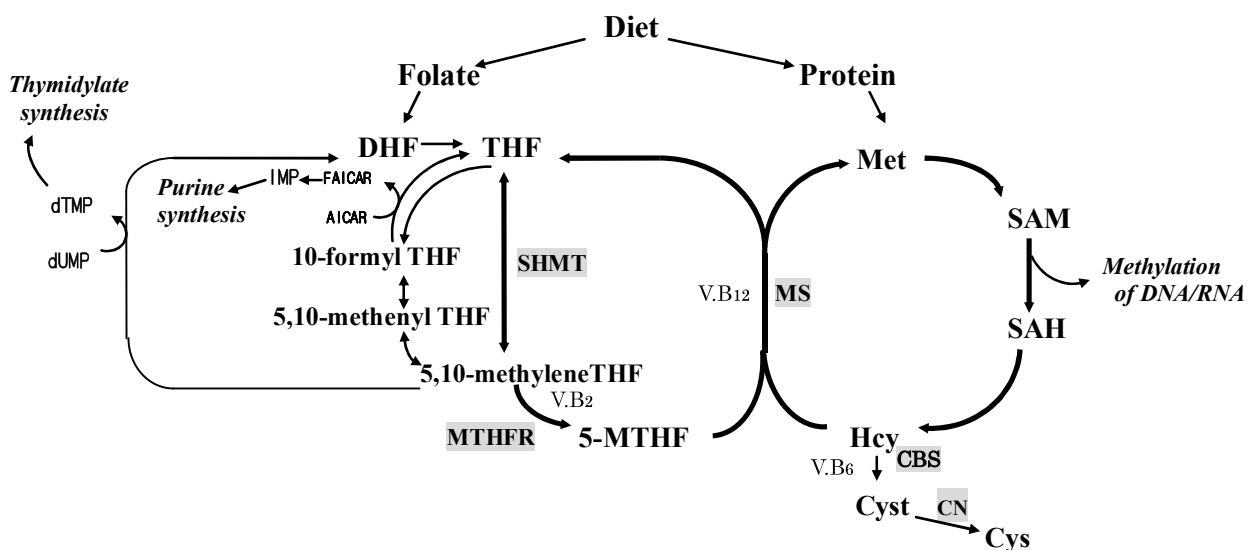


図1. ホモシステイン代謝

**DHF** = dihydrofolate; **THF** = tetrahydrofolate; **5-MTHF** = 5-methyltetrahydrofolate;  
**5,10-methylene THF** = 5,10-methylenetetrahydrofolate;  
**5,10-methenyl THF** = 5,10-methenyltetrahydrofolate; **10-formyl THF** = 10-formyltetrahydrofolate  
**Hcy** = homocysteine; **Met** = methionine; **SAM** = s-adenosylmethionine; **SAH** = s-adenosyl homocysteine  
**Cyst** = cystathionine; **Cys** = cysteine; **dUMP** = deoxyuridine monophosphate  
**dTMP** = deoxythymidine monophosphate; **AICAR** = 5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleotide;  
**FAICAR** = 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; **IMP** = inosine monophosphate;  
**SHMT** = serine hydroxymethyltransferase; **MTHFR** = methylenetetrahydrofolate reductase;  
**MS** = methionine synthase; **CBS** = cystathionine β-synthase; **CN** = cystathionase



Hcy はメチオニンの中間代謝産物であり、図 1 のように、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) からメチル基を供与された後、ビタミン B<sub>12</sub> (V.B<sub>12</sub>) 依存性のメチオニン合成酵素の作用を受け、再びメチオニンへと代謝される再メチル化経路と、ビタミン B<sub>6</sub> (V.B<sub>6</sub>) 依存性のシスタチオニン合成酵素、シスタチオナーゼの作用でシスタチオニン、システインに変換された後、尿中へと排泄される硫黄基転移経路により平衡を保っている<sup>1)</sup>。空腹時血漿 Hcy 濃度は主に再メチル化経路の影響を受けるとされている<sup>7)</sup>が、メチル基供与体となる 5-MTHF は、食事由来の葉酸がフラビンアデニンジヌクレオド (FAD) を補酵素とする 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) の作用を受けて産生される。

血漿 Hcy 濃度は、高齢者<sup>8)</sup>や男性<sup>9)</sup>のほか、Hcy 代謝に関わる MTHFR<sup>10)</sup>やシスタチオニンβ合成酵素<sup>11)</sup>、メチオニン合成酵素<sup>12)</sup>等の欠損および遺伝子変異を有する対象で高値を示すことが報告されている。遺伝素因のうち、血清葉酸濃度を規定する MTHFR 遺伝子 C677T 多型と血漿 Hcy 濃度の関連については、これまでに多数報告されている<sup>10,13,14)</sup>。MTHFR 遺伝子 677C>T 多型は、塩基配列 677 番目のシトシンからチミンへの点変異の有無により野生型の CC 型、変異ヘテロの CT 型、変異ホモの TT 型の 3 つに分類される<sup>15)</sup>。各多型が人口に占める割合は CC 型が約 50%、CT 型が約 40%、TT 型が約 10%とされており<sup>16)</sup>、TT 型では補酵素である FAD を解離しやすいために酵素活性が低く、CC 型に比べて血清葉酸濃度が低く、血漿 Hcy 濃度が高くなりやすいことが報告されている<sup>17)</sup>。

また、血漿 Hcy 濃度の高値には、葉酸をはじめとするビタミンの代謝に影響する薬剤の服用<sup>18,19)</sup>や胃酸分泌量の低下<sup>20)</sup>、消化器官の異常にともなう吸収不良<sup>21)</sup>および肝障害による貯蔵不良<sup>22)</sup>、エネルギー代謝の亢進にともなう消費量の増大<sup>23)</sup>のほか、腎機能異常にともなう排泄障害<sup>24)</sup>、喫煙<sup>25)</sup>や飲酒<sup>26)</sup>習慣等が影響することも明らかとなっている。

ただし、血漿 Hcy 濃度はメチオニンおよび葉酸や V.B6、V.B12 摂取の影響を受けやすく、前述した因子を有する場合にも、食事やサプリメントによる血漿 Hcy 濃度の改善が可能と考えられている<sup>10, 14, 24)</sup>。

また、欧米諸国での疫学調査や介入研究において、葉酸の主な供給源である野菜類の摂取量と血漿 Hcy 濃度の逆相関関係が認められている<sup>27-29)</sup>。国民健康・栄養調査報告では、平成 23 年の日本人の野菜類摂取量は平成 13 年に比べて少なく、特に 20-40 歳代の野菜類摂取量が少ないとされており<sup>30)</sup>、日本でも将来的に高 Hcy 血症者が増加する可能性が危惧される。しかし、現時点では日本人の血漿 Hcy 濃度に関するデータは少ない<sup>31)</sup>。血清葉酸濃度についても、神経管閉鎖障害予防の観点から若年女性を対象とした検討<sup>32)</sup>は実施されているものの、女性に比べて動脈硬化のリスクが高いとされる男性<sup>33)</sup>や糖尿病患者<sup>34)</sup>の Hcy 代謝指標について、食習慣や遺伝素因の関連をあわせて検討した報告はない。

そこで、高 Hcy 血症に対する予防的措置を講じるために、日本人の血漿 Hcy 濃度と血清ビタミン濃度の実態を把握し、高 Hcy 血症の効果的な予防および改善のための食事摂取法について検討することを本研究の目的とした。本研究は 2 章[研究 1-5]からなり、ヒトを対象とした調査研究[研究 1-3]、介入研究[研究 4]および培養細胞を用いた実験的研究[研究 5]で構成される。

## 第1章 日本人における高ホモシステイン血症の実態および血中ホモシステイン濃度とホモシステイン代謝に関わる諸因子に関する検討

### [研究1]20代勤労男性における検討

#### 1-1. 緒言

わが国では葉酸の主な供給源である野菜類の摂取量が特に20-40歳代で少なく<sup>30)</sup>、若年者を中心に葉酸不足を介して血漿 Hcy 濃度が高くなりやすい可能性が危惧される。男性は女性に比べて動脈硬化のリスクが高いとされており<sup>33)</sup>、特に若年成人男性の高 Hcy 血症予防について検討する意義は大きいと考えられる。しかし、国内外において、若年成人男性の Hcy 代謝指標に着目した検討はほとんどない<sup>35,36)</sup>。高知県の地域住民を対象とした調査<sup>37)</sup>では、20代勤労男性は他の年代に比べて血清葉酸濃度が最も低く、血漿 Hcy 濃度が最も高かったことが報告されているが、野菜類をはじめとする食品摂取状況との関連は検討されていない。

なお、葉酸は野菜類以外の食品にも含まれている。地域住民を対象とした JPHC Study<sup>38)</sup>において、東北・北陸地方を調査地域としたコホートⅠでは男女とも「ほうれん草」、中部以西および北関東を調査地域としたコホートⅡでは男性で「キャベツ」、女性で「緑茶」から最も多く葉酸を摂取しており、葉酸供給源となりやすい食品群は居住地域や性別によって異なるものと考えられる。したがって、若年成人男性の高 Hcy 血症予防を目指す食事について検討する際には、野菜類だけでなく、若年成人男性の葉酸供給源となりやすい食品群や Hcy 代謝に影響するその他のビタミン供給源の摂取状況との関連を明らかにすることが重要と考えられる。

そこで、若年成人男性における血漿 Hcy 濃度と、血漿 Hcy 濃度に特に大きく影響する血清葉酸および V.B12 濃度の現状を把握するとともに、食習慣や遺伝素因との関連を検討することを目的とした横断調査を実施した。

## 1-2. 対象

首都圏在住かつ都内某総合商社の入社健診および入社 5 年目健診受診者のうち、服薬治療中の疾患がある者を除外し、書面によるインフォームドコンセントの得られた 22～30 歳日本人男性 142 名を対象として身体計測、食事・生活習慣調査、血液検査を実施した。なお、本研究は、日本女子大学「ヒトを対象とした実験研究に関する倫理委員会」の承認を得て実施した。

## 1-3. 方法

### 1-3-1. 身体計測

身長、体重を測定し、Body Mass Index (BMI) = 体重(kg) / 身長(m)<sup>2</sup> を算出した。

### 1-3-2. 血液生化学検査

早朝空腹時採血を行ない、遠心分離(4℃、1100×*g*、15 分)にて得られた血清を用いて尿酸(UA)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)、トリグリセライド(TG)、総コレステロール(TC)、HDL コレステロール(HDL-C)を酵素法<sup>39)</sup>で測定し、LDL コレステロール(LDL-C)は Friedewald の計算式<sup>40)</sup>  $LDL-C = TC - \{HDL-C \times (TG/5)\}$  で求めた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)は JSCC 標準化対応法<sup>41)</sup>で測定した。

### 1-3-3. 血漿 Hcy 濃度および血清ビタミン濃度

早朝空腹時採血を行ない、遠心分離(4℃、1100×*g*、15 分)にて NaF/EDTA・2Na 血漿と血清を得た。血漿 Hcy 濃度は、蛍光試薬として 7-フルオロベンゾフラザン-4-スルホン酸アンモニウム塩を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法<sup>42)</sup>により、遊離型、酸化型、蛋白結合型の合計である総 Hcy 濃度として測定した。分析には

Shimadzu HPLC system (島津製作所)を用い、カラム温度 40°C、流速 1ml/分、蛍光検出(励起波長 385 nm、蛍光波長 515 nm)、カラムは資生堂の CAPCEL PAK C18 UG120 (4.6 mm I.D. × 100 mm)、移動相は 0.1M リン酸二水素カリウム溶液(含 5%メタノール、pH2.7)で分析した。

血清葉酸および V.B12 濃度は、自動測定装置 Chemilumi-ACS180 (バイエルメディカル株式会社)を用い、電気化学発光免疫法<sup>43)</sup>による測定を行なった。

#### 1-3-4. MTHFR 遺伝子多型

EDTA・2Na 加血から DNA 抽出キット (Gen とるくん、宝酒造バイオ株式会社)を用いて DNA を抽出した後、Hinf I を用いた PCR-RFLP 法<sup>45)</sup>にて塩基配列 677 番目における C→T 変異の有無を判定し、野生型の CC、変異ヘテロ型の CT、変異ホモ型の TT に分類した。

#### 1-3-5. 食習慣

自記式質問紙法により、採血前 1 ヶ月間における食品群別食物摂取頻度を調査し、面接による聞き取り確認の後回収した。血漿 Hcy 濃度は食事摂取等による個人内変動が大きく<sup>45)</sup>、先行研究においても、サプリメント投与試験では 2 週間<sup>46)</sup>、食事介入試験では 4 週間<sup>47)</sup>で血漿 Hcy 濃度が変化している。そこで、本研究では、採血日の血漿 Hcy 濃度には採血前 1 ヶ月程度の食習慣が反映されと考え、調査期間を 1 ヶ月とした。

食品群別食物摂取頻度については、食品由来の栄養素摂取量と血漿 Hcy 濃度との関連を検討するのであれば、妥当性の検定された半定量食物摂取頻度調査法を用いるべきと考えられる。しかし、同一集団における事前のパイロットスタディの結果、対象とした若年成人男性の食品や料理に対する認識は低く、短時間でポーションサイ

ズを考慮した回答を得ることは不可能と思われたため、本調査では食品の種類と摂取頻度についてのみ調査することとした。

季節や産地が極めて限定される野菜や山菜等を除き、一般的に摂取可能な野菜の生可食部 100g 中の葉酸含量は 1~320  $\mu$ g である。このうち葉酸含量 100  $\mu$ g 以上を含む食品は 43 食品であり、それ以下のものは 85 食品であった。そこで、葉酸含量 100  $\mu$ g 以上の野菜を「葉酸の多い野菜」とし、そのうち、えだまめ、モロヘイヤ、ブロッコリー、ほうれん草、アスパラガス、春菊、京菜、大根(葉)、そらまめ、サニーレタス、オクラ、かぶ(葉)、小松菜、にらの 14 品目の野菜名と写真を例示した。また、葉酸含量 100  $\mu$ g 未満の野菜を「葉酸の少ない野菜」とし、そのうち、カリフラワー、キャベツ、さやえんどう、レタス、にがうり、ごぼう、赤ピーマン、チンゲンサイ、白菜、根深ねぎ、さやいんげん、かぶ、かぼちゃ、ブラックマッペもやし、たけのこ、大根、なす、セロリー、青ピーマン、きゅうり、にんじん、トマト、たまねぎ、れんこんの 24 品目の野菜名と写真を例示した。「野菜ジュース」は葉酸含量が特定できないため、独立して 1 項目とした。

野菜類以外の食品として「海藻」、「果物」、「納豆」、「豆腐」、「納豆・豆腐以外的大豆・大豆製品」、「大豆以外の豆・豆製品」、「卵」、「たらこ・明太子」、「レバー」、「肉類」、「脂身の多い肉」、「背の青い魚および赤身の魚」、「白身魚」、「チーズ」、「普通牛乳」、「低脂肪牛乳」、「ヨーグルト」、「揚げ物」、「炒め物」、「マヨネーズ・ドレッシングをつける料理」、「バター・生クリームを使った料理」、「種実類」、「いも類」、「きのこ・こんにゃく」、「アルコール」、「緑茶」、「総合ビタミン剤」、「栄養ドリンク」、「その他のサプリメント」の 29 項目を設定し、野菜類とあわせて全 32 項目について調査した。

なお、野菜類以外の食品群のうち葉酸含量が多いものは豆類では「納豆」、卵類では魚卵の「たらこ・明太子」、肉類では「レバー」であるため、これらの食品は独立した項目とした。

また、Hcy 濃度との関連を検討するにあたり、サプリメント類の摂取については詳細

に調査することが望ましいと考えられる。しかし、健診当日に自記式法で行なう調査では、サプリメント類の内容に関する正確な情報を得ることは難しいと考えられたことから、今回は、対象が認識できるであろう「総合ビタミン剤」、「栄養ドリンク」、「その他のサプリメント」に大別し、これらの利用有無と摂取頻度を確認するにとどめた。

なお、この調査では、葉酸の供給および代謝への影響が少ないと考えられる「砂糖及び甘味類」、「菓子類」、「調味料及び香辛料類」、「調理・加工食品」と、対象による頻度や摂取量に個人間変動が少ないと考えられる「穀類」については調査項目から除外した。

各食品の摂取頻度の「ほとんど食べなかった」を1点、「週1～2回」を2点、「週3～4回」を3点、「週5～6回」を4点、「毎日1回」を5点、「毎日2回」を6点、「毎日3回」を7点として得点化し、統計解析に用いた。

#### 1-3-6. 統計解析

MTHFR 遺伝子多型で調整した血漿 Hcy 濃度修正平均値の四分位群における血清葉酸およびV.B12濃度、食品群別食物摂取頻度の傾向性は、Jonckheere 検定で検定した。各群における MTHFR 遺伝子多型発現頻度および喫煙習慣の差の検定については、 $\chi^2$  検定を用い、事後比較には Bonferroni 法を用いた。データは平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。また、食品群別食物摂取頻度調査項目とした 29 食品群を用いて主成分分析を行い、食事パターンの抽出を行った。固有値 1 以上の因子について、Scree test および解釈可能性を考慮して因子数を決定し、因子負荷行列を単純構造に近付けるために直交回転(バリマックス法)をかけ、因子を意味付ける食品群は因子負荷量 0.5 以上とした。各因子を構成する変数の固有ベクトル値を係数として、対象ごとに主成分得点を算出した。その得点から全体の平均値を減じ、標準偏差で除して標準化した値を食事パターンスコアとして用いた。Hcy 代謝指標間および

Hcy 代謝指標と食事パターンスコアの相関関係の検討には単相関分析を用いた。

解析には SPSS Ver 12.0 for windows (IBM 株式会社)を用い、Jonckheere 検定については片側検定、その他の検定については両側検定で  $p < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

## 1-4. 結果

### 1-4-1. 20 代勤労男性における MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B12 濃度

対象全体の血漿 Hcy 濃度は  $9.1 \pm 6.9$  (Mean  $\pm$  SD) nmol/ml、血清葉酸濃度は  $7.0 \pm 2.4$  ng/ml、血清 V.B12 濃度は  $589 \pm 292$  pg/ml であり、MTHFR 遺伝子多型は CC 型 72 名、CT 型 56 名、TT 型 14 名であった。血漿 Hcy 濃度 12 ~100nmol/ml の軽度-中等度高 Hcy 血症<sup>48)</sup>を呈した者は全体で 14 名 (9.9%) であり、CC 型の 2.8%、CT 型の 8.9%、TT 型の 50%を占めていた。

図 1-1 に示したように、MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度は、CC 型  $7.2 \pm 2.3$  nmol/ml、CT 型  $8.7 \pm 4.4$  nmol/ml、TT 型  $20.1 \pm 15.3$  nmol/ml と、CC 型に比べて CT 型 ( $p < 0.05$ )、TT 型 ( $p < 0.01$ ) で高く、TT 型では CT 型よりもさらに高値であった ( $p < 0.01$ )。なお、本対象の血漿 Hcy 濃度の最高値は 55.9 nmol/ml で TT 型だった。

血清葉酸濃度は CC 型が  $7.3 \pm 2.2$  ng/ml と、CT 型の  $6.9 \pm 2.7$  ng/ml および TT 型の  $5.9 \pm 2.1$  ng/ml に比べて高値傾向を示した ( $p = 0.063$ 、 $p = 0.057$ )。血清 V.B12 濃度は、TT 型の  $456 \pm 181$  pg/ml に比べて、CC 型が  $602 \pm 336$  pg/ml、CT 型が  $613 \pm 246$  pg/ml と高値だった (いずれも  $p < 0.05$ )。

また、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度は CC 型、CT 型において逆相関を示し (いずれも  $p < 0.05$ )、TT 型では逆相関傾向 ( $p = 0.073$ ) にあった。しかし、血清 V.B12 濃度は、いずれの多型においても血漿 Hcy 濃度との相関を認めなかった。



#### 1-4-2. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度四分位群における、MTHFR 遺伝子多型 発現頻度と喫煙習慣

MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度に差がみられたため、MTHFR 遺伝子多型で調整した log 血漿 Hcy 濃度の四分位群で対象を分割した。各群における MTHFR 遺伝子多型発現頻度と喫煙習慣を表 1-1 に示した。

MTHFR 遺伝子多型により血漿 Hcy 濃度を調整した結果、MTHFR 遺伝子多型 TT 型 14 名は、第 1 四分位群に 57.1%が、第 3 四分位群に 7.1%が、第 4 四分位群に 35.7%が分布した。

喫煙習慣のある者は対象全体で 46 名 (32.3%)おり、このうち 1 日の喫煙本数が 20 本以上の者が 6 名 (4.2%)いた。各群の喫煙者割合に差はなく、血漿 Hcy 濃度と喫煙習慣の関連を認めなかった。

#### 1-4-3. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B12 濃度、血液生化学 検査成績、体格の関連

MTHFR 遺伝子多型で調整した log 血漿 Hcy 濃度の四分位群における血清葉酸濃度、血清 V.B12 濃度、血液生化学検査成績および体格を表 1-2 に示した。

血清葉酸濃度は血漿 Hcy 濃度と負の傾向性 ( $P_{\text{trend}} < 0.01$ ) を示した。血清 V.B12 濃度は有意な傾向性を認めなかった。血液生化学検査成績において、腎機能指標、肝機能指標、脂質代謝指標のいずれも血漿 Hcy 濃度との傾向性を認めず、体格も血漿 Hcy 濃度と関連がみられなかった

#### 1-4-4. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度四分位群における食品群別食物摂取頻度

食品群別食物摂取頻度の傾向性について、MTHFR 遺伝子多型にて調整した log 血漿 Hcy 濃度の四分位で対象を分割して検討した結果、「海藻」、「納豆」、「豆腐」、「背の青い魚および赤身の魚」、「ヨーグルト」(いずれも  $P_{\text{trend}} < 0.05$ ) と血漿 Hcy 濃度と

の間に負の傾向性を認めた。また、有意な傾向性にはいたらなかった( $p=0.078$ )ものの、血漿 Hcy 濃度の第 1 四分位群では第 4 四分位群に比べて「揚げ物」の摂取頻度が低かった( $p<0.05$ )。

葉酸含有量の高い食品である「レバー」、「葉酸の多い野菜」、「緑茶」、「野菜ジュース」や、サプリメント類の「総合ビタミン剤」、「栄養ドリンク」、「その他のサプリメント」は血漿 Hcy 濃度との間に有意な傾向性を認めなかった(表 1-3)。なお、いずれかのサプリメント類を日常的に摂取していた者は、血漿 Hcy 濃度の第 1 四分位群から順に、それぞれ 5 名(13.8%)、5 名(13.8%)、4 名(11.4%)、4 名(11.4%)であり、各群のサプリメント類利用者の割合に差はみられなかった。

#### 1-4-5. 20 代勤労男性における食事パターンの抽出

対象の食事パターンを抽出するため、対象全体について、32 食品群を用いた主成分分析を行なった。

本研究ではカイザー基準では 5 因子、スクリー基準では 2 因子が選択されたが、解釈可能性は後者の方が高く、2 因子構造とすることが妥当と考えられた。そこで、2 因子を仮定した主成分分析を行い、直交回転(バリマックス法)をかけた。2 因子の累積寄与率は 27.3%であった。食事パターンを意味付ける食品群として因子負荷量 0.5 以上を採用し、クロンバックの  $\alpha$  係数を用いて尺度内の一貫性を確認した。その結果、第 1 主成分、第 2 主成分ともクロンバックの  $\alpha$  係数が 0.7 以上で内的整合性が高かった。

日本人の食生活習慣と心血管疾患に関する総説<sup>49)</sup>および日本動脈硬化学会のガイドライン<sup>6)</sup>では、エネルギー量が適正で魚や大豆・大豆製品、果物、野菜、海藻、きのこ、こんにゃくに富み、精製穀類と動物性脂肪が少ない食事を“日本食”としている。そこで、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」、「海藻」、「果物」、「納豆」、「豆腐」、

「大豆以外の豆・豆製品」、「背の青い魚および赤身の魚」、「白身魚」、「きのこ・こんにゃく」からなる第 1 主成分を“日本食パターン”、「肉類」、「脂身の多い肉」、「揚げ物」、「炒め物」、「マーガリン・ドレッシング・マヨネーズをつける料理」、「バターおよびバター・生クリームを使った料理」からなる第 2 主成分を“洋食パターン”と命名した(表 1-4)。

“日本食パターン”スコアは-2.267 から 3.866、“洋食パターン”スコアは-0.889 から 3.492 に分布した。

#### 1-4-6. 20 代勤労男性の食事パターンスコアと血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度の関連

“日本食パターン”スコアは MTHFR 遺伝子多型で調整した血漿 Hcy 濃度と逆相関( $p < 0.05$ )、血清葉酸濃度と正相関( $p < 0.01$ )を示した。一方、“洋食パターン”スコアは血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度のいずれとも相関関係をみとめなかった(表 1-5)。

#### 1-5. 考察

本研究対象者の 20 代勤労男性のうち、約 1 割が軽度-中等度高 Hcy 血症であり、早急な改善が必要と考えられた。また、日本人 20 代勤労男性においても、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度の逆相関関係および MTHFR 遺伝子多型の影響が確認されたが、遺伝素因に関わらず血漿 Hcy 濃度が高値の者もいた。

遺伝素因以外に血漿 Hcy 濃度高値との関連が報告されている因子として腎疾患<sup>24)</sup>があげられるが、本研究では全対象のクレアチニン、尿素窒素、尿酸はいずれも正常範囲内で腎機能に異常のある者はおらず、腎機能指標と血漿 Hcy 濃度の関連を認めなかった。また、喫煙者では非喫煙者に比べて血清葉酸濃度が低く、血漿 Hcy 濃度が高くなりやすい<sup>25)</sup>とされている。我々が過去に実施した 30~69 歳地域住民における

横断調査<sup>31)</sup>でも、男性の喫煙者では非喫煙者に比べて血漿 Hcy 濃度が高値だったが、本研究では対象者が若年で喫煙年数も短く、血漿 Hcy 濃度との有意な関連はみられなかった。したがって、20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度には、遺伝素因に加え、喫煙以外の因子が強く影響しているものと思われた。

血漿 Hcy 濃度に影響する食事性因子として、葉酸の主な供給源である野菜類の Hcy 低下効果が明らかであり、欧米諸国において、ほうれん草などの葉物野菜やブロッコリーといった葉酸含量の多い野菜を用いた食事介入試験<sup>27)</sup>のデータが多数報告されている。食物摂取頻度調査でも、緑葉野菜<sup>28)</sup>や、葉酸含量の比較的多いアブラナ科の野菜<sup>29)</sup>の摂取頻度が高い者の血漿 Hcy 濃度が低いことが確認されている。今回の検討では、野菜由来の葉酸摂取状況の傾向を把握することを目的とし、便宜的に生可食部 100g あたりの葉酸含量で「葉酸の多い野菜」と「葉酸の少ない野菜」に分けて摂取頻度を調査したが、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」のいずれの摂取頻度とも血漿 Hcy 濃度との関連を認めなかった。これについては、今回の調査票はポーションサイズを考慮しておらず、また、野菜の分類やリストの作り方によって得られる結果が異なる可能性がある。しかし、本研究の 20 代勤労男性では、毎日摂取することが望ましいと考えられる野菜類摂取頻度が平均週 3～4 回程度と全体的に低く、個人間変動も少なかったことから、対象全体として野菜類からの葉酸摂取は少ない可能性があるものと推察された。野菜類摂取状況と Hcy 濃度との関連については、野菜類の摂取実態を把握し得る調査票の開発も含めて今後さらに検討する必要があると考えられた。

本研究では遺伝素因で調整した血漿 Hcy 濃度四分位群において、「海藻」、「納豆」、「豆腐」、「背の青い魚および赤身の魚」、「ヨーグルト」との間に負の傾向性を認めた。これまでに、これらの食品の摂取と日本人若年成人男性の血漿 Hcy 濃度の関連について検討した報告はないが、欧米での横断調査では、魚類摂取頻度<sup>50)</sup>や魚油

成分である n-3 系脂肪酸摂取量<sup>51)</sup>と血漿 Hcy 濃度との逆相関関係が認められている。ヨーグルトについては、12～89 歳の男女 5996 名を対象とした米国での疫学調査において、ヨーグルトを月 15 回以上摂取していた者では、全く摂取していなかった者に比べて血漿 Hcy 濃度が約 6% 低値であったことが報告されている<sup>52)</sup>。「納豆」、「豆腐」の原料である大豆については、男性ではなく女性に関する横断調査<sup>53)</sup>ではあるものの、日本人において大豆タンパク質摂取量と血漿 Hcy 濃度との逆相関関係が確認されている。我々の結果も、これらの先行研究と同様であった。「海藻」については、血漿 Hcy 濃度との関連は報告されていない。海藻類のうち、もずくやめかぶ、ひじきは葉酸含量が少ないが、のりやわかめのように常用量あたりでも葉酸含量が比較的高いものを組み合わせて摂取する等により葉酸供給源となることが期待され、海藻からの葉酸摂取も Hcy 代謝改善に貢献する可能性が示唆された。

なお、Hcy 代謝に影響する葉酸以外のビタミンとして V.B6 や V.B12、V.B2 があげられるが、魚類は V.B6、V.B12、V.B2、納豆、豆腐は V.B6 の供給源でもある。魚類や海藻、納豆、豆腐は日本型の食事に特徴的な食材<sup>49)</sup>であり、第一主成分として抽出された“日本食パターン”は、これらの食品と野菜類、きのこ・こんにゃくから構成されていた。“日本食パターンスコア”と血漿 Hcy 濃度が逆相関、血清葉酸濃度が正相関関係にあったことから、これらの食物摂取頻度が相互に関連し、複合的に血漿 Hcy 濃度、血清葉酸濃度に影響していた可能性が考えられた。一方、“洋食パターンスコア”は血漿 Hcy 濃度、血清葉酸、V.B12 濃度のいずれとも関連を認めなかったが、これは“日本食パターンスコア”に比べて“洋食パターンスコア”の個人差が小さかったことが影響したのかもしれない。

本研究で血漿 Hcy 濃度との関連を認めた食品は、外食や中食でも比較的手軽に摂取できるものであり、外食や中食への依存度が高いとされる若年男性<sup>54)</sup>にも摂取しやすい食品であった可能性がある。今回は対象の食事の場や調理担当者の有無を

調査していなかったが、食品摂取状況に影響を及ぼすと考えられる種々の環境要因の関与についても考慮する必要があると思われる。

これまでの先行研究において、葉酸や V.B6、V.B12 を含むサプリメントによる Hcy 低下効果は多数報告されている<sup>55-57)</sup>。しかし、本対象では、血漿 Hcy 濃度四分位群における「総合ビタミン剤」、「栄養ドリンク」利用者の割合は各群とも約 10% で群間差がなかった。今回の調査ではサプリメントの詳細な内容については把握しておらず、サプリメント摂取有無の影響については、さらに検討する必要があるだろう。

本研究の限界として以下の課題がある。まず、20 代勤労男性として都内の総合商社社員を対象としており、居住地域や職業、その他の生活背景が異なる対象については未検討である。また、摂取頻度調査による食事摂取状況の実態把握には限界がある。本研究で対象の血漿 Hcy 濃度と負の傾向性を認めた食品には、葉酸供給源だけでなく Hcy 代謝に必要な V.B6 や V.B12、V.B2 供給源が含まれており、これらの摂取量との関連も検討すべきであった。さらに、代謝に V.B2 を必要とする脂質供給源の摂取頻度と血漿 Hcy 濃度が正の関連を認め、血漿 Hcy 濃度高値を示した対象が V.B2 の影響を受けやすいとされる TT 型であったことから、葉酸だけでなく V.B2 にも着目する意義が示唆されたが、今回は血中 V.B2 濃度を測定できなかった。

このような問題点はあるものの、今回の検討から、首都圏在住の総合商社勤務の 20 代勤労男性に血漿 Hcy 濃度高値者がおり、これらの対象では、正常範囲内ではあるが血清葉酸濃度が低く、若年期からの高 Hcy 血症予防は重要であると考えられた。また、対象の血漿 Hcy 濃度は MTHFR 遺伝子多型の影響を受けていることが確認された。ただし、遺伝子多型で血漿 Hcy 濃度を調整した検討において、魚類や海藻、納豆、豆腐、ヨーグルトなどの摂取頻度との関連が示唆されたことから、これらの食品の複合的な摂取が若年成人男性の高 Hcy 血症予防に有効となる可能性が示唆された。

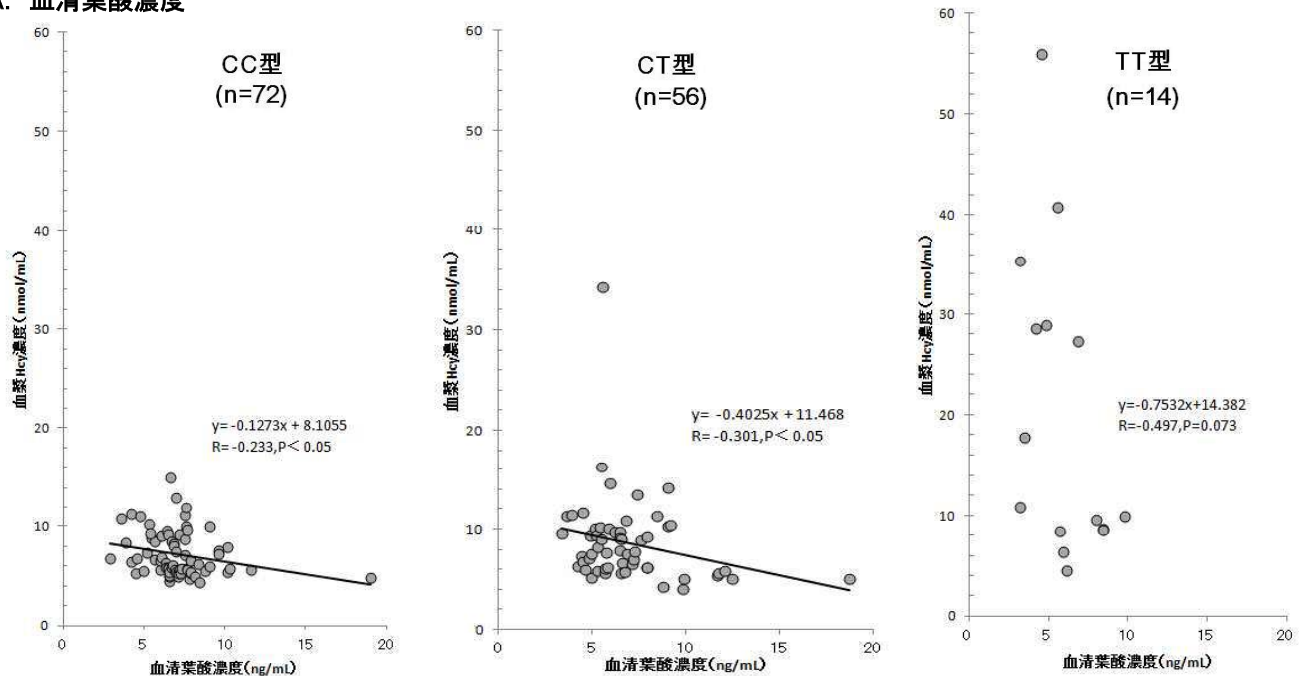
## 1-6. 要旨

高 Hcy 血症の要因のひとつとして葉酸欠乏があげられる。日本では特に若年成人男性で野菜摂取不足による葉酸欠乏状態が懸念される。そこで、都内某総合商社の20代勤労男性142名を対象に、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸およびV.B<sub>12</sub> 濃度に対する食品群別食物摂取頻度に関する検討を行なった。対象の血漿 Hcy 濃度は  $9.1 \pm 6.9$  (Mean  $\pm$  SD) nmol/ml であり、MTHFR 遺伝子多型の TT 型では血漿 Hcy 濃度が高かった。

MTHFR 遺伝子多型で調整して Hcy 代謝指標と食習慣の関連を検討すると、血清葉酸濃度が負の傾向性を認めた ( $P_{\text{trend}} < 0.01$ )。また、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」、「海藻」、「きのこ・こんにゃく」、「果物」、「納豆」、「豆腐」、「大豆以外の豆・豆製品」、「背の青い魚および赤身の魚」、「白身魚」で構成された日本食型とみなされる食事パターンのスコアと血漿 Hcy 濃度が逆相関、血清葉酸濃度が正相関を示した (いずれも  $p < 0.05$ )。これらの食品の複合的な摂取が高 Hcy 血症予防に有用である可能性が考えられた。

## 1-7. 図表

### A. 血清葉酸濃度



### B. 血清V.B12濃度

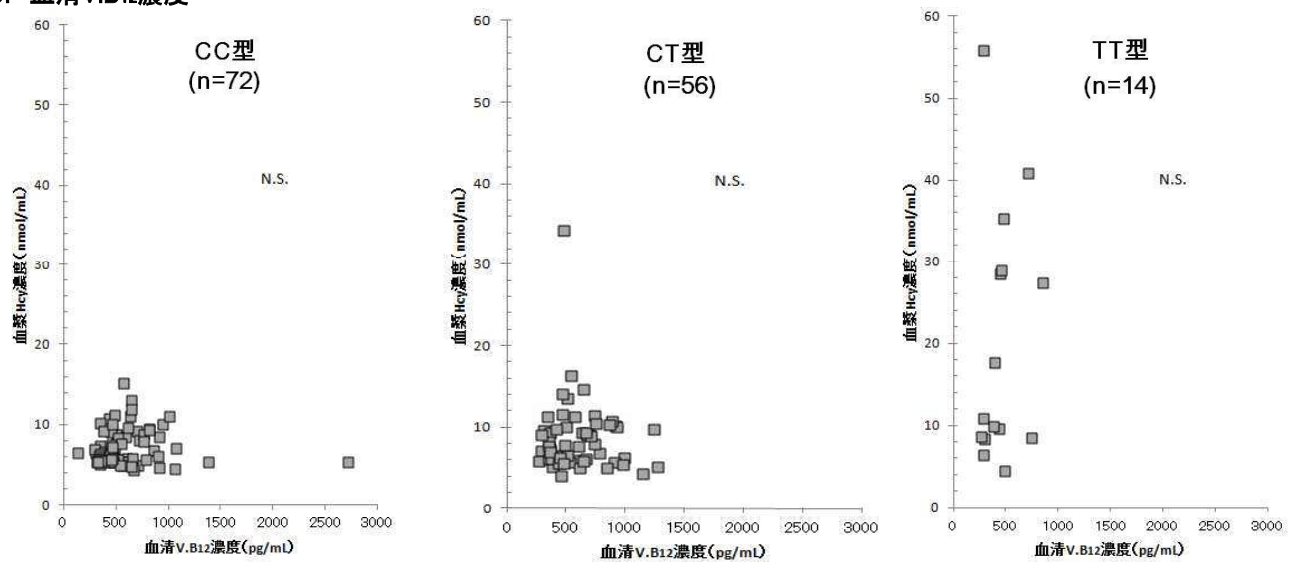


図 1-1.

20 代勤労男性における MTHFR 遺伝子多型別にみた血漿 Hcy 濃度と血清葉酸(A)、V.B12(B)濃度の単相関



表 1-1. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度四分位群における MTHFR 遺伝子多型  
発現頻度と喫煙習慣

	血漿Hcy濃度四分位群 <sup>#</sup>				n=142
	1(低)	2	3	4(高)	P <sup>\$</sup>
人数(人)	37	35	35	35	
MTHFR遺伝子多型(人)					
CC型	13	20	17	17	
CT型	16	10	17	13	
TT型	8	0	1	5	
喫煙習慣(人(%))					
有	11 (29.7)	14 (40.0)	12 (34.3)	9 (25.7)	0.630
無	26 (70.3)	21 (60.0)	23 (65.7)	26 (74.3)	

\$:  $\chi^2$ 検定に基づく有意確率

#: 対数変換した血漿Hcy濃度を従属変数、MTHFR遺伝子多型のダミー変数を独立変数とした線形回帰分析にて得られた偏回帰係数で対数変換Hcy濃度を調整し、この四分位で対象を群分けした。

表 1-2. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度四分位群における血清葉酸, V.B12 濃度、血液生化学検査成績および体格

	血漿Hcy濃度四分位群 <sup>a</sup>				P <sub>trend</sub> <sup>b</sup>
	1 (低)	2	3	4 (高)	
人数(人)	37	35	35	35	
Hcy (nmol/ml) *	4.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.3	7.6 ± 0.7	12.0 ± 4.6	0.000
葉酸 (ng/ml)	8.1 ± 3.4	7.1 ± 1.7	6.2 ± 1.7	6.6 ± 2.0	0.006
V.B12 (pg/ml)	663 ± 451	498 ± 188	587 ± 229	614.0 ± 190	0.196
UA (mg/dl)	5.8 ± 0.7	5.9 ± 1.2	5.8 ± 1.3	5.8 ± 1.1	0.908
BUN (mg/dl)	12.5 ± 2.0	13.9 ± 3.0	13.2 ± 2.9	13.0 ± 2.5	0.549
Cr (mg/dl)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.125
TC (mg/dl)	184.9 ± 29.7	186.5 ± 36.8	177.2 ± 28.0	176.0 ± 23.1	0.105
LDL-C(mg/dl)	100.2 ± 24.6	108.4 ± 32.8	97.9 ± 23.8	100.1 ± 23.6	0.658
HDL-C(mg/dl)	63.8 ± 11.9	60.3 ± 12.1	62.7 ± 12	61.9 ± 12.9	0.710
TG (mg/dl)	77.6 ± 32.7	88.4 ± 52.5	82.1 ± 36.3	69.4 ± 35.0	0.295
AST (IU/l)	20.8 ± 5.9	21.8 ± 7.4	19.0 ± 4.9	21.9 ± 13.9	0.267
ALT (IU/l)	21.2 ± 7.2	20.8 ± 11.0	17.9 ± 5.5	18.9 ± 8.2	0.052
γ-GTP(IU/l)	28.9 ± 14.8	28.9 ± 16.6	24.9 ± 13.1	24.9 ± 13.8	0.088
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 2.2	23.1 ± 2.6	22.5 ± 2.2	22.9 ± 2.5	0.888

a : Mean ± SD

b: Jonckheere検定に基づく有意確率

#: 対数変換した血漿Hcy濃度を従属変数、MTHFR遺伝子多型のタミー変数を独立変数とした線形回帰分析にて得られた偏回帰係数で対数変換Hcy濃度を調整し、この四分位で対象を群分けした。

\*: 遺伝子多型で調整後の対数変換Hcy濃度を真数に返して示した。

V.B12=ビタミンB12; UA=尿酸; BUN=尿素窒素; Cr=クレアチニン; TC=総コレステロール; LDL-C=LDL-コレステロール; HDL-C=HDL-コレステロール; TG=トリグリセリド; AST=アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT=アラニンアミノトランスフェラーゼ; γ-GTP=γ-グルタミルトランス-ペプチダーゼ; BMI=Body Mass Index

表 1-3. 20 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度四分位群における食品群別食物摂取頻度

	血漿Hcy濃度四分位群 <sup>#</sup>				Ptrend <sup>b</sup>
	1(低)	2	3	4(高)	
人数 (人)	37	35	35	35	
葉酸の多い野菜 (点)	2.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.5 ± 1.0	2.5 ± 0.6	2.2 ± 0.7	0.295
葉酸の少ない野菜 (点)	3.5 ± 1.2	3.3 ± 1.0	3.5 ± 1.1	3.2 ± 1.1	0.337
野菜ジュース (点)	2.8 ± 2.5	1.9 ± 2.2	2.7 ± 2.3	2.2 ± 2.0	0.844
海藻 (点)	2.5 ± 1.4	2.5 ± 1.2	2.6 ± 0.9	2.4 ± 1.1	0.003
果物 (点)	2.8 ± 1.6	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.0	2.4 ± 1.2	0.536
納豆 (点)	2.4 ± 1.3	2.1 ± 1.2	2.1 ± 1.2	1.6 ± 0.9	0.004
豆腐 (点)	2.5 ± 0.9	2.7 ± 1.2	2.4 ± 0.9	2.1 ± 0.9	0.026
納豆・豆腐以外的大豆・大豆製品 (点)	1.5 ± 0.7	1.7 ± 1.1	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.7	0.902
大豆以外の豆・豆製品 (点)	1.3 ± 0.4	1.7 ± 1.1	1.5 ± 0.6	1.4 ± 0.9	0.491
卵 (点)	3.5 ± 1.3	3.3 ± 1.2	3.4 ± 1.2	3.0 ± 1.1	0.187
背の青い魚および赤身の魚 (点)	2.2 ± 0.7	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.8	1.9 ± 0.5	0.041
白身魚 (点)	1.7 ± 0.7	1.9 ± 0.9	1.9 ± 0.7	1.6 ± 0.7	0.755
たらこ・明太子 (点)	1.7 ± 0.9	1.6 ± 0.7	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.8	0.152
レバー (点)	1.3 ± 0.5	1.4 ± 0.6	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5	0.697
肉類 (点)	3.5 ± 1.3	3.4 ± 1.1	3.4 ± 1.1	3.5 ± 1.1	0.854
脂身の多い肉 (点)	1.9 ± 0.7	2.1 ± 1.0	1.6 ± 0.6	2.1 ± 1.0	0.992
チーズ (点)	2.1 ± 0.9	1.6 ± 0.9	1.9 ± 1.0	1.9 ± 1.2	0.286
普通牛乳 (点)	2.7 ± 1.7	2.1 ± 1.6	2.1 ± 1.6	2.7 ± 1.7	0.916
低脂肪牛乳 (点)	1.7 ± 1.3	1.9 ± 1.5	1.4 ± 1.0	1.4 ± 1.1	0.402
ヨーグルト (点)	2.7 ± 1.5	2.1 ± 1.3	2.2 ± 1.2	1.8 ± 1.1	0.022
揚げ物 (点)	2.6 ± 0.9	2.8 ± 1.1	2.9 ± 1.0	3.1 ± 1.0	0.078
炒め物 (点)	2.8 ± 0.8	3.1 ± 1.0	3.0 ± 0.9	3.0 ± 0.9	0.350
マヨネーズ・ドレッシングをつける料理 (点)	2.5 ± 1.3	2.8 ± 1.4	2.6 ± 1.2	2.5 ± 1.1	0.774
バター・生クリームを使った料理 (点)	2.1 ± 1.0	2.1 ± 1.2	1.9 ± 0.8	2.0 ± 0.9	0.941
種実類 (点)	1.3 ± 0.5	1.8 ± 1.2	1.8 ± 0.6	1.5 ± 0.8	0.154
いも類 (点)	2.3 ± 1.0	2.3 ± 0.9	2.0 ± 0.9	2.2 ± 0.9	0.331
きのこ・こんにゃく (点)	2.3 ± 1.0	2.2 ± 1.1	2.0 ± 0.8	2.1 ± 0.7	0.213
アルコール (点)	4.4 ± 2.1	4.4 ± 1.9	4.3 ± 1.6	3.5 ± 2.0	0.192
緑茶 (点)	5.8 ± 2.6	5.1 ± 2.7	5.1 ± 2.6	5.1 ± 2.8	0.396
栄養ドリンク (点)	1.8 ± 1.3	1.3 ± 0.7	1.6 ± 1.7	1.4 ± 1.1	0.187
総合ビタミン剤 (点)	2.6 ± 3.0	1.6 ± 1.8	1.6 ± 1.9	1.8 ± 2.2	0.452
その他サプリメント (点)	1.9 ± 2.3	1.6 ± 1.3	1.4 ± 1.3	1.4 ± 1.3	0.904

a: Mean ± SD

b: Jonckheere検定に基づく有意確率

\*: Mann-Whitney's U検定に基づく有意確率  $p < 0.05$  vs 第1四分位群

#: 対数変換した血漿Hcy濃度を従属変数、MTHFR遺伝子多型のダミー変数を独立変数とした線形回帰分析にて得られた偏回帰係数で対数変換Hcy濃度を調整し、この四分位で対象を群分けした。

表 1-4. 20 代勤労男性における食事パターンの抽出

	因子負荷量	
	第1主成分 (日本食パターン)	第2主成分 (洋食パターン)
葉酸の多い野菜	<b>0.590</b>	0.148
葉酸の少ない野菜	<b>0.586</b>	0.260
野菜ジュース	-0.034	-0.082
海藻	<b>0.579</b>	0.054
果物	<b>0.503</b>	0.025
納豆	<b>0.508</b>	-0.155
豆腐	<b>0.687</b>	-0.004
納豆・豆腐以外的大豆・大豆製品	0.494	0.216
大豆以外の豆・豆製品	<b>0.503</b>	0.230
卵	0.179	0.451
背の青い魚および赤身の魚	<b>0.514</b>	0.121
白身魚	<b>0.590</b>	0.153
たらこ・明太子	0.106	0.152
レバー	-0.020	0.182
肉類	0.336	<b>0.535</b>
脂身の多い肉	0.085	<b>0.542</b>
チーズ	0.158	0.281
普通牛乳	0.243	-0.071
低脂肪牛乳	0.153	-0.177
ヨーグルト	0.276	-0.217
揚げ物	0.099	<b>0.684</b>
炒め物	0.345	<b>0.676</b>
マヨネーズ・ドレッシングをつける料理	-0.078	<b>0.643</b>
バター・生クリームを使った料理	-0.076	<b>0.546</b>
種実類	0.451	0.359
いも類	0.478	0.329
きのこ・こんにゃく	<b>0.698</b>	0.267
アルコール	0.254	0.199
緑茶	0.293	0.083
栄養ドリンク	-0.086	0.035
総合ビタミン剤	-0.081	0.082
その他サプリメント	0.085	0.043
寄与率(%)	16.1	11.2
クローンバックの $\alpha$ 係数	0.786	0.741

表 1-5. 20 代勤労男性における食事パターンスコアと血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度の単相関

	日本食パターンスコア		洋食パターンスコア	
	r	p	r	p
Hcy <sup>#</sup> (nmol/ml)	-0.187	0.026	0.067	0.429
葉酸 (ng/ml)	0.237	0.004	-0.059	0.486
V.B12 (pg/ml)	0.003	0.968	-0.029	0.728

#: 対数変換した血漿Hcy濃度を従属変数、MTHFR遺伝子多型のダミー変数を独立変数とした線形回帰分析にて得られた偏回帰係数で調整し、真数に返した

r: Spearmanの順位相関係数

p: Spearmanの単相関分析に基づく有意確率

## 第1章 日本人における高ホモシステイン血症の実態および血中ホモシステイン濃度とホモシステイン代謝に関わる諸因子に関する検討

### [研究2]30～40代勤労男性における検討

#### 2-1. 緒言

近年、食生活習慣の欧米化にともない、生活習慣病の発症年齢の若年化が問題となっている<sup>58)</sup>。男性では30代以降で糖尿病や脂質異常症の患者が増加しており、これらが動脈硬化の若年化につながる事が懸念されている<sup>59)</sup>。このように若年であってもすでに独立した動脈硬化危険因子を有する者では血漿 Hcy 濃度が高値になることにより、さらに動脈硬化の発症リスクが高まる事が危惧される。

研究1で20代勤労男性を対象として実施した断面調査において、対象が若年であったにもかかわらず、約1割が血漿 Hcy 濃度高値であった。血漿 Hcy 濃度高値の要因に加齢<sup>8)</sup>や喫煙<sup>25)</sup>があげられる。これらは独立した動脈硬化の危険因子であるが、国民健康・栄養調査<sup>60)</sup>において、30～40代男性では喫煙率が40%前後と20代の約30%に比べて高く、20代勤労男性以上に血漿 Hcy 濃度高値者の割合が高い可能性も考えられる。したがって、20代勤労男性のみならず、30～40代男性の高 Hcy 血症予防および改善について検討する意義は大きいと考えられる。

そこで、30～40代勤労男性を対象とし、血漿 Hcy 濃度や血清葉酸および V.B12 濃度と食習慣や遺伝素因の関連について検討することを目的とした断面調査を実施した。

#### 2-2. 対象

都内某大手化学繊維メーカーの事務営業系社員の定期健診受診者のうち、服薬治療中の疾患がある者を除外し、書面によるインフォームドコンセントの得られた30～40代日本人男性52名を対象として身体計測、食事・生活習慣調査、血液検査を実施した。なお、本研究は、日本女子大学「ヒトを対象とした実験研究に関する倫理委員

会」の承認を得て実施した。

## 2-3. 方法

### 2-3-1. 身体計測、血液生化学検査

身長、体重をもとに BMI を算出した。研究 1 と同様の方法で血液生化学検査を実施した。なお、空腹時血糖値(FPG)はヘキソナーゼ UV 法<sup>61)</sup>、インスリン(IRI)は化学発光免疫酵素法<sup>62)</sup>にて測定し、インスリン抵抗性の指標となる HOMA-IR を  $\text{HOMA-IR} = (\text{FPG} \times \text{IRI}) / 405$  の式から算出した。

### 2-3-2. 血漿 Hcy 濃度および血清ビタミン濃度

研究 1 と同様の方法で血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B12 濃度、MTHFR 遺伝子多型を測定した。

### 2-3-3. 食習慣

食習慣調査には研究 1 と同じ調査票を用い、各食品の摂取頻度の「ほとんど食べなかった」を 1 点、「週 1～2 回」を 2 点、「週 3～4 回」を 3 点、「週 5～6 回」を 4 点、「毎日 1 回」を 5 点、「毎日 2 回」を 6 点、「毎日 3 回」を 7 点として得点化し、統計解析に用いた。

### 2-3-4. 統計解析

データは Mean±SD で示した。飲酒習慣の有無、血漿 Hcy 濃度 12～50 nmol/ml の軽度-中等度高 Hcy 血症者の割合については  $\chi^2$  検定にて喫煙者と非喫煙者の比較を行なった。ただし、期待値 5 以下の場合には Fisher の直接確率法を用いた。血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B12 濃度の相関関係の検討には Pearson の単相関分析を用いた。その際、血漿 Hcy 濃度は正規分布しなかったため対数変換した値を用い

て解析を行った。多型間の血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。なお、TT 型は 3 名と少なかったため、統計的検討はできなかった。また、血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度と食品群別摂取頻度の相関関係の検討には Spearman の単相関分析を用いた。統計解析には SPSS Ver 12.0 for windows (IBM 株式会社)を用い、両側検定で  $p < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

## 2-4. 結果

### 2-4-1. 喫煙習慣有無別にみた 30～40 代勤労男性の年齢、体格、血圧および血液生化学検査成績と飲酒習慣

血漿 Hcy 濃度高値と関連する因子のひとつとして喫煙があげられ<sup>25)</sup>、対象とした 30～40 代勤労男性では喫煙習慣のある者が 28 名 (53.8%) を占めていた。そこで、喫煙習慣の有無別に対象の年齢、体格、血圧および血液生化学検査成績と飲酒習慣の有無について比較した (表 2-1)。いずれの項目についても喫煙習慣の有無による差は認めなかった。

なお、対象全体では、BMI が 25 以上の肥満者が 16 名 (30.8%)、日本における糖尿病の予防介入に最適なカットオフ値とされる FPG100mg/dl 以上の者は 15 名 (28.8%)、インスリン抵抗性が疑われる HOMA-IR2.5 以上の者は 15 名 (28.8%) であった。また、TG150mg/dl 以上の者は 14 名 (26.9%)、HDL-C40mg/ml 未満の者は 1 名 (1.9%) であった。

### 2-4-2. 30～40 代勤労男性における喫煙習慣有無および MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B12 濃度

本対象では軽度-中等度高 Hcy 血症の対象が全体で 14 名 (26.9%) であった。対象全体では非喫煙者と喫煙者の血漿 Hcy 濃度に差はなかったが、CT 型では非喫煙



者に比べて喫煙者の血漿 Hcy 濃度が高値傾向 ( $p=0.097$ ) にあり、軽度-中等度高 Hcy 血症者の割合も高かった ( $p<0.05$ )。MTHFR 遺伝子多型の TT 型の 3 名は喫煙習慣の有無に関わらず軽度-中等度高 Hcy 血症であった。また、血清葉酸および V.B<sub>12</sub> 濃度については基準値を下回る者はおらず、これらの濃度の平均値は MTHFR 遺伝子多型や喫煙習慣の有無による差を認めなかった(表 2-2)。

なお、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度は対象全体で逆相関を示し( $p<0.01$ )、CT 型でも有意な逆相関を認めた ( $p<0.05$ )。さらに喫煙者 ( $n=28$ ) および CT 型の喫煙者 ( $n=16$ ) においても血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度は逆相関関係にあった(いずれも  $p<0.05$ )(表 2-3)。

#### 2-4-3. 喫煙習慣有無別にみた 30～40 代勤労男性の食品群別食物摂取頻度と血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B<sub>12</sub> 濃度の関連

各食品群について、喫煙習慣有無別に見た摂取頻度得点の平均値を表 2-4 に示した。喫煙者は非喫煙者に比べて乳製品の摂取頻度が低く、特に「低脂肪牛乳」では有意であった ( $p<0.05$ )。一方、脂質供給源となる食品の摂取頻度が喫煙者で高く、特に「揚げ物」は有意に高頻度に摂取していた ( $p<0.05$ )。

研究 1 の 20 代勤労男性において、血漿 Hcy 濃度と逆相関、血清葉酸濃度と正相関を示した日本食型とみなされる食事パターンを構成する食品、すなわち「きのこ・こんにゃく」、「豆腐」、「白身魚」、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」、「海藻」、「背の青い魚および赤身の魚」、「納豆」、「果物」、「大豆以外の豆・豆製品」の摂取頻度を組み合わせた合計得点と Hcy 代謝指標の関連を検討した。“日本食パターン”を構成する食品の摂取頻度合計得点は対象全体で  $22.1 \pm 5.1$  点であり、非喫煙者では  $22.3 \pm 5.0$  点、喫煙者では  $23.1 \pm 5.1$  点と喫煙習慣の有無による差はなかった。この得点と血漿 Hcy 濃度および血清ビタミン濃度との単相関分析の結果、喫煙者では血清葉酸濃度と正相関を認めた ( $p<0.05$ ) (表 2-5)。

## 2-5. 考察

対象とした 30～40 代勤労男性においても、従来の報告<sup>10,13,14)</sup>と同様に MTHFR 遺伝子多型の TT 型では血漿 Hcy 濃度が高く、血清葉酸濃度が低かった。本対象では軽度-中等度高 Hcy 血症者が約 3 割おり、研究 1 の 20 代勤労男性に比べて Hcy 濃度の高値者が多く、年齢が高いことが血漿 Hcy 濃度高値の一因となることが確認された。

これまでに血漿 Hcy 濃度が喫煙者では高いことが報告されており、喫煙習慣は動脈硬化危険因子を重積させると考えられている<sup>6)</sup>。国民健康・栄養調査では 30 代および 40 代男性の喫煙率は約 4 割とされている<sup>60)</sup>が、本対象では喫煙者が 5 割以上を占めており、喫煙の有無による血漿 Hcy 濃度には有意な差がないものの、動脈硬化予防の必要性が高い集団であった。

一方、研究 1 で血漿 Hcy 濃度と負、血清葉酸濃度と正の関連を示した日本食パターンを構成する「きのこ・こんにゃく」、「豆腐」、「白身魚」、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」、「海藻」、「背の青い魚および赤身の魚」、「納豆」、「果物」、「大豆以外の豆・豆製品」の摂取頻度得点の合計点は、喫煙者でのみ血清葉酸濃度と正相関を認めた。これらの食品は Hcy 代謝に必要な葉酸や V.B6 および V.B12、V.B2 の供給源である。特に、V.B2 は脂質および葉酸代謝において補酵素として作用する<sup>63)</sup>が、本対象では、喫煙者は非喫煙者に比べて脂質供給源となる食品の摂取頻度が高く、V.B2 供給源となる乳製品や卵の摂取頻度は低かった。喫煙者では非喫煙者に比べて V.B2 が相対的に不足し、葉酸代謝が停滞しやすい状態にあった可能性が考えられる。すなわち 30～40 代勤労男性の喫煙者において、日本食パターンを構成する食品の複合的な摂取が血清葉酸濃度の良好な維持を介して高 Hcy 血症予防に有効となる可能性が考えられた。

今回は対象者数が少なく、血漿 Hcy 濃度や血清ビタミン濃度を規定する因子の複

合的な効果について十分な検討を行うことはできなかった。しかし、30～40 代勤労男性の血漿 Hcy 濃度や Hcy 代謝に関連する血清ビタミン濃度に喫煙や食習慣が影響していたことが示唆された。30～40 代勤労男性においては、研究 1 の 20 代勤労男性よりもさらに血漿 Hcy 濃度高値者が多く、若年層に限らずすべての世代において日本人の高 Hcy 血症の実態を把握し予防施策を講じる意義は大きいと考えられた。

今回の結果は都内の一企業に限定した調査ではあるが、葉酸や V.B6 および V.B12、V.B2 の供給源となる食品を組み合わせることで高 Hcy 血症予防に有効となる可能性が考えられた。今後さらに地域や属性の異なる対象を含め、日本人の高 Hcy 血症の実態を把握し、禁煙対策とともに食生活改善指導を展開すべきと思われた。

## 2-6. 要旨

対象とした 30～40 代勤労男性のうち、軽度-中等度高 Hcy 血症者は約 3 割と多く、早急な改善の必要性が示された。本対象においても、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度の逆相関関係 ( $p < 0.05$ ) および MTHFR 遺伝子多型 TT 型の Hcy 濃度高値が認められた。本対象では喫煙習慣のある者が 5 割以上、肥満者や糖および脂質代謝異常が疑われる者が約 3 割を占めていた。軽度-中等度高 Hcy 血症者の割合は非喫煙者で約 2 割であったのに対し、喫煙者では約 3 割であった。喫煙者は非喫煙者に比べて V.B2 供給源となる乳製品や卵の摂取頻度が低く、代謝に V.B2 を必要とする脂質供給源の摂取頻度は高かった。対象の血漿 Hcy 濃度には、喫煙に加え V.B2 の供給や消費に関わる食品の摂取状況が影響した可能性が考えられた。また、研究 1 で Hcy 代謝指標との関連を認めた日本食型の食事パターンを構成する「きのこ・こんにゃく」、「豆腐」、「白身魚」、「葉酸の多い野菜」、「葉酸の少ない野菜」、「海藻」、「背の青い魚および赤身の魚」、「納豆」、「果物」、「大豆以外の豆・豆製品」の摂取頻度得点の合計点は、喫煙者で血清葉酸濃度と正相関を示し ( $p < 0.05$ )、30～40 代勤労男性においても特に喫煙者ではこれらの食品の複合的な摂取が高 Hcy 血症予防に有効となる可能性が考えられた。

## 2-7. 図表

表 2-1. 喫煙習慣有無別にみた 30～40 代男性の年齢、体格および血液生化学検査成績

	非喫煙者 (n=24)	喫煙者 (n=28)	P value
年齢(歳)	40.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	40.3 ± 3.6	0.712 <sup>b</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 3.3	24.0 ± 2.9	0.905 <sup>b</sup>
SBP (mmHg)	121.8 ± 11.1	121.4 ± 10.2	0.905 <sup>b</sup>
DBP (mmHg)	80.8 ± 10.7	77.5 ± 11.0	0.228 <sup>b</sup>
FPG (mg/dl)	97.3 ± 7.7	98.9 ± 29.4	0.208 <sup>b</sup>
IRI (μU/ml)	8.9 ± 3.8	8.2 ± 5.2	0.349 <sup>b</sup>
HOMA-IR	2.2 ± 1.0	2.0 ± 1.5	0.326 <sup>b</sup>
UA (mg/dl)	6.5 ± 1.6	6.1 ± 1.4	0.149 <sup>b</sup>
BUN (mg/dl)	13.7 ± 2.3	13.3 ± 3.6	0.394 <sup>b</sup>
Cr (mg/dl)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.240 <sup>b</sup>
TC (mg/dl)	210.7 ± 32.9	202.2 ± 30.1	0.359 <sup>b</sup>
LDL-C (mg/dl)	127.8 ± 31.4	122.4 ± 33.1	0.627 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dl)	58.3 ± 15.6	61.1 ± 12.4	0.353 <sup>b</sup>
TG (mg/dl)	135.7 ± 86.4	110.9 ± 73.1	0.157 <sup>b</sup>
AST (IU/l)	24.4 ± 8.0	24.5 ± 8.7	0.783 <sup>b</sup>
ALT (IU/l)	34.9 ± 22.9	31.0 ± 17.5	0.607 <sup>b</sup>
γ-GTP (IU/l)	59.1 ± 42.3	57.3 ± 40.3	0.783 <sup>b</sup>
飲酒習慣(人数(%))			
有	12 (50.0)	8 (28.6)	0.113 <sup>c</sup>
無	12 (50.0)	20 (71.4)	

a: Mean ± SD

BMI=Body Mass Index; SBP=収縮期血圧; DBP=拡張期血圧; FPG=空腹時血糖; IRI=インスリン;  
UA=尿酸; BUN=尿素窒素; Cr=クレアチニン; TC=総コレステロール; LDL-C=LDL-コレステロール;  
HDL-C=HDL-コレステロール; TG=トリグリセリド; AST=アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ;  
ALT=アラニンアミノトランスフェラーゼ; γ-GTP=γ-グルタミルトランスペプチダーゼ

b: Mann-Whitney's U 検定 } に基づく有意確率。いずれも非喫煙者 vs 喫煙者  
c:  $\chi^2$ 検定

表2-2. 30~40代勤労男性における喫煙習慣有無およびMTHFR遺伝子多型別にみた血漿Hcy濃度、  
軽度-中等度高Hcy血症者の割合と血清葉酸およびV.B12濃度

	MTHFR 遺伝子多型	全対象		非喫煙者		喫煙者		P value
		n		n		n		
Hcy (nmol/ml)	CC	23	9.9 ± 4.0 <sup>a</sup>	12	10.4 ± 3.8	11	9.2 ± 4.3	0.260 <sup>b</sup>
	CT	26	10.0 ± 3.4	10	8.6 ± 1.8	16	10.9 ± 3.8	0.097 <sup>b</sup>
	TT	3	27.1 ± 15.1	2	29.2 ± 20.8	1	22.9	—
	CC+CT+TT	52	10.9 ± 6.1	24	11.2 ± 7.6	28	10.7 ± 4.6	0.941 <sup>b</sup>
軽度-中等度高Hcy血症者 (人(%))	CC	23	5 (21.7)	12	3 (25.0)	11	2 (18.2)	0.692 <sup>c</sup>
	CT	26	6 (23.1)	10	0 (0.0)	16	6 (37.5)	0.035 <sup>c</sup>
	TT	3	3 (100.0)	2	2 (100.0)	1	1 (100.0)	—
	CC+CT+TT	52	14 (26.9)	24	5 (20.8)	28	9 (32.1)	0.359 <sup>d</sup>
葉酸 (ng/ml)	CC	23	7.2 ± 2.0	12	6.5 ± 1.2	11	8.0 ± 2.5	0.151 <sup>b</sup>
	CT	26	7.7 ± 2.5	10	8.5 ± 2.9	16	7.2 ± 2.2	0.201 <sup>b</sup>
	TT	3	6.0 ± 1.0	2	6.2 ± 1.3	1	5.5	—
	CC+CT+TT	52	7.4 ± 2.2	24	7.3 ± 2.3	28	7.5 ± 2.3	0.891 <sup>b</sup>
V.B12 (pg/ml)	CC	23	720.4 ± 241.8	12	694.4 ± 210.3	11	748.9 ± 279.8	0.740 <sup>b</sup>
	CT	26	775.5 ± 180.7	10	813.7 ± 198.6	16	751.6 ± 170.8	0.517 <sup>b</sup>
	TT	3	1005.9 ± 108.2	2	1053.1 ± 100.3	1	911.5	—
	CC+CT+TT	52	764.4 ± 214.6	24	774.0 ± 218.6	28	756.2 ± 214.7	0.826 <sup>b</sup>

a: Mean ± SD

b: Mann-Whitney's U 検定

c: Fisherの直接確率検定

d:  $\chi^2$ 検定

※: Mann-Whitney's U 検定に基づく有意確率 p<0.05 MTHFR遺伝子多型間の比較

n: 人数

表2-3. 30～40代勤労男性における喫煙習慣有無およびMTHFR遺伝子多型別にみたHcy代謝指標間の単相関

	全対象 (n=52)						非喫煙者 (n=24)						喫煙者 (n=28)					
	MTHFR			葉酸			Hcy			葉酸			Hcy			葉酸		
	n	r	p	(nmol/ml)	r	p	(nmol/ml)	r	p	(ng/ml)	r	p	(nmol/ml)	r	p	(ng/ml)	r	p
MTHFR 遺伝子多型																		
葉酸 (ng/ml)	CC	23	-0.242	0.266			12	-0.249	0.435				11	-0.045	0.894			
	CT	26	-0.467	0.016			10	0.042	0.907				16	-0.509	0.044			
	CC+CT+TT	52	-0.394	0.004			24	-0.176	0.411				28	-0.463	0.013			
V.B12 (pg/ml)	CC	23	-0.364	0.087	0.169	0.441	12	-0.512	0.089	0.245	0.443		11	-0.209	0.537	0.091	0.790	
	CT	26	-0.113	0.568	0.161	0.432	10	0.103	0.777	0.442	0.200		16	-0.121	0.656	-0.050	0.854	
	CC+CT+TT	52	-0.100	0.480	0.098	0.491	24	-0.151	0.483	0.311	0.139		28	-0.073	0.713	-0.063	0.750	

n:人数

r: Spearmanの順位相関係数

p: Spearmanの単相関分析に基づく有意確率

表 2-4. 喫煙習慣有無別にみた 30～40 代男性の食品群別食物摂取頻度

	非喫煙者 (n=24)	喫煙者 (n=28)	P value <sup>b</sup>
葉酸の多い野菜 (点)	2.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.7	0.201
葉酸の少ない野菜 (点)	3.1 ± 1.0	3.5 ± 1.1	0.166
野菜ジュース (点)	1.8 ± 1.7	1.8 ± 1.6	0.963
海藻 (点)	2.1 ± 1.1	2.2 ± 1.0	0.524
果物 (点)	3.0 ± 1.3	2.5 ± 0.9	0.172
納豆 (点)	2.0 ± 1.0	2.1 ± 1.2	0.969
豆腐 (点)	2.5 ± 0.8	2.6 ± 1.0	0.734
納豆・豆腐以外的大豆・大豆製品 (点)	1.5 ± 0.7	1.6 ± 0.9	0.762
大豆以外の豆・豆製品 (点)	1.8 ± 0.9	1.5 ± 0.6	0.262
卵 (点)	3.3 ± 1.1	3.0 ± 1.1	0.277
背の青い魚および赤身の魚 (点)	2.0 ± 0.6	2.5 ± 0.8	0.055
白身魚 (点)	1.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6	0.508
たらこ・明太子 (点)	1.7 ± 0.8	1.6 ± 0.7	0.815
レバー (点)	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.884
肉類 (点)	2.9 ± 0.7	3.2 ± 1.1	0.300
脂身の多い肉 (点)	1.5 ± 0.6	1.9 ± 1.0	0.196
チーズ (点)	1.8 ± 0.8	1.6 ± 0.9	0.277
普通牛乳 (点)	2.5 ± 1.5	2.3 ± 1.5	0.652
低脂肪牛乳 (点)	1.4 ± 1.1	1.0 ± 0.0	0.026
ヨーグルト (点)	2.5 ± 1.4	1.9 ± 1.4	0.083
揚げ物 (点)	2.3 ± 0.7	2.9 ± 1.0	0.006
炒め物 (点)	2.3 ± 0.9	2.8 ± 0.9	0.051
マヨネーズ・ドレッシングをつける料理 (点)	2.4 ± 1.0	2.7 ± 1.3	0.491
バター・生クリームを使った料理 (点)	1.8 ± 0.8	1.9 ± 1.1	0.629
種実類 (点)	1.7 ± 0.7	1.9 ± 1.2	0.803
いも類 (点)	2.1 ± 1.0	2.5 ± 1.0	0.140
きのこ・こんにゃく (点)	2.2 ± 1.1	2.3 ± 1.0	0.714
アルコール (点)	5.7 ± 2.6	4.7 ± 3.2	0.231
緑茶 (点)	5.7 ± 2.6	4.7 ± 3.2	0.231
栄養ドリンク (点)	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.2	0.059
総合ビタミン剤 (点)	1.6 ± 1.7	1.4 ± 1.5	0.804
その他サプリメント (点)	2.0 ± 2.3	1.2 ± 0.7	0.240

a : Mean ± SD

b : Mann-Whitney's U検定に基づく有意確率 非喫煙者 vs 喫煙者



表 2-5. 喫煙習慣有無別にみた日本食パターン構成食品の摂取頻度得点合計点と Hcy 代謝指標の単相関

	非喫煙者 (n=24)		喫煙者 (n=28)	
	r	p	r	p
Hcy (nmol/ml)	-0.059	0.783	-0.129	0.512
葉酸 (ng/ml)	-0.057	0.791	0.453	0.016
V.B12 (pg/ml)	0.307	0.144	-0.182	0.355

r: Spearmanの順位相関係数

p: Spearmanの単相関分析に基づく有意確率

## 第 1 章 日本人における高ホモシステイン血症の実態および血中ホモシステイン濃度とホモシステイン代謝に関わる諸因子に関する検討

### [研究 3] 2 型糖尿病患者における検討

#### 3-1. 緒言

食生活の欧米化にともない、わが国では 2 型糖尿病患者数が急増している<sup>59)</sup>。30～40 代勤労男性を対象とした研究 2 においても、空腹時血糖値が正常高値以上およびインスリン抵抗性が疑われる HOMA-IR2.5 以上の者が全体の約 3 割を占めていた。

糖尿病は動脈硬化性疾患の危険因子であり<sup>34)</sup>、久山町研究によると、糖尿病患者では耐糖能正常者に比べて冠動脈疾患発症リスクが 2.6 倍、脳梗塞発症リスクが 3.2 倍高いとされている<sup>64)</sup>、Hcy については、Masuda ら<sup>65)</sup>の検討において、日本人 2 型糖尿病患者の血漿 Hcy 濃度は非糖尿病患者に比べて高いことが確認されており、糖尿病の三大合併症である糖尿病腎症<sup>66)</sup>や網膜症<sup>67)</sup>、神経障害<sup>68)</sup>と血漿 Hcy 濃度高値との関連も示唆されている。したがって、動脈硬化予防の観点から、2 型糖尿病患者の高 Hcy 血症是正について検討する意義は大きいと考えられる。

日本人高齢 2 型糖尿病患者を対象とした前向き大規模臨床介入研究では、野菜と魚が多い食事パターンで心筋梗塞や脳血管疾患等による死亡率が低くなることが報告されており、このような食事パターンが 2 型糖尿病患者の動脈硬化予防に役立つ可能性が示唆されている<sup>69)</sup>。しかし、これまでに日本における 2 型糖尿病患者の食品摂取状況と血漿 Hcy 濃度、血清ビタミン濃度の関連について検討した報告はない。

そこで、外来 2 型糖尿病患者を対象として、血漿 Hcy 濃度や血清ビタミン濃度の実態と、食品摂取状況との関連について明らかにするために本研究を実施した。

#### 3-2. 対象

埼玉社会保険病院の外来 2 型糖尿病患者で、書面によるインフォームドコンセントの得られた 40～70 歳 149 名(男性 76 名、女性 73 名)を対象とした。なお、本研究は埼玉社会保険病院倫理委員会の承認を得て実施した。

### 3-3. 方法

#### 3-3-1. 体格、血圧、診療情報

試験参加時のカルテより、身長、体重のデータおよび治療法や合併症、投薬状況に関する情報を得、BMI を算出した。

#### 3-3-2. 糖代謝指標

HbA1c は EDTA・2K 加血を用い、ラテックス凝集法<sup>70)</sup>にて測定した。FPG は研究 2 と同様にヘキソキナーゼ UV 法<sup>61)</sup>にて測定した。

#### 3-3-3. 血漿 Hcy 濃度、血清ビタミン濃度

研究 1 と同様に、血漿 Hcy 濃度は HPLC 法<sup>42)</sup>、血清葉酸、V.B12 濃度は電気化学発光免疫法<sup>43)</sup>による測定を行なった。また、血清 V.B6 濃度は HPLC 法<sup>71)</sup>にて測定した。

#### 3-3-4. 食品群別食物摂取頻度

糖尿病患者を対象として外来受診時に調査を実施するにあたり、短時間で正確な回答を得るために、研究 1, 2 で用いた調査票の食品群分類を糖尿病食事療法のための食品交換表<sup>72)</sup>の分類に近付くよう一部の項目を統合した。すなわち、研究 3 では「穀類」、「果物」、「大豆製品」、「卵」、「チーズ」、「肉類」、「魚」、「牛乳・チーズ以外の乳製品」、「油脂類」、「海藻・きのこ」、「野菜」、「野菜ジュース」、「アルコール」の計 13 項目を調査した。設問として前述の 13 食品名を列記し、それぞれの摂取頻度として「①ほとんど食べない」、「②月 1～3 回」、「③週 1～2 回」、「④週 3～4 回」、「⑤週 5～6 回」、「⑥毎日 1 回以上」の 6 つの選択肢を設け、該当する摂取頻度の選択肢に○をつけることとした。⑥については具体的な回数をあわせて記入してもらうようにした。得られた回答は、①0 回/日、②0.07 回/日、③0.2 回/日、④0.5 回/日、⑤0.8 回/日と

して1日あたりの摂取回数に換算し、⑥については各自が記入した回数を解析に用いた。

### 3-3-5. 統計解析

データは Mean±SD で示した。男女間および遺伝子多型間、合併症や喫煙・飲酒習慣、ビタミン剤服用有無別の平均値の差の検定には Mann-Whitney U 検定を用いた。合併症の有無、治療法の種類、喫煙・飲酒習慣の有無、MTHFR 遺伝子多型発現頻度については  $\chi^2$  検定にて男女比較を行なった。ただし、期待値 5 以下の場合には Fisher の直接確率法を用いた。

また、食品群別食物摂取頻度調査項目とした 13 食品群を用いて主成分分析を行い、食事パターンの抽出を行った。因子数の決定、因子負荷行列の回転、因子を意味付ける食品群の因子負荷量および食事パターンスコアの算出方法は研究 1 と同様とした。

血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B6、V.B12 濃度は正規分布しなかったため対数変換し、食品群別食物摂取頻度および食事パターンの主成分得点との間の相関関係を Spearman の単相関分析で検討した。統計学的有意水準は  $p < 0.05$  とした。解析には SPSS Ver 12.0 for windows (IBM 株式会社)を用いた。

## 3-4. 結果

### 3-4-1. 対象背景

対象の年齢は  $60.2 \pm 7.4$  歳、罹病期間は  $13.5 \pm 6.6$  年だった。神経障害、網膜症、腎症のいずれかまたは複数を合併していたのは 100 名 (67.1%) であった。

対象背景のうち、喫煙および飲酒習慣のある者は男性が女性に比べて多かったが (いずれも  $p < 0.001$ )、年齢、罹病期間、BMI、FPG、合併症の有無、治療法、V.B12 濃

度低値との関連が報告されているビグアナイド系薬剤<sup>73)</sup>の服用者、V.B 群サプリメント利用者の割合は、男女間で差がなかった。また、神経障害のある患者で、V.B<sub>12</sub> 製剤を投与されていた者は 21 名 (14.1%) いたが、性差はなかった (表 3-1)。

### 3-4-2. 2 型糖尿病患者における MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub> 濃度

男女別に MTHFR 遺伝子多型別の血漿 Hcy 濃度、血清葉酸、V.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub> 濃度を表 3-2 に示した。

本対象における MTHFR 遺伝子多型の発現頻度は、CC 型 75 名 (50.3%)、CT 型 48 名 (32.2%)、TT 型 26 名 (17.4%) であり、発現頻度は男女で差がなかった。

血漿 Hcy 濃度は、対象全体では  $7.6 \pm 3.6$  nmol/ml であり、軽度-中等度高 Hcy 血症者は、男性 4 名、女性 1 名のみで、全体の約 3% に過ぎなかった。

対象全体および女性の血漿 Hcy 濃度は、MTHFR 遺伝子多型による差を認めなかった。男性では、CC 型で CT 型に比べて血漿 Hcy 濃度が高く ( $p < 0.05$ )、TT 型と同程度であった。男性は女性に比べて血漿 Hcy 濃度が高かった (対象全体および CC 型: いずれも  $p < 0.001$ )。

本対象では、治療法別の血漿 Hcy 濃度には差がなく、いずれの治療法においても、男性は女性に比べて血漿 Hcy 濃度が高かった (いずれも  $p < 0.01$ )。

合併症の有無別にみると、腎症合併者 (66 名) の血漿 Hcy 濃度が  $7.9 \pm 3.2$  nmol/ml と非合併者 (83 名) の  $7.3 \pm 3.9$  nmol/ml に比べて高値傾向 ( $p = 0.055$ ) にあった。神経障害および網膜症の合併による血漿 Hcy 濃度の差はみられなかった。各合併症の有無にかかわらず、男性の血漿 Hcy 濃度は女性に比べて高かった (いずれも  $p < 0.01$ )。

喫煙者 (23 名) の血漿 Hcy 濃度は  $9.6 \pm 5.1$  nmol/ml と非喫煙者 (126 名) の  $7.2 \pm 3.1$  nmol/ml に比べて高かった ( $p < 0.05$ )。また、飲酒習慣のある者 (54 名) では血漿 Hcy 濃度が  $8.6 \pm 4.0$  nmol/ml と、飲酒習慣のない者 (95 名) の  $6.9 \pm 3.2$  nmol/ml に比

べて高かった ( $p < 0.01$ )。

血清葉酸濃度は基準値下限を下回る者はいなかった。血清葉酸濃度は、女性では MTHFR 遺伝子多型の CC 型は CT 型と差がなく、TT 型に比べて高かった ( $p < 0.05$ ) が、対象全体および男性では多型による差がなかった。男性は女性に比べて対象全体および CC 型、CT 型で血清葉酸濃度が低かった (対象全体および CC 型:  $p < 0.001$ 、CT 型:  $p < 0.05$ )。

血清 V.B<sub>12</sub> 濃度も基準値下限を下回る者はおらず、男女とも MTHFR 遺伝子多型別の血清 V.B<sub>12</sub> 濃度には差がなかった。男性は女性に比べて対象全体と CC 型で血清 V.B<sub>12</sub> 濃度が低かった (対象全体:  $p < 0.01$ 、CC 型:  $p < 0.05$ )。

血清 V.B<sub>6</sub> 濃度が基準値以下の者は男性 18 名、女性 3 名であったが、いずれの対象も血漿 Hcy 濃度は基準範囲内であった。血清 V.B<sub>6</sub> 濃度は MTHFR 遺伝子多型間および男女間で全く差を認めなかった。

なお、本対象において、V.B<sub>12</sub> 製剤、V.B 群サプリメントのいずれかまたは両方を服用していたのは 45 名 (30.2%) であった。これらの対象の血清 V.B<sub>12</sub> 濃度は  $1361 \pm 667$  pg/ml、血清 V.B<sub>6</sub> 濃度は  $39.4 \pm 68.9$   $\mu$ g/ml であり、非服用者 (104 名) の  $679 \pm 354$  pg/ml ( $p < 0.001$ )、 $13.2 \pm 14.1$   $\mu$ g/ml ( $p < 0.01$ ) に比べて高かった。しかし、血清葉酸濃度は服用者で  $15.0 \pm 7.9$  ng/ml、非服用者で  $14.5 \pm 7.2$  ng/ml、血漿 Hcy 濃度は服用者で  $7.5 \pm 4.7$  nmol/ml、非服用者で  $7.6 \pm 3.0$  nmol/ml であり、V.B<sub>12</sub> 製剤や V.B 群サプリメントの服用有無による差がみられなかった。

### 3-4-3. 2 型糖尿病患者の糖代謝指標と血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub> 濃度の関連

表 3-3 に示したように、HbA<sub>1c</sub>、FPG と血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub> 濃度との間には有意な相関関係はみられなかった。

#### 3-4-4. 2 型糖尿病患者における食品群別食物摂取頻度

各食品群について、1 日あたりの摂取回数の平均値を表 3-4 に示した。

タンパク質は Hcy 代謝に影響する因子のひとつである<sup>74)</sup>が、タンパク質供給源となる食品の平均摂取回数は、「大豆・大豆製品」および「卵」がそれぞれ 0.9 回/日、「魚」が 0.6 回/日であったのに対し、「肉」では 0.3 回/日であった。

MTHFR 遺伝子多型別に食品群別食物摂取頻度を比較すると、男性では「肉類」摂取頻度が CT 型は TT 型より少なく( $p < 0.05$ )、女性では「油脂類」摂取頻度が CC 型は TT 型より多く、「アルコール」摂取頻度が CC 型は TT 型よりも少なかった(いずれも  $p < 0.05$ )。しかし、その他の食品群については多型間で差がなかった。

一方、食品群別食物摂取頻度は性差が大きかった。対象全体および CC 型では、男性は女性に比べて「海藻・きのこ」(対象全体: $p < 0.001$ 、CC 型  $p < 0.05$ )、「野菜」(対象全体: $p < 0.01$ 、CC 型: $p < 0.05$ )、「果物」(いずれも  $p < 0.01$ )、「大豆・大豆製品」、「魚」(いずれも  $p < 0.05$ )摂取頻度が少なく、「アルコール」(いずれも  $p < 0.001$ )摂取頻度が多かった。また CT 型では男性は女性に比べて「海藻・きのこ」( $p < 0.05$ )摂取頻度が少なく、「野菜」摂取頻度が少ない傾向にあり( $p = 0.076$ )、「アルコール」摂取頻度が多かった( $p < 0.001$ )。TT 型では男性は女性に比べて「海藻・きのこ」摂取頻度( $p = 0.077$ )が少ない傾向にあり、「アルコール」摂取頻度が多かった( $p < 0.05$ )。

#### 3-4-5. 2 型糖尿病患者における食事パターンの抽出

対象の食事パターンを抽出するため、対象全体について、13 食品群を用いた主成分分析を行なった。

因子数の決定方法として、固有値 1 以上を採用する「カイザー基準」と、スクリープロットによる固有値の変化をもとに、曲線が緩やかなスクリーとなる手前までを採用する「スクリー基準」があり、解釈可能性を考慮のうえ選択すべきとされている<sup>75)</sup>。本研究で

はカイザー基準では4因子、スクリー基準では2因子が選択されたが、解釈可能性は後者の方が高く、2因子構造とすることが妥当と考えられた。そこで、2因子を仮定した主成分分析を行い、直交回転(バリマックス法)をかけた。2因子の累積寄与率は35.1%であった。食事パターンを意味付ける食品群として因子負荷量0.5以上を採用し、クロンバックの $\alpha$ 係数を用いて尺度内の一貫性を確認した。その結果、「海藻・きのこ」、「魚」、「大豆・大豆製品」、「野菜」、「果物」からなる第1主成分と「肉類」、「卵」、「チーズ」、「牛乳・チーズ以外の乳製品」からなる第2主成分が抽出された。第1主成分ではクロンバックの $\alpha$ 係数が0.714で内的整合性が高かったのに対し、第2主成分は0.419で内的整合性が低かったが、本検討では第2主成分も含めて解析を行なうこととした。

第1主成分は研究1の“日本食パターン”に類似した食品で構成されていたため“日本型食パターン”と命名した。また、第2主成分は主に動物性食品で構成されていることから、第2主成分を“動物性食品パターン”と命名した(表3-5)。

“日本型食パターン”スコアは-1.941 から 2.917 に分布し、男性では $-0.401 \pm 0.905$ と、女性の $0.417 \pm 0.925$ に比べて低かった( $p < 0.001$ )。“動物性食品パターン”スコアは-2.867 から 2.417 に分布し、男性では $0.327 \pm 0.972$ と女性の $-0.340 \pm 0.918$ に比べて高かった(図3-1)。

#### 3-4-6. 2型糖尿病患者の血漿Hcy濃度、血清葉酸およびV.B6、V.B12濃度と食品群別食物摂取頻度と食事パターンスコアとの関連

血漿Hcy濃度、血清葉酸およびV.B6、V.B12濃度と各食品群の摂取頻度と食事パターンスコアとの間の単相関分析を行なった。

相関係数は低いものの、対象全体では、log血漿Hcy濃度と「野菜」( $p < 0.001$ )、「海藻・きのこ」( $p < 0.05$ )の摂取頻度および“日本型食パターン”スコア( $p < 0.01$ )が逆相関、“動物性食品パターン”が正相関( $p < 0.05$ )し、log血清葉酸濃度と「果物」( $p <$



0.01)、「魚」( $p < 0.05$ )、「海藻・きのこ」( $p < 0.05$ )摂取頻度および“日本型食パターン”スコア( $p < 0.01$ )との正相関、log 血清 V.B12 濃度と「野菜」( $p < 0.01$ )、「海藻・きのこ」( $p < 0.05$ )の摂取頻度および“日本型食パターン”スコア( $p < 0.01$ )との正相関が認められた。

男女別にみると、男性では log 血漿 Hcy 濃度と「野菜」の摂取頻度( $p < 0.001$ )および“日本型食パターン”スコア( $p < 0.05$ )が逆相関し、log 血清 V.B6 濃度が「魚」( $p < 0.01$ )、「大豆・大豆製品」( $p < 0.05$ )の摂取頻度および“日本型食パターン”スコア( $p < 0.05$ )と正相関を示した。また、log 血清 V.B12 濃度と“日本型食パターン”スコアは正相関( $p < 0.01$ )した。女性ではこれらの血中濃度と個別の食品群別食物摂取頻度との間に有意な単相関は見られなかった(表 3-5)。

### 3-5. 考察

今回対象とした外来 2 型糖尿病患者の血漿 Hcy 濃度は低く、Hcy の再メチル化に必須の葉酸と V.B12 の血中濃度が比較的高かった。我々の結果を本研究とほぼ同じ年齢、体格、血糖コントロールの集団を対象とし、2 型糖尿病患者の血清 Hcy 濃度と腎機能指標との関連を検討した Masuda ら<sup>65)</sup>の報告と比べると、男女とも我々の対象の方が、Hcy 濃度が 30%程度低かった。喫煙<sup>25)</sup>や飲酒<sup>26)</sup>および V.B 群の摂取<sup>9,14,15,24)</sup>は血漿 Hcy 濃度と関連することが報告されている。本研究でも喫煙や飲酒の習慣を有する者の血漿 Hcy 濃度が高かったが、Masuda らの報告に比べると、我々の対象では喫煙者および飲酒者の割合が 10%程度低かった。また、これまで V.B 群サプリメントの摂取が血漿 Hcy 濃度を低下させることから、V.B12 製剤や V.B 群サプリメント投与の有用性が報告されている<sup>55-57)</sup>。本研究の V.B12 製剤あるいは V.B 群サプリメントの服用者は、非服用者に比べて血清 V.B12 濃度が高かったが、非服用者も含めて対象の血清葉酸、V.B12 濃度は全体的に高かった。このことから、本研究対象の 2 型糖尿病患

者の血漿 Hcy 濃度低値と血清葉酸および V.B12 濃度の高値は、V.B12 製剤や V.B 群サプリメントの影響によるものだけではないことが明らかであった。Masuda ら<sup>65)</sup>は血清ビタミン濃度を測定しておらず、食事に関する情報も示されていないため我々の結果と直接比較できないが、喫煙、飲酒、食事を含めた生活習慣の違いが、本対象の血漿 Hcy 濃度および血清ビタミン濃度に反映されていたものと思われる。

これまでに、食事内容と血漿 Hcy 濃度や血清ビタミン濃度との関連については、習慣的な食事摂取状況が Hcy やビタミンの血中濃度に反映されると考えられている<sup>74, 75)</sup>。本研究対象の 2 型糖尿病患者の平均摂取頻度では、「野菜」を毎日、「大豆・大豆製品」をほぼ毎日摂取しており、「肉類」よりも「魚」の摂取頻度が高かった。特に女性は男性と比べて「野菜」、「大豆・大豆製品」、「魚」、「海藻・きのこ」、「果物」の摂取頻度が高かったが、これらの食品はいずれも先行研究<sup>27-29, 50-53)</sup>において血漿 Hcy 濃度低値との関連が報告されている。

一般的に野菜類は葉酸の主な供給源となるものが多く、果物類は葉酸の安定化に必要なビタミン C の供給源である。平成 21 年度国民健康・栄養調査成績<sup>76)</sup>によると、20 歳以上の日本人では、葉酸を主に野菜類、大豆・加工品、果実類から摂取しており、それぞれ総葉酸摂取量の 39%、6%、5%を占めていた。また、総 V.B6 摂取量は 12%を野菜類、10%を魚介類から、総 V.B12 摂取量は 72%を魚介類から摂取していた。このように、葉酸、V.B6、V.B12 の重要な供給源となる食品を女性は男性に比べて高頻度に摂取していたことが明らかである。なお、「海藻・きのこ」の中には、常用量では葉酸供給源にならないものもあるが、のりやわかめのように常用量あたりでも葉酸が比較的多く摂取できるものを組み合わせて摂取する等により、葉酸供給源となることが期待できる。

すなわち、本研究対象の 2 型糖尿病患者では、Hcy 代謝に関連するビタミン供給源となる食品を比較的高頻度に摂取しており、特に女性では全体的にこれらの摂取状

況が良かったことが特徴的であることが分かった。そのため、女性では食品群別食物摂取頻度と血漿 Hcy 濃度、血清葉酸、V.B6、V.B12 濃度との間に有意な単相関関係が得られなかったものと推察される。

一方、男性および対象全体では「野菜」、「海藻・きのこ」、「果物」、「大豆・大豆製品」、「魚」の個々の摂取頻度と血漿 Hcy 濃度や血清葉酸、V.B6、V.B12 濃度との間に関連を認めた。これらは、主成分分析にて第一主成分として抽出された“日本型食パターン”を構成する食品でもあった。血漿 Hcy 濃度、血清 V.B6、V.B12 濃度については、“日本型食パターン”スコアよりも個々の食品群別食物摂取頻度との相関係数と有意性が高かったが、対象全体の血清葉酸濃度は、“日本型食パターン”スコアとの相関係数と有意性がともに高かった。“日本型食パターン”を構成する食品は、葉酸の他、葉酸の代謝や安定化に関与するビタミンの供給源ともなる食品である。これは、単純に葉酸の供給源となる食品だけを摂取するよりも、葉酸代謝に関与する複数の食品を組み合わせることで、血清葉酸濃度を良好に維持するために有効であることが示されたものといえよう。また、対象全体で「肉類」、「卵」、「チーズ」、「牛乳・チーズ以外の乳製品」の摂取頻度を組み合わせた“動物性食品パターン”スコアと血漿 Hcy 濃度の間に正の関連を認めた。これらの食品には Hcy の前駆体であるメチオニン<sup>1)</sup>が含まれていることから、動物性食品の摂取状況についても考慮すべきと思われる。

以上の結果から、血清葉酸および V.B12 濃度を維持し、高 Hcy 血症を予防するために、“日本型食パターン”の食品を組み合わせることで、血清葉酸濃度を良好に維持することが示唆された。なお、以前から男性と比べて女性の血漿 Hcy 濃度が低く、血清葉酸、V.B12 濃度が高いことが報告されているが<sup>8)</sup>、今回の結果から、喫煙や飲酒に加えて、これらの食品の摂取習慣の違いが血漿 Hcy 濃度と血清ビタミン濃度における性差の原因と考えられた。

ところで、MTHFR 遺伝子多型は血清葉酸濃度に影響し血漿 Hcy 濃度を規定するこ

とがよく知られている<sup>1, 2, 10,13,14)</sup>。しかし本研究では、女性の血清葉酸濃度が CC 型と CT 型は TT 型に比べて高かったが、血漿 Hcy 濃度は多型間で差がなかった。また男性においては、血漿 Hcy 濃度がこれまで多型間で最も低いとされていた CC 型で CT 型に比べて高く、TT 型と同程度で従来の報告<sup>1, 2)</sup>とは異なり、血清葉酸濃度も多型による差がなかった。すなわち、今回対象とした外来 2 型糖尿病患者におけるこれらの血中濃度は、特に男性で MTHFR 遺伝子多型よりも食生活習慣の影響を強く受けていることが示されたといえよう。

本研究の限界として以下のことがあげられる。まず、本研究は埼玉県内の一病院の外来 2 型糖尿病患者を対象とした結果であり、非糖尿病患者との違いについて検討していない。したがって対象地域の健常者との血漿 Hcy 濃度、血清ビタミン濃度やこれらと食習慣の関連を比較することで、2 型糖尿病患者に特有な状況を、より明確にすることができであろう。今回の調査は、外来受診時の自記式調査で行なったが、短時間で詳細な情報を得ることは難しいと考え、簡単な食品群別食物摂取頻度調査にとどめた。そのため、食品群の詳細な分類や各食品群の摂取量は把握できておらず、サプリメントの利用についても、内容の詳細を把握できなかった。2 型糖尿病患者の栄養素等摂取量が血漿 Hcy 濃度、血清葉酸、V.B6、V.B12 濃度に及ぼす影響については、妥当性の検定された半定量食物摂取頻度調査や定量的な食事調査が必要である。

本研究の結果、今回対象とした 2 型糖尿病患者では、従来の報告<sup>65, 77, 78)</sup>と比べて Hcy 濃度高値者が少なく、血清葉酸および V.B12 濃度が比較的高かった。女性は男性よりも血漿 Hcy 濃度が低く、血清葉酸および V.B12 濃度が高く、「野菜」、「海藻・きのこ」、「果物」、「大豆・大豆製品」、「魚」の摂取頻度が多く、これらの組み合わせである“日本型食パターン”スコアが高かった。また、特に男性では血漿 Hcy 濃度、血清葉酸および V.B12 濃度に対して MTHFR 遺伝子多型よりもこれらの食生活習慣の影響を強く受けていることが示された。これらのことから、2 型糖尿病患者の高 Hcy 血症予防

において、“日本型食パターン”を構成する「野菜」、「海藻・きのこ」、「果物」、「大豆・大豆製品」、「魚」の摂取頻度を高めることの有用性が示唆された。また、血漿 Hcy 濃度が著しく高値を示した対象は MTHFR 遺伝子多型の TT 型を有していたことから、このような対象の血漿 Hcy 濃度を効率的に低下させるための方法も含めて今後さらに検討すべきと思われた。

### 3-6. 要旨

2 型糖尿病患者は非糖尿病患者に比べ血中 Hcy 濃度が高いとされている。そこで 40～70 歳 2 型糖尿病患者 149 名の血漿 Hcy、ビタミン濃度と食品摂取状況の関連を検討した。Hcy 濃度は  $7.6 \pm 3.6$  (Mean  $\pm$  SD) nmol/ml と正常で、血清葉酸および V.B<sub>12</sub> 濃度は比較的高く、男性は女性に比べて血漿 Hcy 濃度が高く、血清葉酸および V.B<sub>12</sub> 濃度が低かった。対象全体では MTHFR 遺伝子多型の関与は低かったが、血漿 Hcy 濃度が最も高値を示した対象は TT 型であった。女性は男性より海藻・きのこ ( $p < 0.001$ )、野菜、果物 (いずれも  $p < 0.01$ )、大豆・大豆製品、魚 (いずれも  $p < 0.05$ ) の摂取頻度とこれらを組み合わせた日本型食パターンスコア ( $p < 0.001$ ) が高く、このスコアは対象全体で log 血漿 Hcy 濃度と負、log 血清葉酸、V.B<sub>12</sub> 濃度と正の相関 (いずれも  $p < 0.01$ ) を示した。2 型糖尿病患者の高 Hcy 血症予防において、これらの食品の摂取頻度を高めることの有用性が示唆された。

### 3-7.図表

表 3-1. 対象背景

	全対象 (n=149)	男性 (n=76)	女性 (n=73)	P value
年齢(歳)	60.2 ± 7.4 <sup>a</sup>	59.9 ± 7.8	60.5 ± 7.0	0.750 <sup>b</sup>
罹病期間(年)	13.5 ± 6.6	13.5 ± 6.8	13.6 ± 6.3	0.664 <sup>b</sup>
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	24.0 ± 3.3	24.1 ± 2.9	23.9 ± 3.6	0.584 <sup>b</sup>
HbA1c (%)	7.8 ± 1.5	7.5 ± 1.5	8.1 ± 1.4	0.003 <sup>b</sup>
空腹時血糖 (mg/dl)	158.7 ± 47.2	159.1 ± 45.1	158.4 ± 49.7	0.798 <sup>b</sup>
合併症				
神経障害				
有/無 (n)	51 / 98	22 / 54	29 / 44	0.303 <sup>c</sup>
網膜症				
有/無 (n)	71 / 78	33 / 43	38 / 35	0.292 <sup>c</sup>
腎症				
有/無 (n)	66 / 83	37 / 39	29 / 44	0.271 <sup>c</sup>
治療法				
食事(n)	26	15	11	0.303 <sup>c</sup>
経口薬(n)	68	30	38	
インスリン(n)	55	31	24	
喫煙習慣				
有/無 (n)	23 / 126	22 / 54	1 / 72	0.000 <sup>d</sup>
飲酒習慣				
有/無 (n)	54 / 95	47 / 29	7 / 66	0.000 <sup>c</sup>
ビグアナイド薬処方(n)				
有/無 (n)	12 / 137	6 / 143	6 / 143	0.942 <sup>c</sup>
V.B12製剤処方(n)				
有/無 (n)	21 / 128	9 / 140	12 / 137	0.382 <sup>c</sup>
総合ビタミン剤服用				
有/無 (n)	15 / 134	10 / 66	5 / 68	0.157 <sup>c</sup>
V.B群サプリメント服用				
有/無 (n)	10 / 139	4 / 72	6 / 67	0.347 <sup>c</sup>
栄養ドリンク服用				
有/無 (n)	8 / 141	6 / 70	2 / 71	0.151 <sup>d</sup>

a: Mean ± SD

b: Mann-Whitney's U 検定

c:  $\chi^2$ 検定

d: Fisherの直接確率検定

}に基づく有意確率。いずれも男性 vs 女性

n: 人数

表3-2. 2型糖尿病患者の血漿Hcy, 血清葉酸, V.B<sub>6</sub>, V.B<sub>12</sub>濃度とMTHFR遺伝子多型

	MTHFR 遺伝子多型	全対象 (n=149)		男性 (n=76)		女性 (n=73)		b P value
		n		n		n		
Hcy (nmol/ml)	CC	75	7.5 ± 3.6 <sup>a</sup>	37	9.3 ± 4.2	38	5.7 ± 1.4	0.000
	CT	48	6.9 ± 1.9	24	7.4 ± 1.7	24	6.4 ± 2.1	0.095
	TT	26	9.1 ± 5.1	15	9.5 ± 3.8	11	8.6 ± 6.8	0.087
	CC+CT+TT	149	7.6 ± 3.6	76	8.7 ± 3.6	73	6.3 ± 3.1	0.000
葉酸 (ng/ml)	CC	75	15.0 ± 7.2	37	11.8 ± 5.2	38	18.0 ± 7.6	0.000
	CT	48	15.0 ± 8.1	24	12.8 ± 6.2	24	17.2 ± 9.3	0.027
	TT	26	12.9 ± 6.5	15	12.6 ± 5.8	11	13.4 ± 7.7	0.646
	CC+CT+TT	149	14.6 ± 7.4	76	12.3 ± 5.6	73	17.1 ± 8.3	0.000
V.B <sub>6</sub> (μg/ml)	CC	75	22.0 ± 49.9	37	24.3 ± 67.8	38	19.7 ± 22.6	0.148
	CT	48	19.4 ± 26.0	24	20.3 ± 22.1	24	18.4 ± 29.8	0.536
	TT	26	21.9 ± 36.9	15	17.5 ± 22.9	11	27.8 ± 51.1	0.134
	CC+CT+TT	149	21.1 ± 41.2	76	21.7 ± 49.6	73	20.5 ± 30.3	0.156
V.B <sub>12</sub> (pg/ml)	CC	75	854.0 ± 562.3	37	701.9 ± 424.4	38	1002.2 ± 641.3	0.011
	CT	48	919.1 ± 578.5	24	887.0 ± 578.5	24	951.2 ± 589.1	0.348
	TT	26	912.9 ± 561.3	15	848.7 ± 476.3	11	1000.5 ± 674.9	0.574
	CC+CT+TT	149	885.3 ± 564.4	76	789.3 ± 488.8	73	985.2 ± 621.3	0.008

a: Mean±SD

b: Mann-Whitney's U 検定に基づく有意確率 男性vs女性

\*: Mann-Whitney's U 検定に基づく有意確率 p<0.05 MTHFR遺伝子多型間の比較

n: 人数



表3-3. 2型糖尿病患者の血漿Hcy, 血清葉酸, V.B6, V.B12濃度と糖代謝指標の単相関

	全対象 (n=149)						男性 (n=76)						女性 (n=74)					
	FPG			HbA1c			FPG			HbA1c			FPG			HbA1c		
	r	p		r	p		r	p		r	p		r	p		r	p	
log Hcy (nmol/ml)	-0.056	0.498		-0.258	0.096		-0.177	0.125		-0.185	0.110		0.025	0.832		-0.130	0.274	
log 葉酸 (ng/ml)	0.003	0.968		0.243	0.278		0.047	0.684		0.149	0.200		-0.041	0.733		0.136	0.252	
log V.B6 (μg/ml)	-0.003	0.968		-0.008	0.927		0.122	0.293		0.009	0.939		-0.126	0.289		-0.087	0.464	
log V.B12 (pg/ml)	0.100	0.225		0.217	0.788		0.053	0.646		0.155	0.180		0.189	0.110		0.255	0.295	

FPG=空腹時血糖; HbA1c=ヘモグロビンA1c

r: Pearsonの積率相関係数

p: Pearsonの単相関分析に基づく有意確率

表 3-4. 2 型糖尿病患者の食品群別食物摂取頻度と MTHFR 遺伝子多型

	MTHFR 遺伝子多型	全対象 (n=149)		男性 (n=76)		女性 (n=73)		P value <sup>b</sup>
		n		n		n		
穀類 (回/日)	CC	75	2.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	37	2.9 ± 0.2	38	2.9 ± 0.3	0.252
	CT	48	2.9 ± 0.2	24	2.9 ± 0.3	24	3.0 ± 0.2	0.555
	TT	26	3.0 ± 0.2	15	3.0 ± 0.0	11	2.9 ± 0.3	0.721
	CC+CT+TT	149	2.9 ± 0.2	76	2.9 ± 0.2	73	2.9 ± 0.3	0.686
果物 (回/日)	CC	75	0.3 ± 0.3	37	0.2 ± 0.2	38	0.4 ± 0.3	0.009
	CT	48	0.3 ± 0.3	24	0.2 ± 0.2	24	0.4 ± 0.4	0.129
	TT	26	0.2 ± 0.3	15	0.2 ± 0.2	11	0.3 ± 0.3	0.357
	CC+CT+TT	149	0.3 ± 0.3	76	0.2 ± 0.2	73	0.4 ± 0.3	0.001
大豆・大豆製品 (回/日)	CC	75	0.7 ± 0.3	37	0.6 ± 0.3	38	0.7 ± 0.3	0.028
	CT	48	0.6 ± 0.3	24	0.6 ± 0.3	24	0.7 ± 0.3	0.587
	TT	26	0.6 ± 0.4	15	0.5 ± 0.3	11	0.6 ± 0.4	0.443
	CC+CT+TT	149	0.6 ± 0.3	76	0.6 ± 0.3	73	0.7 ± 0.3	0.021
魚 (回/日)	CC	75	0.5 ± 0.3	37	0.4 ± 0.3	38	0.5 ± 0.3	0.046
	CT	48	0.5 ± 0.3	24	0.5 ± 0.3	24	0.6 ± 0.3	0.307
	TT	26	0.4 ± 0.3	15	0.4 ± 0.2	11	0.4 ± 0.3	0.919
	CC+CT+TT	149	0.5 ± 0.3	76	0.4 ± 0.3	73	0.5 ± 0.3	0.029
肉類 (回/日)	CC	75	0.3 ± 0.3	37	0.3 ± 0.3	38	0.4 ± 0.3	0.304
	CT	48	0.2 ± 0.3	24	0.2 ± 0.2	24	0.3 ± 0.3	0.975
	TT	26	0.3 ± 0.3	15	0.4 ± 0.3	11	0.2 ± 0.2	0.330
	CC+CT+TT	149	0.3 ± 0.3	76	0.3 ± 0.2	73	0.3 ± 0.3	0.804
卵 (回/日)	CC	75	0.6 ± 0.3	37	0.6 ± 0.3	38	0.6 ± 0.3	0.684
	CT	48	0.6 ± 0.4	24	0.7 ± 0.4	24	0.5 ± 0.3	0.114
	TT	26	0.6 ± 0.4	15	0.7 ± 0.4	11	0.6 ± 0.3	0.330
	CC+CT+TT	149	0.6 ± 0.3	76	0.6 ± 0.3	73	0.6 ± 0.3	0.250
チーズ (回/日)	CC	75	0.2 ± 0.2	37	0.2 ± 0.3	38	0.1 ± 0.2	0.698
	CT	48	0.2 ± 0.3	24	0.1 ± 0.2	24	0.2 ± 0.3	0.140
	TT	26	0.1 ± 0.2	15	0.1 ± 0.2	11	0.1 ± 0.1	0.760
	CC+CT+TT	149	0.2 ± 0.2	76	0.2 ± 0.2	73	0.1 ± 0.2	0.467
牛乳・チーズ以外の乳製品 (回/日)	CC	75	1.1 ± 0.6	37	1.0 ± 0.7	38	1.1 ± 0.6	0.393
	CT	48	1.1 ± 0.7	24	1.0 ± 0.6	24	1.3 ± 0.7	0.132
	TT	26	1.1 ± 0.6	15	1.1 ± 0.4	11	1.2 ± 0.7	0.507
	CC+CT+TT	149	1.1 ± 0.6	76	0.9 ± 0.6	73	1.2 ± 0.6	0.086
油脂類 (回/日)	CC	75	0.5 ± 0.4	37	0.5 ± 0.4	38	0.6 ± 0.4	0.524
	CT	48	0.6 ± 0.5	24	0.7 ± 0.6	24	0.5 ± 0.5	0.420
	TT	26	0.4 ± 0.4	15	0.5 ± 0.5	11	0.3 ± 0.3	0.134
	CC+CT+TT	149	0.5 ± 0.5	76	0.6 ± 0.5	73	0.5 ± 0.4	0.659
野菜類 (回/日)	CC	75	1.4 ± 0.6	37	1.2 ± 0.6	38	1.5 ± 0.5	0.016
	CT	48	1.5 ± 0.5	24	1.4 ± 0.6	24	1.6 ± 0.5	0.076
	TT	26	1.2 ± 0.6	15	1.2 ± 0.6	11	1.4 ± 0.6	0.413
	CC+CT+TT	149	1.4 ± 0.6	76	1.3 ± 0.6	73	1.5 ± 0.5	0.002
野菜ジュース (回/日)	CC	75	0.1 ± 0.3	37	0.2 ± 0.3	38	0.1 ± 0.2	0.513
	CT	48	0.2 ± 0.3	24	0.2 ± 0.3	24	0.2 ± 0.3	0.510
	TT	26	0.2 ± 0.3	15	0.1 ± 0.3	11	0.2 ± 0.3	0.305
	CC+CT+TT	149	0.2 ± 0.3	76	0.2 ± 0.3	73	0.1 ± 0.3	0.753
海藻・きのこ (回/日)	CC	75	0.5 ± 0.3	37	0.4 ± 0.3	38	0.6 ± 0.3	0.024
	CT	48	0.5 ± 0.3	24	0.4 ± 0.3	24	0.6 ± 0.4	0.027
	TT	26	0.4 ± 0.3	15	0.3 ± 0.2	11	0.5 ± 0.3	0.077
	CC+CT+TT	149	0.5 ± 0.3	76	0.4 ± 0.3	73	0.6 ± 0.3	0.000
アルコール (回/日)	CC	75	0.2 ± 0.3	37	0.4 ± 0.4	38	0.1 ± 0.2	0.000
	CT	48	0.2 ± 0.4	24	0.4 ± 0.4	24	0.0 ± 0.0	0.000
	TT	26	0.4 ± 0.4	15	0.5 ± 0.4	11	0.2 ± 0.4	0.036
	CC+CT+TT	149	0.2 ± 0.4	76	0.4 ± 0.4	73	0.1 ± 0.2	0.000

a: Mean±SD

b: Mann-Whitney's U 検定に基づく有意確率 男性vs女性

\*: Mann-Whitney's U 検定に基づく有意確率 p&lt;0.05 MTHFR遺伝子多型間の比較

n: 人数

表 3-5. 2 型糖尿病患者における食事パターンの抽出

	因子負荷量	
	第1主成分 (日本型食パターン)	第2主成分 (動物性食品パターン)
穀類	-0.098	0.362
果物	<b>0.503</b>	0.030
大豆・大豆製品	<b>0.727</b>	0.141
魚	<b>0.664</b>	0.283
肉類	-0.042	<b>0.585</b>
卵	-0.088	<b>0.547</b>
チーズ	0.198	<b>0.588</b>
牛乳・チーズ以外の乳製品	0.409	<b>0.510</b>
油脂類	0.310	0.472
野菜類	<b>0.664</b>	0.228
野菜ジュース	0.130	0.329
海藻・きのこ	<b>0.760</b>	-0.091
アルコール	-0.315	0.130
寄与率(%)	24.1	11.0
クロンバックの $\alpha$ 係数	0.714	0.419

表3-6. 2型糖尿病患者の血漿Hcy濃度、血清葉酸、V.B6、V.B12濃度と食品群別食物摂取頻度および食事パターンスコアとの関連

全対象 (n=149)			男性 (n=76)		女性 (n=73)	
	r	p	r	p	r	p
log Hcy (nmol/ml)	野菜類	-0.307 0.000	野菜類	-0.307 0.007		
	海藻・きのこ	-0.180 0.028				
	日本型食パターンスコア	-0.280 0.001	日本型食パターンスコア	-0.234 0.042	N.S.	
	動物性食品パターンスコア	0.169 0.039				
log 葉酸 (ng/ml)	果物	0.213 0.009				
	魚	0.164 0.045				
	海藻・きのこ	0.175 0.032	N.S.		N.S.	
	日本型食パターンスコア	0.250 0.002				
log V.B6 (μg/ml)	N.S.		大豆・大豆製品	0.270 0.018		
			魚	0.346 0.002		N.S.
			日本型食パターンスコア	0.259 0.024		
log V.B12 (pg/ml)	野菜類	0.222 0.006		0.360 0.001		
	海藻・きのこ	0.176 0.031				N.S.
	日本型食パターンスコア	0.221 0.007	日本型食パターンスコア	0.328 0.004		

r: Spearmanの順位相関係数

p: Spearmanの単相関分析に基づく有意確率

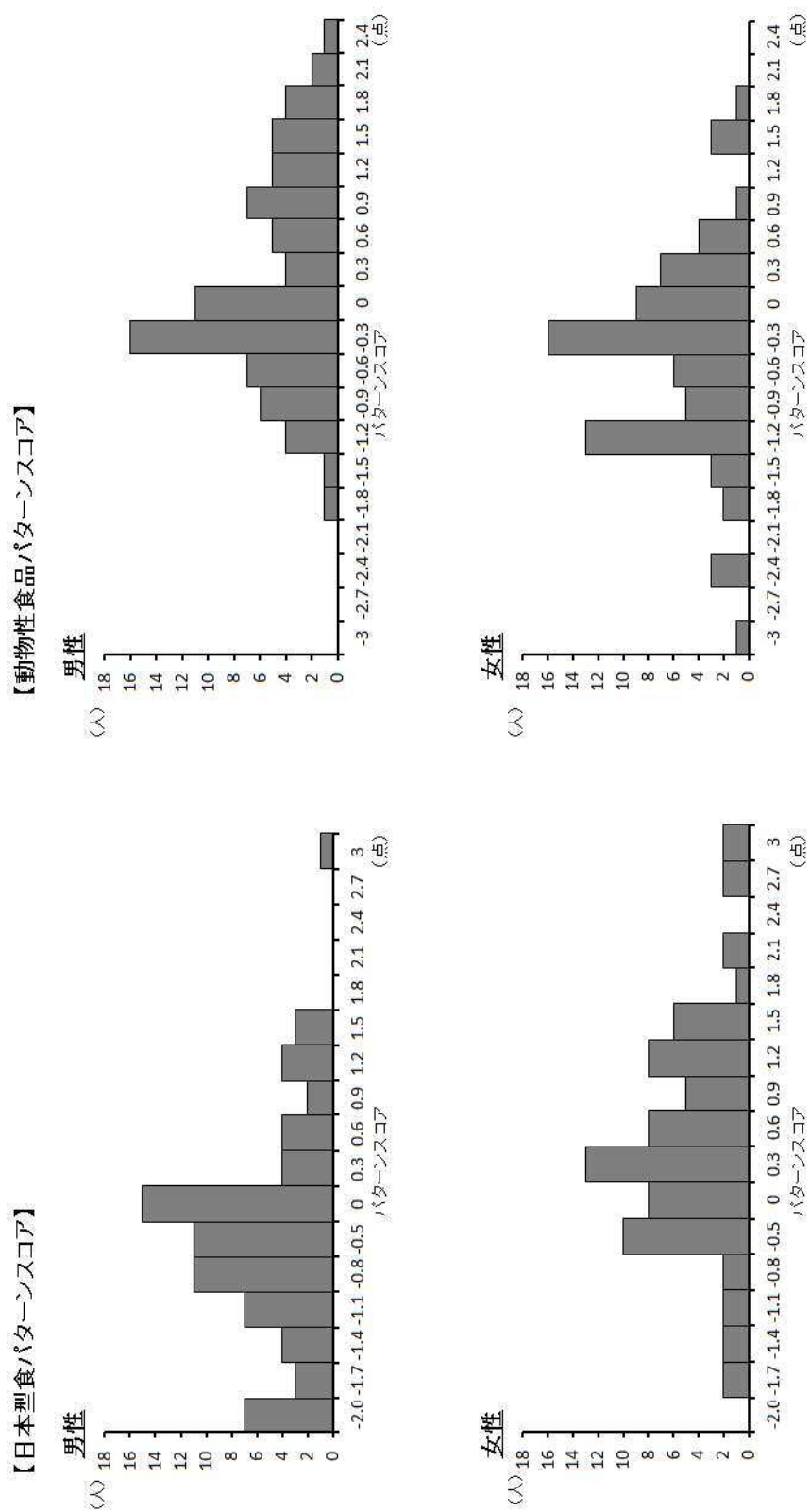


図3-1. 食事パターンスコアの分布

## 第1章 結語

本章では、動脈硬化のリスクが高いとされる男性や糖尿病患者に着目し、20代[研究1]及び30～40代[研究2]勤労男性と2型糖尿病患者のHcy代謝指標に対する食習慣や遺伝素因の関連を検討した。

### 研究1

対象とした20代勤労男性の約1割が軽度-中等度高Hcy血症であった。MTHFR遺伝子多型のTT型では血漿Hcy濃度が高く、血清葉酸濃度が低かった。MTHFR遺伝子多型で調整してHcy代謝指標と食習慣の関連を検討した結果、主成分分析で抽出された野菜、海藻、きのこ・こんにゃく、果物、大豆・大豆製品、大豆以外の豆・豆製品、魚で構成される“日本食型パターン”スコアとHcy濃度が逆相関、葉酸濃度が正相関を示した。

### 研究2

対象とした30～40代勤労男性では喫煙習慣のある者が半数以上を占め、軽度-中等度高Hcy血症者が約3割と多かった。TT型では喫煙習慣の有無に関わらず血漿Hcy濃度が高かったが、喫煙者では非喫煙者に比べて軽度-中等度高Hcy血症者の割合が高く、特にCT型では有意であった。また、研究1の“日本食パターンを”構成する食品摂取頻度得点の合計は、MTHFR遺伝子多型で調整した葉酸濃度と正相関傾向にあり、特に喫煙者では有意であった。

### 研究3

対象とした2型糖尿病患者の血漿Hcy濃度は従来の報告と比べて低く、血清葉酸およびV.B12濃度は比較的高く、この傾向は特に女性で顕著だった。男性は女性に比べて海藻・きのこ、野菜、果物、大豆・大豆製品、魚の摂取頻度とこれらを組み合わせた“日本型食パターン”のスコアが低かった。このスコアは対象全体と男性で血漿

Hcy 濃度と逆相関を示し、対象全体では血清葉酸およびV.B12濃度との正相関も認めた。

研究 1～3 の結果から、日本人勤労男性および 2 型糖尿病患者において、葉酸や V.B6 および V.B12、V.B2 供給源となる食品の複合的な摂取が Hcy 代謝指標の良好な維持に有用であることが示唆された。

## 第2章 葉酸とビタミンB<sub>2</sub>の相互作用がホモシステイン代謝に及ぼす影響に関する 検討

### [研究 4] 若年成人男性における葉酸、ビタミン B<sub>2</sub> サプリメント短期投与の ホモシステイン代謝指標に対する影響

#### 4-1. 緒言

これまでに、葉酸や V.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub> の Hcy 低下効果は多数報告されている<sup>9, 14, 15, 24)</sup>。また、Hcy の再メチル化に必須の 5-MTHF は V.B<sub>2</sub> 依存性の MTHFR の作用を介して産生されることから、V.B<sub>2</sub> の Hcy 低下効果も示唆されている<sup>79, 80)</sup>。

葉酸と V.B<sub>2</sub> の相互作用が Hcy 濃度変化に及ぼす影響について、ヒトリンパ球を用いて検討した Kimura らの実験では、培地への V.B<sub>2</sub> 添加量が多いほど Hcy 濃度が低くなっていた<sup>81)</sup>。欧米での疫学調査において血漿中 V.B<sub>2</sub> 濃度と Hcy 濃度の逆相関関係が認められ<sup>82, 83)</sup>、V.B<sub>2</sub> が Hcy の規定因子となる可能性が示唆されている。さらに、V.B<sub>2</sub> の主な供給源である乳製品の摂取頻度が高い対象の血漿 Hcy 濃度が低いことも報告されているが<sup>84)</sup>、我々が 20 代勤労男性を対象として行なった研究 1 においても、ヨーグルトの摂取頻度と血漿 Hcy 濃度との間に負の傾向性を認めた。また、研究 1～3 で Hcy 代謝に対して共通に有効性が示唆された魚類は V.B<sub>2</sub> の供給源となる食品だった。このように、第 1 章においても V.B<sub>2</sub> の Hcy 代謝への関与が示唆された。しかし、V.B<sub>2</sub> サプリメント投与では Hcy 濃度が変化しなかったとする報告<sup>85, 86)</sup>もあり、ヒトにおける V.B<sub>2</sub> の Hcy 低下効果や葉酸と V.B<sub>2</sub> を組み合わせた効果には不明な点が多い。

そこで、若年成人男性を対象とし、短期間の葉酸と V.B<sub>2</sub> サプリメントの投与が血漿 Hcy 濃度や血中葉酸および V.B<sub>2</sub>、V.B<sub>12</sub> 濃度変化に及ぼす影響を検討した。

#### 4-2. 対象

首都圏在住の 20 代勤労男性ボランティア 67 名のうち、事前調査の結果から、①現病歴および既往歴なし、②ビタミンサプリメント非利用者、③1 日あたりの喫煙本数 10 本



程度、⑤運動習慣なしといった条件を満たしていることが確認でき、書面にてインフォームドコンセントの得られた 47 名を介入対象とした。

採血時の溶血によって正確なデータが得られなかった 3 名、介入試験開始時、終了時における血液生化学検査の結果、TG 150 mg/dl 以上、TC 220 mg/dl 以上、HDL-C 100 mg/dl 以上、AST 29 IU/l 以上、ALT 30 IU/l 以上、 $\gamma$ -GTP 60 IU/l 以上、FPG 110mg/dl 以上のいずれかまたは複数に該当した 6 名、軽度のインスリン作用不足 ( $12 \mu$  U/ml 以上) が疑われた 5 名を除外し、糖・脂質代謝および肝機能に異常のない 33 名を解析対象とした。

なお、本研究は、日本女子大学「ヒトを対象とした実験研究に関する倫理委員会」の承認を得て実施した。

### 4-3. 方法

#### 4-3-1. プロトコール

介入対象 47 名を二重盲検法にて無作為に葉酸群、V.B<sub>2</sub> 群、葉酸&V.B<sub>2</sub> 群、コントロール群の 4 群に割り付け、2 週間の試験剤投与試験を実施した。

1 日あたりの投与量は、葉酸については 5mg 以上の過剰摂取が悪性貧血の潜在化やある種の癌細胞増殖促進に影響する可能性が報告されている<sup>87)</sup>ことから、対象が食事によって推定平均必要量を充足した場合を想定し、許容上限の 1mg から推定平均必要量の 200  $\mu$ g を除いた 800  $\mu$ g とし、1 錠あたりの葉酸含量が 200  $\mu$ g のネイチャーメイド葉酸(大塚製薬)を用いた。V.B<sub>2</sub> については、V.B<sub>2</sub> 欠乏の治療で 1 日あたり 5 ～10mg の V.B<sub>2</sub> が投与されること<sup>88)</sup>、7mg の V.B<sub>2</sub> サプリメントを 2 週間投与しても血中 V.B<sub>2</sub> 濃度の有意な上昇はみられなかったことが報告されている<sup>89)</sup>。これらを参考とし、今回使用したネイチャーメイドビタミン B<sub>2</sub>(大塚製薬)の V.B<sub>2</sub> 含有量が 1 錠あたり 1.4mg であったことから、7mg と 10mg のほぼ中央値となる 8.4mg を 1 日あたりの投与量とした。

また、プラセボとしてサプリメントと同じ重量の乳糖製錠を作成して用いた。

試験期間中は、激しい運動や旅行を避けた通常の生活を送ること、試験剤は毎食後に服用することを原則とし、開始時に配布したチェックシートに期間中の食事摂取および試験剤服用状況、体調等を記入してもらい、終了時に回収した(図 4-1)。

#### 4-3-2. 身体計測、血圧測定

身長、体重をもとに BMI を算出した。血圧は座位安静の後、水銀血圧計を用い、上腕動脈にて拡張期血圧および収縮期血圧をそれぞれ 2 回ずつ測定した平均値を解析に用いた。

#### 4-3-3. 血液生化学検査

研究 1～3 と同様に早朝空腹時採血にて得られた血清を用いて TG、TC、HDL-C を酵素法<sup>39)</sup>で測定し、LDL-C は Friedewald の計算式<sup>40)</sup>で求めた。AST、ALT、 $\gamma$ -GTP は JSCC 標準化対応法<sup>41)</sup>、FPG はヘキソナーゼUV法<sup>61)</sup>、IRI は化学発光免疫酵素法<sup>62)</sup>で測定した。

#### 4-3-4. 血中 Hcy 濃度、ビタミン濃度、MTHFR 遺伝子多型

研究 1～3 と同様に血漿 Hcy 濃度は HPLC 法<sup>42)</sup>、血清葉酸および V.B12 濃度は電気化学発光免疫法<sup>43)</sup>にて測定し、MTHFR 遺伝子多型は Hinf I を用いた PCR-RFLP 法<sup>44)</sup>で分類した。また、全血中 V.B2 濃度はルミフラビン蛍光法<sup>90)</sup>にて測定した。

#### 4-3-5. 食事調査

食事調査を留置法にて行ない、各採血時に面接によって内容を確認後、回収した。

食事記録は原則として採血前 3 日間の食事を秤量法で記録させ、栄養価計算ソフトウェア(エクセル栄養君 5 訂 Ver3.0、建帛社)を用いてエネルギーおよび栄養素摂取量を算出し、1 日あたりの平均摂取量を求めた。エネルギー代謝に関与する V.B<sub>1</sub>、V.B<sub>2</sub>、については、総エネルギー摂取量 1000kcal あたり、その他の項目については標準体重 1kg あたりの摂取量を解析に用いた。

#### 4-3-6. 統計解析

統計処理は SPSS 12.0J for Windows (IBM 株式会社)を用い、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸および V.B<sub>12</sub> 濃度、全血中 V.B<sub>2</sub> 濃度の相関関係の検討には Pearson の単相関分析を用いた。その際、血漿 Hcy 濃度と血清葉酸濃度は正規分布しなかったため対数変換した値を用いて解析を行った。介入開始時および終了時の群間比較は Mann-Whitney U 検定、同一群内における介入前後の比較は Wilcoxon 符号付順位和検定を用いた。また、介入開始時の体格、生化学検査値の差を補正して前後比較を行なうため、共分散分析を用いた。いずれも、両側検定で  $p < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

#### 4-4. 結果

##### 4-4-1. 対象背景

対象の BMI は全体で  $21.4 \pm 1.4$  であり、葉酸群は葉酸&V.B<sub>2</sub> 群に比べて低かった ( $p < 0.05$ ) が、血圧は 4 群間に差がなかった。喫煙習慣のある者は全体の 21.2% で、各群における喫煙者の割合に差はなかった。MTHFR 遺伝子多型の発現頻度は、CC 型 16 名 (48.5%)、CT 型 12 名 (36.4%)、TT 型 5 名 (15.2%) であり、群間差はみられなかった(表 4-1)。

#### 4-4-2. 葉酸、V.B2 サプリメント投与期間中の試験剤服用率

試験剤の服用率は、全体で  $95.4 \pm 6.6\%$  であり、各群の服用率に差はなかった(表 4-2)。

#### 4-4-3. 介入前後におけるエネルギーおよび栄養素摂取状況

介入開始時における全対象の 1 日あたりのエネルギー摂取量は  $32.2 \pm 6.6$  kcal/kg、脂質エネルギー比率は  $25.6 \pm 6.6\%$ 、V.B2 摂取量は  $0.57 \pm 0.07$  mg/1000kcal、葉酸摂取量は  $4.2 \pm 2.2$   $\mu$ g/kg であった。脂質エネルギー比率が食事摂取基準の上限である 30%を超えていた者が 8 名 (24.2%)いたが、飽和脂肪酸の摂取量が 7%エネルギー以上の者はいなかった。1 日当たりの摂取量が推定平均必要量を下回っていた者は、V.B2 は 23 名 (69.6%)、葉酸は 9 名 (27.3%) であった。

葉酸群、V.B2 群、葉酸&V.B2 群では介入前後でサプリメント投与により葉酸、V.B2 のいずれかまたは両方の摂取量が増加したが、いずれの群においても、食事由来のエネルギーおよび栄養素摂取量は介入前後で変化がなかった(表 4-3)。

#### 4-4-4. 介入前後における血中 Hcy およびビタミン濃度

介入開始時における対象全体の血漿 Hcy 濃度は  $7.2 \pm 3.5$  nmol/mlであり、軽度-中等度高 Hcy 血症は 6 名 (CC 型 4 名、TT 型 2 名)だった。コントロール群は V.B2 群に比べて血漿 Hcy 濃度が低かった ( $p < 0.05$ )。介入によって、葉酸群では血漿 Hcy 濃度が低下した ( $p < 0.05$ ) が、葉酸&V.B2 群では低下傾向 ( $p = 0.086$ ) にとどまった。

介入開始時の血清葉酸濃度は  $12.5 \pm 5.2$  ng/ml、血清 V.B12 濃度は  $640 \pm 355$  pg/ml、全血中 V.B2 濃度は  $14.4 \pm 0.2$   $\mu$ g/dl で群間差はなかった。コントロール群と V.B2 群では介入前後で血中 Hcy、ビタミン濃度が変化しなかったが、葉酸群では開始時に比べて血清葉酸濃度が 2.7 倍、葉酸&V.B2 群では 2.0 倍に上昇した(いずれも  $p$

<0.001)。ただし、終了時における葉酸群と葉酸&V.B2 群の血清葉酸濃度には差がなかった。また、血清 V.B12 濃度、全血中 V.B2 濃度はいずれの群においても介入前後で変化しなかった。

なお、介入開始時の BMI、血漿 Hcy 濃度に群間差が生じたため、各初期値および介入開始時の BMI、Hcy 濃度で補正して血中 Hcy、ビタミン濃度の変化量について群間比較をおこなった。その結果、葉酸群、葉酸&V.B2 群では血清葉酸濃度変化量がコントロール群および V.B2 群に比べて大きくなった。しかし、葉酸群と葉酸&V.B2 群の血清葉酸濃度変化量には差がなく、Hcy 濃度変化量の群間差も認められなかった(表 4-4)。

また、対象全体において血中 Hcy、ビタミン濃度の変化量間の単相関分析を行った結果、log 血漿 Hcy 濃度変化量と log 血清葉酸濃度変化量が逆相関( $p < 0.05$ )、log 血清葉酸濃度変化量と血清 V.B12 濃度変化量が正相関傾向( $p = 0.062$ )を示した。しかし、全血中 V.B2 濃度変化量は血漿 Hcy 濃度および血清葉酸、V.B12 濃度変化量との関連を認めなかった(表 4-5)。

#### 4-4-5. 介入前後の血液生化学検査成績

脂質代謝および肝機能指標はいずれも正常範囲内であり、試験開始時における血液生化学検査成績に群間差はみられなかった。

V.B2 群では、2 週間で TC および LDL-C 濃度が低下した。また、終了時における V.B2 群の TC および TG 濃度は、コントロール群に比べて低値であった(いずれも  $p < 0.05$ )。また、葉酸&V.B2 群では TC( $p = 0.086$ )および LDL-C( $p = 0.092$ )濃度が低下傾向を示した。

介入前後の一般生化学検査成績の変化量について、各初期値および BMI と血漿 Hcy 濃度で補正し、群間比較をおこなった。

ALT の変化量は V.B2 群で  $-1.2 \pm 1.1$  (95% CI :  $-3.4, 1.1$ ) IU/l、葉酸&V.B2 群で  $-1.3 \pm 1.1$  (95% CI :  $-3.5, 1.0$ ) IU/l であり、葉酸群の  $2.2 \pm 1.0$  (95% CI :  $0.02, 4.3$ ) IU/l との間に有意差が認められた(いずれも  $p < 0.05$ )。葉酸&V.B2 群では、 $\gamma$ -GTP の変化量が  $-2.0 \pm 0.9$  IU/l (95% CI :  $-3.6, -0.4$ )と負の値を示し、コントロール群に比べて低下傾向がみられた( $p < 0.07$ )。また、補正後の TC 変化量は V.B2 群とコントロール群の間で有意な差は認められなかった( $p = 0.09$ )。TG 変化量については、群間差がなかった(表 4-6)。

#### 4-5. 考察

対象とした若年男性の血清葉酸濃度は基準値内で低値を示したが、血漿 Hcy 濃度も全体的に低値であった。しかし、開始時において軽度-中等度高 Hcy 血症の者が 6 名おり、これらの対象では、血漿 Hcy 濃度 12 nmol/ml 以下の者に比べて血清葉酸濃度が有意に低かった。6 名中 4 名は遺伝的リスクの低い CC 型であり、遺伝素因に関わらず、若年期から血清葉酸濃度低値に留意すべきであることが示唆された。

これまでに報告されている葉酸サプリメント投与試験は、1 日あたりの葉酸投与量が 5~10mg、期間が 6 週間<sup>91)</sup>や 2 ヶ月間<sup>92)</sup>であった。これに対し、若年成人男性を対象とした今回の試験では、葉酸投与量は  $800 \mu\text{g}/\text{日}$ と少なく、期間が 2 週間と短かったが、MTHFR 遺伝子多型にかかわらず血中葉酸濃度の顕著な上昇が認められた。

V.B2 は、MTHFR の補酵素である FAD の前駆体として 5-MTHF 産生に関与する<sup>1)</sup>。先行研究において、V.B2 が 5-MTHF による Hcy 低下効果を増強する可能性も示唆されている<sup>79, 80)</sup>が、本試験では、V.B2 投与による血清葉酸濃度の上昇、血漿 Hcy 濃度の低下は認められなかった。V.B2 と Hcy の逆相関関係を示唆した先行研究では、血中 V.B2 濃度の低い高齢者<sup>93)</sup>や MTHFR 遺伝子多型の TT 型<sup>94)</sup>を対象としていたが、我々の対象の血中 V.B2 および葉酸濃度は、遺伝素因にかかわらず正常範囲内であ

った。

血漿 Hcy 濃度の高値が結腸ポリープのリスクを上昇させる<sup>95)</sup>ことが明らかとなっているが、ポリープ既往歴のある患者と健常者を対象とした Powers らの葉酸、V.B2 サプリメント投与試験では、ポリープ既往歴がある MTHFR 遺伝子多型の CT および TT 型の対象でのみ葉酸投与による 5-MTHF 濃度上昇が V.B2 で増強されていた<sup>96)</sup>。一方、健常者では V.B2 投与の有無による差がみられなかったことが報告されており、今回の結果は、Powers らの結果を支持するものといえよう。

さらに、本試験と年齢、血清葉酸濃度および葉酸摂取量がほぼ同じオランダ人を対象とした報告<sup>97,98)</sup>に比べ、我々の対象の血漿 Hcy 濃度は低かった。V.B2 を前駆体とする FAD は脂質およびエネルギー代謝においても補酵素として作用する<sup>63)</sup>ことから、動物性タンパク質や脂質に富む欧米型の食事は、血漿 Hcy 濃度高値や血清葉酸濃度低値に影響する可能性が示唆されている<sup>99)</sup>。我々の対象はこれらの報告に比べて脂質摂取量が少なく、血漿 Hcy 濃度も比較的低かったために、V.B2 の影響が得られにくかったのかもしれない。また、V.B2 群では介入終了時に血清脂質濃度が低下していた。V.B2 には肝臓におけるコレステロールや TG の生合成を抑制し、コレステロールの排泄や異化を促進する作用がある<sup>100)</sup>が、本対象では投与した V.B2 が葉酸代謝ではなく脂質代謝に優先的に利用されていたのかもしれない。

今回我々は葉酸として生体利用効率の高い合成型葉酸を用いたが、V.B2 の効果を検討するためには、野菜等の食品由来の葉酸を用いた検討も必要と考えられる。

なお、本試験では、葉酸と V.B2 の同時投与によって、葉酸投与による血清葉酸濃度および血漿 Hcy 濃度変化が減弱された可能性が示唆された。Hcy の再メチル化促進に伴う S-アデノシルメチオニン (SAM) の増加は、MTHFR による 5,10-MTHF から 5-MTHF への転換を制御する<sup>101)</sup>。これにより、DNA の生合成において、dUMP への一炭素単位転移を担う 5,10-MTHF が確保され、血漿 Hcy 濃度の過度な低下が抑制さ

れる。先行研究において、葉酸サプリメント投与による Hcy 濃度低下作用が一定期間でプラトーに達する<sup>102)</sup>と報告されているが、本対象の血漿 Hcy 濃度は開始時から比較的低かったため、血漿 Hcy 濃度の顕著な減少には至らなかったのであろう。また、葉酸は V.B2 と同時に存在するとパラアミノベンゾイルグルタミン酸に分解されやすくなるとの報告もある<sup>103)</sup>。葉酸&V.B2群では、投与した葉酸の一部が吸収される前に分解された可能性も考えられる。

本試験では、葉酸&V.B2 群の Hcy 低下作用は軽度であったが、TC および LDL-C 濃度は低下傾向にあり、動脈硬化予防の観点からは葉酸サプリメント摂取時に V.B2 を同時摂取することの有用性が示唆された。葉酸と V.B2 の相互作用が血漿 Hcy 濃度および血清葉酸濃度変化に及ぼす影響とそのメカニズムについて、今後さらに検討すべきと思われた。



#### 4-6. 要旨

V.B2 による Hcy 改善効果が示唆されていることから、若年男性を対象とし、葉酸と V.B2 サプリメントの単独あるいは複合投与による血中葉酸、Hcy 濃度の影響を検討した。20 代健常男性ボランティア 47 名を無作為に葉酸群、V.B2 群、葉酸&V.B2 群、コントロール群の 4 群にわけ、2 週間の介入試験を実施した。このうち、糖・脂質代謝および肝機能に異常のない 33 名を解析対象とした。

1 日あたりの投与量は、葉酸は 800  $\mu$ g、V.B2 は 8.4 mg とした。介入後、葉酸群で血清葉酸濃度が 2.7 倍、葉酸&V.B2 群で 2.0 倍に上昇し、葉酸サプリメント投与の血清葉酸濃度上昇への即効性が確認されたが、両群の変化量には差がなかった。また、血漿 Hcy 濃度は葉酸群で 7.4 から 6.5nmol/ml に低下した ( $p < 0.05$ ) が、葉酸&V.B2 群では有意な低下にはいたらなかった。葉酸&V.B2 群の Hcy 低下作用は軽度であったが、TC および LDL-C 濃度は低下傾向にあり、動脈硬化予防の観点からは、葉酸サプリメント摂取時に V.B2 を同時摂取することの有用性が示唆された。

4-7. 図表

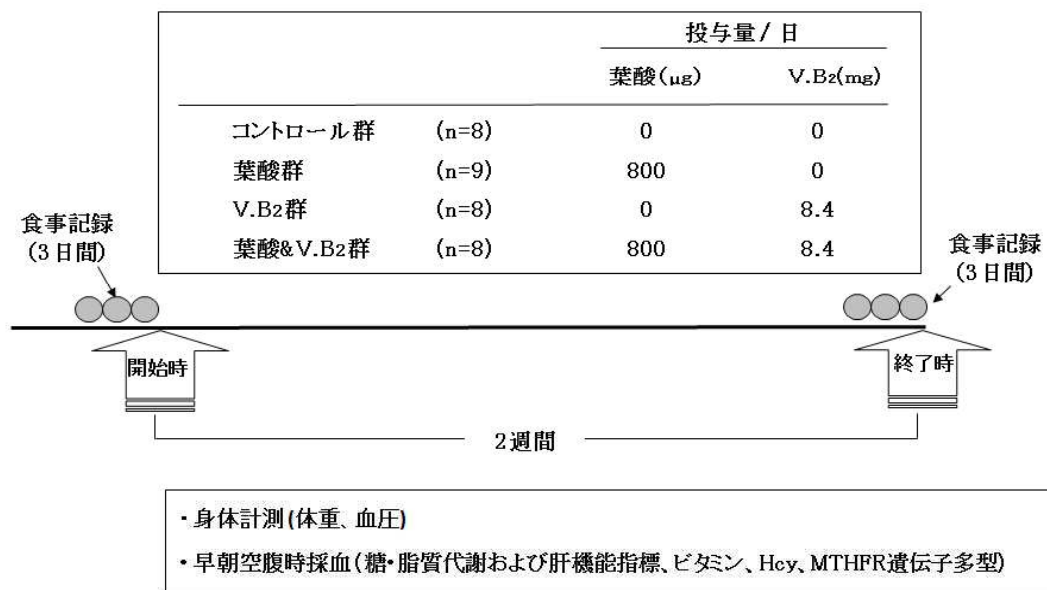


図4-1. 葉酸、V.B2サプリメント投与試験プロトコール

表4-1. 対象背景

	コントロール群	葉酸群	V.B <sub>2</sub> 群	葉酸&V.B <sub>2</sub> 群
人数	8	9	8	8
年齢(歳)	21.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	22.3 ± 1.0	23.0 ± 1.3	23.0 ± 1.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8 ± 1.2	20.8 ± 1.6	21.6 ± 1.9	21.8 ± 0.8
SBP (mmHg)	123 ± 10	117 ± 18	121 ± 7	122 ± 7
DBP (mmHg)	72 ± 8	72 ± 10	78 ± 8	77 ± 6
喫煙者(人)	2	3	2	0
MTHFR 遺伝子多型(人)				
CC型	6	4	3	3
CT型	1	4	4	3
TT型	1	1	1	2

a: Mean ± SD.

BMI=Body Mass Index; SBP=収縮期血圧; DBP=拡張期血圧

表4-2. 試験剤服用率

	n	%
コントロール群	8	96.1 ± 3.3 <sup>a</sup>
葉酸群	9	96.3 ± 4.5
V.B <sub>2</sub> 群	8	94.6 ± 7.4
葉酸&V.B <sub>2</sub> 群	8	94.6 ± 10.5

a: Mean ± SD.

表4-3. 介入前後における1日あたりのエネルギーおよび栄養素摂取量

		コントロール群 (n=8)	葉酸群 (n=9)	V.B2群 (n=8)	葉酸&V.B2群 (n=8)
総エネルギー(kcal/kg <sup>a</sup> )	開始時	33.4 ± 7.9 <sup>a</sup>	31.3 ± 5.3	33.4 ± 8.6	34.9 ± 5.1
	終了時	32.1 ± 6.0	34.7 ± 9.0	32.8 ± 10.1	34.0 ± 6.2
脂質エネルギー比率(%)	開始時	25.6 ± 6.7	27.7 ± 6.7	26.8 ± 6.7	21.8 ± 5.6
	終了時	25.7 ± 6.8	28.1 ± 4.4	25.7 ± 6.6	25.6 ± 7.3
炭水化物エネルギー比率(%)	開始時	54.8 ± 7.6	54.4 ± 5.5	55.0 ± 9.1	59.1 ± 7.4
	終了時	77.5 ± 55.9	55.1 ± 6.5	57.2 ± 9.6	58.0 ± 7.1
タンパク質エネルギー比率(%)	開始時	13.1 ± 0.8	14.1 ± 1.4	13.4 ± 2.9	14.3 ± 1.6
	終了時	13.5 ± 1.3	13.1 ± 1.8	12.9 ± 2.6	14.9 ± 3.4
メチオニン(mg/kg)	開始時	22.9 ± 5.4	23.8 ± 4.2	23.2 ± 11.4	25.2 ± 5.6
	終了時	21.6 ± 5.2	23.9 ± 6.8	21.9 ± 9.6	26.9 ± 8.3
V.B1(mg/1000kcal)	開始時	0.392 ± 0.079	0.459 ± 0.104	0.441 ± 0.141	0.430 ± 0.081
	終了時	0.454 ± 0.205	0.412 ± 0.182	0.406 ± 0.134	0.400 ± 0.117
V.B2(mg/1000kcal)	開始時	0.555 ± 0.098	0.577 ± 0.086	0.567 ± 0.206	0.561 ± 0.112
	終了時	0.584 ± 0.124	0.625 ± 0.208	4.588 ± 1.703 <sup>c,e</sup>	4.671 ± 0.854 <sup>c,e</sup>
V.B6(mg/kg)	開始時	0.017 ± 0.006	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.009	0.018 ± 0.005
	終了時	0.018 ± 0.006	0.018 ± 0.005	0.017 ± 0.007	0.020 ± 0.006
V.B12(μg/kg)	開始時	0.06 ± 0.03	0.10 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.15 ± 0.08
	終了時	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.17 ± 0.11
葉酸(μg/kg)	開始時	3.4 ± 1.2	4.1 ± 1.3	4.7 ± 2.7	4.3 ± 1.5
	終了時	3.9 ± 1.0	17.0 ± 2.0 <sup>c,d</sup>	3.8 ± 1.6	17.3 ± 2.0 <sup>c,d</sup>

a: Mean ± SD.

b: Wilcoxonの符号付順位和検定に基づくp<0.05 vs 開始時

c: Mann-Whitney's U 検定に基づくp<0.05 vs コントロール群

d: Mann-Whitney's U 検定に基づくp<0.05 vs V.B2

e: Mann-Whitney's U 検定に基づくp<0.05 vs 葉酸群

表4-4. 介入前後における血中ビタミンおよびHcy濃度

	コントロール群 (n=8)	葉酸群 (n=9)	V. B2群 (n=8)	葉酸&V. B2群 (n=8)
葉酸(ng/ml)				
開始時	5.8 ± 2.3 <sup>a</sup>	4.7 ± 1.5	5.2 ± 1.6	6.3 ± 3.5
終了時	5.7 ± 1.4	12.8 ± 1.9 <sup>c</sup>	5.0 ± 1.9	12.2 ± 4.0 <sup>c</sup>
△ <sup>b</sup>	-0.3 ± 0.7	8.0 ± 0.7 <sup>d,e</sup>	0.1 ± 0.8	6.3 ± 0.7 <sup>d,e</sup>
V.B2 (μg/dl)				
開始時	0.38 ± 0.05	0.36 ± 0.06	0.36 ± 0.05	0.42 ± 0.08
終了時	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.08	0.40 ± 0.06	0.41 ± 0.10
△	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.02
V.B12 (pg/ml)				
開始時	539 ± 262	476 ± 310	415 ± 180	387 ± 197
終了時	444 ± 154	452 ± 283	332 ± 278	324 ± 171
△	-92 ± 62	-15 ± 58	-30 ± 65	-39 ± 61
Hcy (nmol/ml)				
開始時	5.7 ± 3.0	7.4 ± 3.0	8.5 ± 4.1 <sup>f</sup>	7.4 ± 4.0
終了時	5.9 ± 2.6	6.5 ± 2.9 <sup>c</sup>	8.0 ± 2.6	7.0 ± 3.5
△	0.0 ± 0.4	-0.9 ± 0.4	0.1 ± 0.5	-0.4 ± 0.4

a: Mean ± SD.

b: 各初期値および開始時のBMIと血漿Hcy濃度で補正した介入前後の変化量

c: Wilcoxonの符号付順位和検定に基づくp<0.05 vs 開始時

d: 各初期値および開始時のBMIと血漿Hcy濃度を共変量とした共分散分析に基づくp<0.05 vs コントロール群

e: 各初期値および開始時のBMIと血漿Hcy濃度を共変量とした共分散分析に基づくp<0.05 vs V.B2群

f: Mann-Whitney's U 検定に基づくp<0.05 vs コントロール群

表4-5. 介入前後の血中ビタミンおよびHcy濃度変化量間の単相関

	n=33					
	$\Delta\log$ 葉酸 (ng/ml)		$\Delta V. B_2$ ( $\mu$ g/dl)		$\Delta V. B_{12}$ (ng/ml)	
	r	p	r	p	r	p
$\Delta V. B_2$ ( $\mu$ g/dl)	-0.081	0.653				
$\Delta V. B_{12}$ (pg/ml)	0.328	0.062	-0.015	0.936		
$\Delta\log Hcy$ (nmol/ml)	-0.355	0.043	-0.020	0.912	0.261	0.143

r: Pearsonの積率相関係数

p: Pearsonの単相関分析に基づく有意確率

表4-6. 介入前後における血液生化学検査成績

	コントロール群 (n=8)	葉酸群 (n=9)	V. B2群 (n=8)	葉酸&V. B2群 (n=8)
FPG (mg/dl)				
開始時	95.0 ± 4.0 <sup>a</sup>	94.0 ± 3.0	95.0 ± 8.0	99.0 ± 8.0
終了時	94.0 ± 7.0	95.0 ± 7.0	95.0 ± 6.0	96.0 ± 8.0
△ <sup>b</sup>	-1.6 ± 2.4	0.9 ± 2.2	0.0 ± 2.5	-2.4 ± 2.4
TG (mg/dl)				
開始時	58.5 ± 29.8	56.7 ± 20.0	40.1 ± 9.5	58.2 ± 23.5
終了時	69.1 ± 37.2	62.0 ± 28.3	48.7 ± 13.3	54.9 ± 25.7
△	12.1 ± 7.8	5.5 ± 7.3	-2.2 ± 8.7	-4.0 ± 7.6
TC (mg/dl)				
開始時	171.9 ± 6.5	163.7 ± 27.1	168.7 ± 13.0	166.1 ± 25.9
終了時	174.0 ± 11.6	170.1 ± 25.1	160.5 ± 10.8 <sup>d</sup>	157.8 ± 20.5
△	2.6 ± 5.5	0.0 ± 5.0	-9.6 ± 5.7	-7.0 ± 5.3
LDL-C (mg/dl)				
開始時	105.7 ± 8.7	91.0 ± 27.5	97.2 ± 11.4	92.9 ± 21.9
終了時	100.5 ± 9.7	95.9 ± 26.3	88.2 ± 8.9 <sup>d</sup>	87.0 ± 15.5
△	-1.7 ± 5.2	-2.5 ± 4.8	-11.1 ± 5.3	-6.2 ± 5.0
HDL-C (mg/dl)				
開始時	54.6 ± 3.9	61.4 ± 12.8	63.7 ± 4.6	61.6 ± 13.8
終了時	58.8 ± 5.8	62.6 ± 11.6	61.9 ± 4.6	61.9 ± 12.4
△	3.6 ± 2.0	1.7 ± 1.8	-0.1 ± 2.1	-0.3 ± 1.9
AST (IU/l)				
開始時	17.8 ± 4.0	18.2 ± 3.1	17.3 ± 4.7	16.9 ± 2.9
終了時	19.0 ± 4.2	19.1 ± 4.1	17.1 ± 4.6	16.9 ± 3.0
△	1.2 ± 1.1	1.3 ± 1.0	-0.9 ± 1.2	-0.3 ± 1.1
ALT (IU/l)				
開始時	14.1 ± 4.1	15.4 ± 6.8	14.9 ± 7.7	16.3 ± 8.8
終了時	15.7 ± 3.0	17.0 ± 8.0	13.7 ± 6.2	14.9 ± 5.5
△	0.9 ± 1.1	2.2 ± 1.1	-1.3 ± 1.2 <sup>c</sup>	-1.3 ± 1.1 <sup>c</sup>
γ-GTP (IU/l)				
開始時	20.4 ± 2.2	21.0 ± 7.8	19.3 ± 4.1	17.6 ± 5.3
終了時	21.0 ± 3.9	20.1 ± 5.3	18.4 ± 6.0	16.0 ± 4.2
△	0.1 ± 0.8	-0.5 ± 0.7	-0.6 ± 0.8	-2.0 ± 0.8

a: Mean ± SD.

b: 各初期値および開始時のBMIと血漿Hcy濃度で補正した介入前後の変化量

c: 各初期値および開始時のBMIと血漿Hcy濃度を共変量とした共分散分析に基づくp&lt;0.05 vs 葉酸群

d: Wilcoxonの符号付順位検定に基づくp&lt;0.05 vs 開始時

FPG=空腹時血糖値; TG=トリグリセライド; TC=総コレステロール; LDL-C=LDL-コレステロール; HDL-C=HDL-コレステロール  
 AST=アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALT=アラニンアミノトランスフェラーゼ; γ-GTP=γ-グルタミルトランスベプチダーゼ

## 第2章 葉酸とビタミンB<sub>2</sub>の相互作用がホモシステイン代謝に及ぼす影響に関する 検討

### [研究 5] ラット肝細胞培養上清中ホモシステイン濃度と葉酸濃度に及ぼす 5-メチル テトラヒドロ葉酸またはテトラヒドロ葉酸とビタミン B<sub>2</sub>、メチオニンの影響

#### 5-1. 緒言

食事由来の葉酸は、FAD を補酵素とする MTHFR を介して 5-MTHF となり、Hcy をメチオニンに変換して THF に再転換される<sup>1)</sup>。

これまでに、*in vitro* における実験<sup>79, 104)</sup>や MTHFR 遺伝子多型 TT 型を対象とした介入試験<sup>94)</sup>において、FAD の前駆体である V.B<sub>2</sub> の Hcy 低下効果が報告されており、V.B<sub>2</sub> との組み合わせにより 5-MTHF の Hcy 低下効果が強まることが期待される。しかし、研究 4 に示したように、我々が 20 代健常男性を対象として実施した 2 週間のサプリメント投与試験では、葉酸投与による血清葉酸濃度の上昇は V.B<sub>2</sub> との同時投与で増強されず、Hcy 濃度は葉酸単独投与群でのみ低下し、予測に反した結果となった。これまでに V.B<sub>2</sub> の Hcy 低下効果を認めた検討では、血漿 Hcy 濃度高値者<sup>94)</sup>や V.B<sub>2</sub> 濃度低値者<sup>93)</sup>を対象としていたのに対し、我々の対象は健常で血漿 Hcy 濃度が比較的低く、血中葉酸および V.B<sub>2</sub> 濃度も比較的高かったため、V.B<sub>2</sub> 投与の効果が得られにくかったのかもしれない。

また、葉酸と V.B<sub>2</sub> の同時摂取が葉酸、Hcy 代謝に及ぼす影響については、サプリメント型の 5-MTHF だけでなく、食品由来型の THF を用いた検討も必要と考えられるが、THF と V.B<sub>2</sub> の相互作用に着目した検討は報告されていない。

そこで、Hcy の前駆体であるメチオニンの低濃度および高濃度条件下において、5-MTHF または THF と V.B<sub>2</sub> の相互作用が Hcy 濃度と葉酸濃度変化に及ぼす影響が異なるかどうかについて、ラット肝細胞を用いて実験的に検証することを目的とした。



## 5-2. 培養条件設定

### 5-2-1. 培地の選択

これまでに肝細胞にメチオニンを添加して Hcy 濃度変化を検討した報告では、イーグル最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium: EMEM)<sup>105)</sup> や Krebs-Henseleit 培地<sup>106)</sup> が使用されていた。今回は肝細胞としてプライマリーセル株式会社の肝細胞培養キット P-4(ラット)を用い、葉酸と V.B2 の低濃度および高濃度条件を設定して検討するために、既報よりもさらにこれらの含量が少ない 199 培地 (Medium-199) (表 5-1)を用いることとした。

なお、これまでに Medium-199 を用いて肝細胞における Hcy、葉酸濃度変化を検討した報告がなかったことから、各因子の添加量と培養時間を設定するため以下の予備実験を行なった。

### 5-2-2. 各因子添加量および培養時間の検討

肝細胞にメチオニンを添加し、Hcy 濃度変化を検討した先行研究<sup>105)</sup>では、培地として EMEM が使用され、この培地中には葉酸が  $2\mu\text{M}$ 、V.B2 が  $2.64\mu\text{M}$  が含まれている。また、ヒト静脈内皮細胞への  $10\sim 300\text{nM}$  の葉酸添加が Hcy 産生量に及ぼす影響を検討した実験において、Hcy 産生量が葉酸添加量依存的に減少したことが報告されている<sup>106)</sup>。そこで、以下に示す予備実験を行ない、各因子添加量および培養時間を検討した。

まず、メチオニンおよび葉酸添加量を決定するための実験を行なった。ラット肝細胞を Medium-199 (含 葉酸  $20\text{nM}$ 、V.B2  $26.4\text{nM}$ 、メチオニン  $0.1\text{mM}$ ) に 10% ウシ胎児血清、 $1.5\mu\text{M}$  シアノコバラミンを添加した基本培地で 24 時間前培養した後、基本培地および基本培地にメチオニンと 5-MTHF のいずれかまたは両方を添加した培地に交換し、48 時間後まで培養した。メチオニンの添加量は 1 または  $5\text{mM}$ 、5-MTHF の添加

量は 0.02, 0.2, 2  $\mu$  M のいずれかとした。0, 2, 12, 24, 48 時間後に培養上清を回収し、上清中 Hcy 濃度を測定した。

メチオニン無添加条件下では、5-MTHF 添加濃度にかかわらず、上清中 Hcy 濃度は培養開始時からほとんど変化がみられなかった(図 5-1(A))。メチオニン 1mM を添加した条件では、上清中 Hcy 濃度が 48 時間後まで継続的に増加し、5-MTHF 無添加時の上清中 Hcy 濃度は 5-MTHF 添加時に比べて高くなった(図 5-1(B))。メチオニン 5mM を添加した条件では、メチオニン 1mM 添加条件下よりもさらに上清中 Hcy 濃度が高くなり、5-MTHF 無添加時の 24, 48 時間後の上清中 Hcy 濃度は、それぞれメチオニン 1mM 添加条件下の約 2 倍、1.5 倍と著しく高くなった。また、5-MTHF 無添加および 0.02  $\mu$  M 添加時に比べて 5-MTHF 0.2  $\mu$  M および 2  $\mu$  M 添加時の上清中 Hcy 濃度は低く、5-MTHF 2  $\mu$  M 添加で最も低かった(図 5-1(C))。これらの結果から、Medium-199 を用い、低メチオニンおよび高メチオニン条件下における葉酸添加が Hcy 濃度に及ぼす影響を検討するうえで、メチオニン添加量 5mM、葉酸添加量 2  $\mu$  M とし、24, 48 時間後の変化を観察することが望ましいと考えられた。

次に、V.B2 添加量を設定するための検討を実施した。上記に示したメチオニンおよび葉酸添加量を設定するための検討において、葉酸添加量を EMEM 中含量と同量の 2  $\mu$  M とした際に上清中 Hcy 濃度が低く維持されていたことから、V.B2 添加量についても EMEM 中含量にあわせた 2.64  $\mu$  M として実験を行なった。すなわち、ラット肝細胞を Medium-199 に 10% ウシ胎児血清、1.5  $\mu$  M シアノコバラミンを添加した基本培地で 24 時間前培養した後、メチオニン無添加または 5 mM を添加した基本培地に 5-MTHF と V.B2 のいずれかまたは両方を添加した培地に交換し、48 時間後まで培養した。0, 24, 48 時間後に培養上清を回収し、上清中 Hcy 濃度を測定した。

メチオニン無添加条件下では、上清中 Hcy 濃度はほとんど変化せず、5-MTHF 無添加時および 5-MTHF 2  $\mu$  M 添加時とも V.B2 添加有無による差はみられなかった(図

5-2(A))。一方、メチオニンと 5-MTHF を添加した条件では、V.B2 無添加時における 24, 48 時間後の上清中 Hcy濃度は V.B2 添加時に比べて約 10 倍高かった(図 5-2(B))。

これらの予備実験の結果をもとに、メチオニン、5-MTHF、V.B2 の添加量をそれぞれ 5mM、 $2\mu\text{M}$ 、 $2.64\mu\text{M}$  に設定した。また、葉酸の種類による違いを検討するため、THF については 5-MTHF と同量に設定した。

### 5-3. 本実験

#### 5-3-1.方法

##### [1] 培養条件

今回の実験では、ラット肝細胞として、SD ラットの肝実質細胞を  $2 \times 10^5$  cell/well の細胞密度で 24well プレートに播種した肝細胞培養キット P-4 (プライマリーセル株式会社)を用いて実験を行なった。細胞到着後、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:DMEM)を加えて5%CO<sub>2</sub> 存在下、37℃で2時間培養し、プレートに細胞を接着させた。その後、Medium-199 に Christensen ら<sup>105)</sup>の方法を参考に10%ウシ胎児血清、 $1.5\mu\text{M}$  シアノコバラミンを添加した基本培地に交換して 24 時間前培養を行なった。その後、前述の基本培地に V.B2 を無添加または  $2.64\mu\text{M}$  添加した培地に(1)メチオニンも葉酸も無添加、(2)葉酸 [(A):5-MTHF、(B):THF]を無添加または  $2\mu\text{M}$  添加、(3)メチオニン 5mM 添加かつ葉酸 [(A):5-MTHF、(B):THF]を無添加または  $2\mu\text{M}$  添加とした条件で培養した。培養開始 0, 24, 48 時間後に培養上清を回収し、葉酸および Hcy 濃度の測定まで-80℃で保存した。

##### [2] 培養上清中葉酸濃度

凍結乾燥後、5 倍濃縮した培養上清を試料とし、葉酸濃度を HPLC 法<sup>107)</sup>で測定し

た。葉酸と V.B2 の相互作用が葉酸および Hcy 代謝に及ぼす影響を検討するにあたり、葉酸誘導体のうち、添加因子とした THF および 5-MTHF の他に、THF の代謝産物であり、MTHFR の基質となる 5,10-メチレン THF を測定したいと考えた。しかし、5,10-メチレン THF は非常に不安定で測定が困難とされている<sup>108)</sup>ことから、今回は 5,10-メチレン THF ではなく、その前駆体の 5,10-メテニル THF を測定項目とした。これらの分析には JASCO HPLC system を用い、カラム温度 40℃、流速 1ml/分、検出波長 280 nm、カラムは COSMOSIL (R) 5PE-MS Packed Column (4.6 mm I.D.×150 mm)、移動相は 50mM リン酸二水素カリウム溶液(含 0.1mM エチレンジアミン四酢酸, 5%メタノール、pH3.5)で分析した。なお、試料の調製は窒素を充填したグローブバッグ内にて遮光条件下で行なった。

### [3] 培養上清中 Hcy 濃度

培養上清中 Hcy 濃度は、研究 1～4 と同様の条件で HPLC 法<sup>42)</sup>により測定した。

### [4] 統計解析

データは Mean±SD で示した。培養条件ごとの上清中 Hcy 濃度や 5-MTHF および THF、5,10-メテニル THF 濃度の比較には Student's *t* 検定を用い、 $p < 0.05$  を統計的有意水準とした。解析には SPSS Ver 12.0 for windows を用いた。

## 5-3-2. 結果

### [1] 培養上清中 Hcy および葉酸濃度に及ぼす V.B2 の影響

上清中 Hcy および 5-MTHF、THF 濃度は V.B2 添加有無にかかわらず変化しなかった。5,10-メテニル THF 濃度は V.B2 無添加条件下で 0 時間に比べて 24, 48 時間後に高い傾向にあったが、V.B2 添加条件下では変化しなかった(図 5-3)。

**[2] 低メチオニン条件下における V.B2 と 5-MTHF または THF の相互作用が  
培養上清中 Hcy および葉酸濃度に及ぼす影響**

メチオニン無添加かつ葉酸添加条件下では、V.B2 添加有無および添加した葉酸の種類にかかわらず、培養開始から終了まで上清中 Hcy 濃度が低いままであった(図 5-4(A),(B))。

葉酸として 5-MTHF を添加した場合には、V.B2 添加有無にかかわらず上清中 5-MTHF 濃度は 48 時間後にはほぼ枯渇状態となった。上清中 5,10-メテニル THF 濃度は 24 時間後に上昇後、V.B2 無添加時は 48 時間後にかけて低下したのに対し、V.B2 添加時は 24 時間後と同程度に維持され、48 時間後の上清中 5,10-メテニル THF 濃度は V.B2 無添加時に比べて高値を示した( $p < 0.05$ ) (図 5-4(A))。

葉酸として THF を添加した場合には、上清中 5-MTHF 濃度は極めて低値のまま変化しなかった。上清中 THF 濃度は、V.B2 添加有無にかかわらず 24 時間で培養開始時の約 1/3 となり、48 時間後までその濃度が維持された。また、V.B2 添加時は V.B2 無添加時に比べて 24, 48 時間後の上清中 5,10-メテニル THF 濃度が低値であった(いずれも  $p < 0.05$ ) (図 5-4(B))。

**[3] 高メチオニン条件下における V.B2 と 5-MTHF または THF の相互作用が  
培養上清中 Hcy、葉酸濃度に及ぼす影響**

メチオニン添加条件下で葉酸として 5-MTHF を添加した場合、V.B2 無添加時は上清中 Hcy 濃度が著しく高くなったが、V.B2 添加時は上清中 Hcy 濃度が低いままで、48 時間後の上清中 Hcy 濃度は V.B2 無添加時に比べて低値であった( $p < 0.05$ )。上清中 5-MTHF 濃度は 24 時間で培養開始時の約半分となり、V.B2 無添加時は 48 時間後にさらに低くなった。これに対し、V.B2 添加時は、24 時間後以降の上清中 5-MTHF 濃度がほとんど変化せず、48 時間後の上清中 5-MTHF 濃度は V.B2 無添加時に比べて高値であった( $p < 0.05$ )。上清中 THF 濃度は V.B2 無添加時では 24 時間

後に増加したが、V.B2 添加時には THF 濃度がほとんど変化せず、24 時間後の上清中 THF 濃度は V.B2 無添加時に比べて低値であった。5,10-メテニル THF 濃度は V.B2 添加有無にかかわらず変化しなかった(図 5-5(A))。

葉酸として THF を添加した場合、上清中 Hcy 濃度は著しく高くなった。上清中 5-MTHF 濃度は極めて低いまま変化しなかった。上清中 THF 濃度は 24 時間で開始時の 1/3 程度となり、48 時間後までその濃度が維持された。5,10-メテニル THF 濃度は培養開始から 48 時間後にかけて高くなった。なお、上清中 Hcy、5-MTHF、THF、5,10-メテニル THF 濃度変化に V.B2 添加有無による差はみられなかった(図 5-5(B))。

### 5-3-3. 考察

V.B2が葉酸のHcy低下効果を増強する可能性が期待されることから、今回の実験では、THFまたは5-MTHFとV.B2の相互作用がHcyおよび葉酸濃度に及ぼす影響を検討した。我々の知る限り、ラット肝細胞を用い、V.B2単独およびV.B2と5-MTHFまたはTHFを組み合わせて添加した際の上清中Hcy、葉酸濃度変化を検討した報告はこれまでにない。また、ラット肝細胞へのメチオニン添加が上清中Hcy濃度変化に及ぼす影響を検討した報告では、培地としてMEME<sup>105)</sup>やKrebs-Henseleit培地<sup>106)</sup>が使用されているが、Medium-199を用いた今回の検討においても、メチオニン添加によって上清中Hcy濃度が高値となることが確認された。

メチオニン添加条件下の5-MTHF添加では上清中Hcy濃度が高くなったが、V.B2との同時添加によって上清中Hcy濃度は著しく低値となり、V.B2が5-MTHFによるHcyの再メチル化を促進したと推察された。なお、メチオニン無添加条件下ではHcy濃度がほとんど変化していなかったことから、今回の5-MTHF添加量では、メチオニン5mM添加によって産生されたHcyを再度メチオニンへと変換するには不十分であった可能性

も考えられた。ただし、このような5-MTHF添加量であっても、V.B<sub>2</sub>と同時に添加することでHcy濃度を低く維持し得ることが確認された。5-MTHFによってHcyの再メチル化が亢進すると、MTHFRに対してアロステリック阻害作用のあるSAMが増加し、Hcy濃度の過度な低下が抑制されることが報告されている<sup>101)</sup>が、V.B<sub>2</sub>存在下では補酵素の供給によりMTHFR活性が維持される可能性が考えられる。すなわち、V.B<sub>2</sub>添加時は、添加した5-MTHFがHcyの再メチル化を経てTHFに代謝された後に5-MTHFに再転換されたため、持続的にHcy濃度の低値を維持できたものと推察された。

先行研究において、Hcy濃度の上昇が結腸ポリープのリスクを上昇させること<sup>95)</sup>、MTHFR遺伝子多型のTT型ではMTHFR活性が体内V.B<sub>2</sub>レベルの影響を受けやすいこと<sup>109)</sup>が報告されている。また、ポリープ既往歴のある患者と健常者を対象としたPowersらの葉酸、V.B<sub>2</sub>サプリメント投与試験では、ポリープ既往歴があるMTHFR遺伝子多型のCTおよびTT型の対象でのみ、葉酸投与による5-MTHF濃度上昇がV.B<sub>2</sub>で増強されたことが報告されている<sup>96)</sup>。これらのことから、V.B<sub>2</sub>の効果は高Hcy濃度条件下で得られやすい可能性が考えられる。メチオニン添加条件下において、5-MTHFとV.B<sub>2</sub>を組み合わせることでHcy濃度が著しく低値となり、添加した5-MTHFが枯渇せずに保持された今回の結果は、Powersらの結果を支持するものといえよう。

一方、メチオニン添加条件下で葉酸としてTHFを用いた場合には、上清中の各種葉酸およびHcy濃度変化にV.B<sub>2</sub>添加有無による差は認められなかった。上清中Hcy濃度は、メチオニン添加かつV.B<sub>2</sub>無添加条件下で5-MTHFを添加した場合とほぼ同程度に高かった。培養中、添加したTHFは枯渇することなく維持され、5,10-メテニルTHF濃度は高く、5-MTHF濃度は極めて低値のまま変化しなかった。上清中Hcy濃度が5-MTHF添加時とほぼ同程度にとどまっていたことから、添加したTHFから産生された5-MTHFがHcyの再メチル化に利用され、再度THFに代謝されたものと考えられた。THF添加時はHcyの再メチル化に必要な5-MTHFの産生にV.B<sub>2</sub>が利用され、

5-MTHF添加時よりもV.B<sub>2</sub>消費量が多くなるため、V.B<sub>2</sub>添加有無による上清中Hcy濃度の差が得られにくかったのかもしれない。この点について検証するため、培養上清中V.B<sub>2</sub>濃度も測定すべきであったと考えられる。また、メチオニン添加によって生じたHcyを十分に再メチル化し得るTHFおよびV.B<sub>2</sub>濃度について、今後さらに検討すべきと思われた。

THFの代謝経路として、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの作用により5,10-メチレンTHFに代謝される経路と、10-ホルミルTHF、5,10-メテニルTHFを経て5,10-メチレンTHFに代謝される経路の2つがある。これらの反応は可逆的であり、10-ホルミルTHFは5-アミノ-4-イミダゾール-カルボキシアミドリボヌクレオチドにホルミル基を供与して5-ホルムアミドイミダゾール-4-カルボキシアミドリボヌクレオチドTHF (FAICAR)を生成する際、THFに変換される。FAICARはその後イノシンーリン酸となり、核酸およびピリミジン代謝に関与する<sup>87)</sup>。5,10-メチレンTHFはMTHFRのみならずチミジル酸合成酵素の基質として作用し、可逆的にTHFに代謝される。さらにFADはMTHFRだけでなくチミジル酸合成酵素の補酵素でもある<sup>110)</sup>。

THF添加時は、メチオニン添加有無にかかわらず添加したTHFが枯渇せずに維持され、5,10-メテニルTHF濃度は高くなった。5-MTHFが欠乏した状態では、Hcy濃度にかかわらず、THFは核酸代謝に必要な葉酸の保持に働く可能性が考えられた。培地に何も加えない条件において5,10-メテニルTHFが高値傾向にあったことも、これを裏付ける結果だったと考えられる。

これに対し、5-MTHF添加時は、メチオニンの有無に関わらずTHFおよび5,10-メテニルTHF濃度が高くなり、5,10-メテニルTHF濃度はTHF添加時の約半分程度にとどまった。5-MTHFから産生されたTHFが10-ホルミルTHFや5,10-メチレンTHF、ジヒドロ葉酸等のかたちで保持または核酸合成に使われた可能性も考えられるが、今回はこれらについて検証することはできなかった。



また、5,10-メテニルTHF濃度は、メチオニン無添加条件下で葉酸としてTHFを用いた場合にはV.B<sub>2</sub>添加で低くなったが、葉酸として5-MTHFを用いた場合にはV.B<sub>2</sub>添加で高くなった。5,10-メテニルTHF濃度に及ぼすV.B<sub>2</sub>の影響は、同時に存在する葉酸の種類によって異なる可能性が考えられた。

本研究の限界として、まず、各因子の添加量を一濃度しか設定しておらず、濃度依存性や相対量による影響を明らかにできなかったことがあげられる。また、今回は上清中のHcyおよび5-MTHF、THF、5,10-メテニルTHF濃度しか測定できなかったが、得られた結果のメカニズムについて検討するためには、これらの細胞内濃度やV.B<sub>2</sub>、SAMのほか、10-ホルミルTHFや5,10-メチレンTHF濃度、葉酸およびHcy代謝、核酸代謝に関連する酵素の遺伝子発現量についても測定すべきであったと考えられる。

このように、検討すべき課題は残っているものの、本研究において以下の可能性が考えられた。

- ・メチオニン添加条件下で葉酸として5-MTHFを用いた場合、V.B<sub>2</sub>との組み合わせによってHcyの再メチル化反応が促進される。ただし、葉酸としてTHFを用いた場合にはこの効果は得られない
- ・THFは流動的に5,10-メテニルTHFとなり、核酸代謝に利用される
- ・5,10-メテニルTHF濃度に及ぼすV.B<sub>2</sub>の影響は5-MTHFとTHFで異なる

ただし、今回はあくまでラット肝細胞を用いた検討にすぎず、ヒトの高 Hcy 血症の治療法として展開するためには、*in vivo*での検証も行なう必要があると考えられる。また、今回の実験条件では、THF の Hcy 低下効果に及ぼす V.B<sub>2</sub> の影響を十分に検討することができなかった。健康のためには適量の葉酸を摂取する必要があるが、サプリメントによる過度の葉酸摂取は癌のリスクを上昇させる可能性が示唆されており<sup>87)</sup>、低用量のサプリメント型葉酸や食品由来型葉酸を用いた安全かつ効率の良い高 Hcy 血症改善法の開発が望まれる。

また、卵黄中には 5-MTHF、魚には THF が多い等、食品によって含有量の多い葉酸誘導体の種類が異なる<sup>111)</sup>との報告もあることから、食品由来の葉酸が Hcy 代謝に及ぼす影響について、V.B2 との相互作用や核酸代謝への影響も含めて今後さらに検討すべきと思われた。

#### 5-3-4. 要旨

V.B<sub>2</sub>が葉酸によるHcy低下効果を強める可能性が示唆されている。この効果は葉酸の型によっても異なると考えられることから、メチオニン無添加または添加条件下におけるV.B<sub>2</sub>とサプリメント型の5-MTHFまたは食品由来型のTHFの相互作用がHcyおよび各種葉酸濃度に及ぼす影響を検討した。V.B<sub>2</sub>無添加または2.64  $\mu$  Mを添加したMedium-199に(1)メチオニン、葉酸とも無添加、(2)葉酸[(A):5-MTHF、(B):THF]無添加または2  $\mu$  M添加、(3)メチオニン5mMと葉酸[(A):5-MTHF、(B):THF]無添加または2  $\mu$  M添加としてラット肝細胞を48時間培養した。0, 24, 48時間後に培養上清を回収し、Hcyおよび葉酸濃度測定に用いた。メチオニン添加条件下の5-MTHF添加ではHcy濃度が増加したが、V.B<sub>2</sub>との同時添加によってHcy濃度は著しく低値となり、V.B<sub>2</sub>が5-MTHFによるHcyの再メチル化を促進したと推察された。一方、THF添加ではV.B<sub>2</sub>添加によるHcy濃度低下作用は認められず、核酸代謝に必要な5,10-メテニルTHF濃度が維持され、THFが核酸代謝の保持に優先的に働いた可能性が考えられた。THFがHcy代謝に及ぼす影響について、V.B<sub>2</sub>との相互作用や核酸代謝への影響も含めてさらに検討すべきと思われた。

### 5-3-5. 図表

表5-1. Medium-199 組成

Component	( $\mu\text{g/L}$ )
<b>Amino acid</b>	
L-Alanine	25
L-Arginine•HCl	70
L-Aspartic acid	30
L-Cysteine•HCl•monohydrate	0.1
L-Cysteine•2HCl	26
L-Glutamic acid	75
L-Glutamine	100
Glycine	50
L-Histidine•HCl•monohydrate	22
L-Isoleucine	40
L-Leucine	60
L-lysine•HCl	70
L-Methionine	15
L-Phenylalanine	25
L-Proline	40
L-Serine	25
L-Threonine	30
L-Tyrosine•2Na•dihydrate	58
L-Valine	25
L-Ascorbic acid•Na	0.05
<b>Vitamins</b>	
Biotin	0.01
Choline chloride	0.05
Folic acid	0.01
Myo-Inositol	0.05
Niacinamide	0.025
D-Pantothenic acid	0.01
Pyridoxal•HCl	0.01
Riboflavin	0.01
Thiamin•HCl	0.01

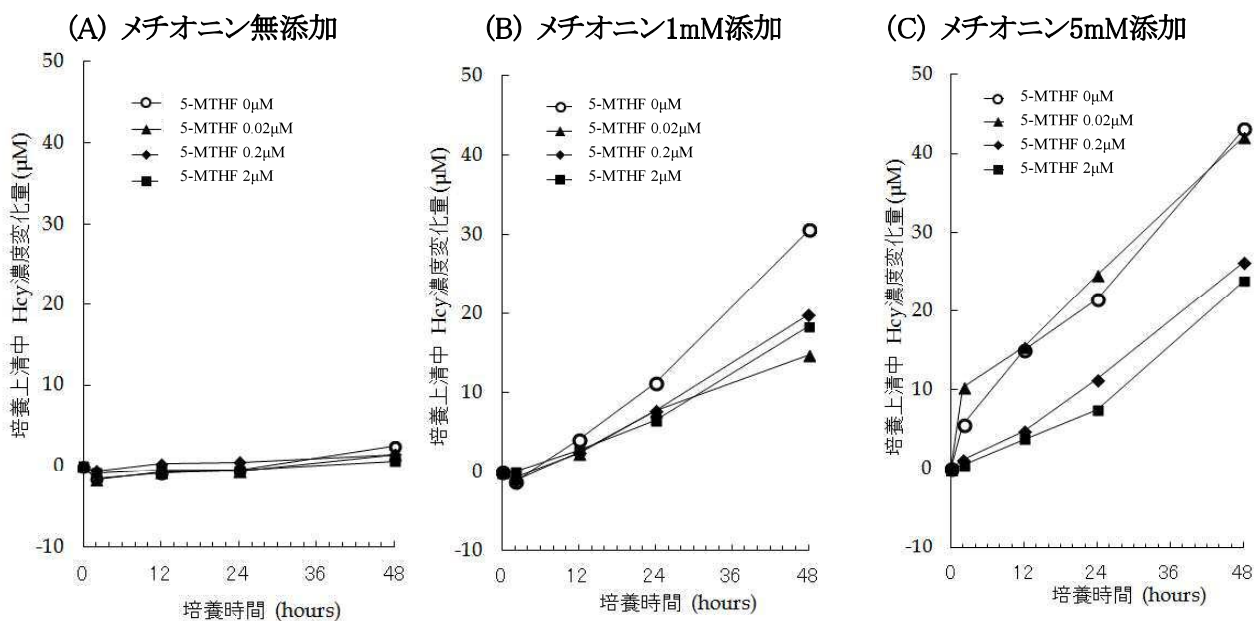


図5-1. メチオニン、5-MTHF添加による上清中Hcy濃度変化

メチオニン無添加または1, 5mM添加条件下において、5-MTHFを無添加(○)または0.02μM(▲), 0.2μM(◆), 2μM(■)のいずれかを添加して48時間培養した際の上清中Hcy濃度変化(n=2)について、Mean±SDで示した。

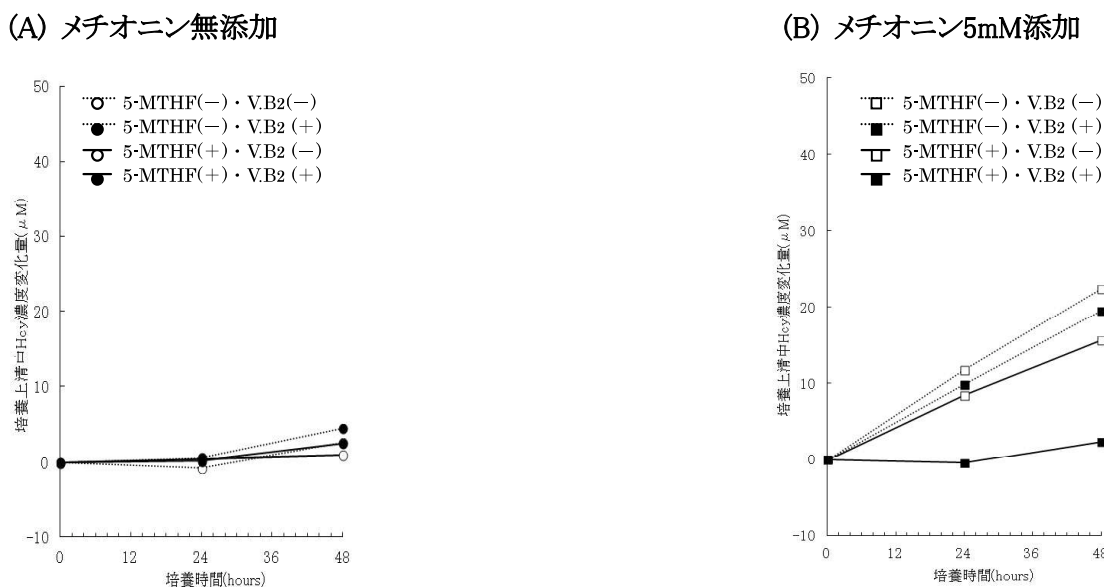


図5-2. メチオニン、5-MTHF、V.B2添加による上清中Hcy濃度変化

メチオニン無添加または5mM添加条件下において、5-MTHF無添加(5-MTHF(-): ...) または2μM添加(5-MTHF(+): -)とV.B2無添加(V.B2(-): ○)または2.64μM添加(V.B2(+): ●)を組み合わせた条件で48時間培養した際の上清中Hcy濃度変化(n=2)について、Mean±SDで示した。

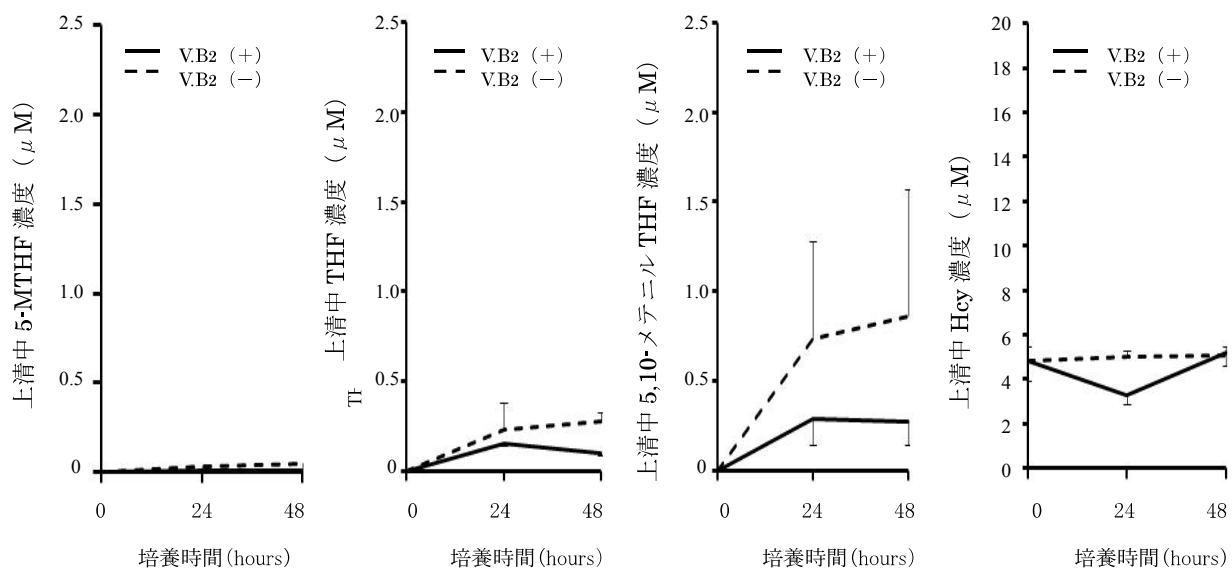
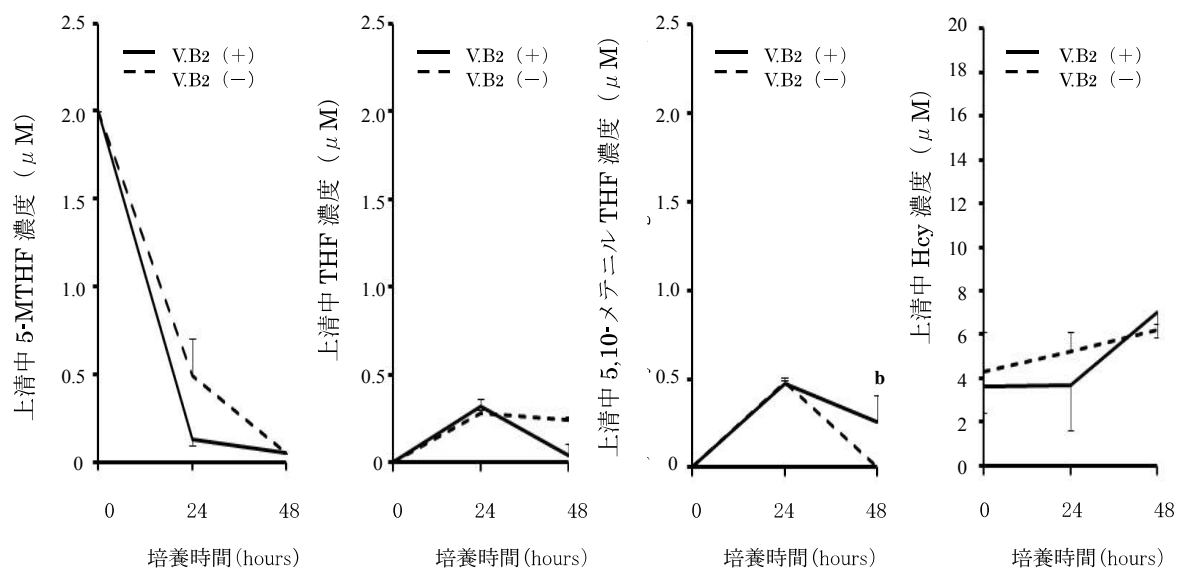


図5-3. 培養上清中5-MTHF、THF、5,10-メチルTHF濃度およびHcy濃度変化に及ぼすV.B2添加の影響

メチオニンも葉酸も無添加とした条件下で、V.B2 を無添加 (V.B2 (-) : ---) または  $2.64 \mu\text{M}$  添加 (V.B2 (+) : —) して 48 時間培養した際の上清中 Hcy 濃度変化(n=3)について、Mean $\pm$ SD で示した。

(A) 5-MTHF 添加条件



(B) THF 添加条件

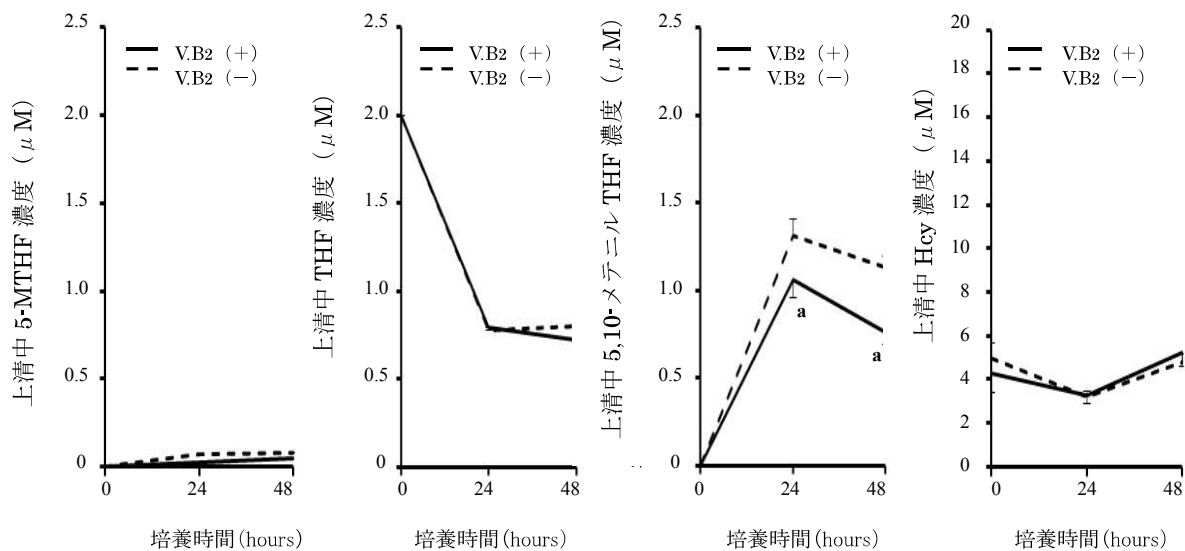
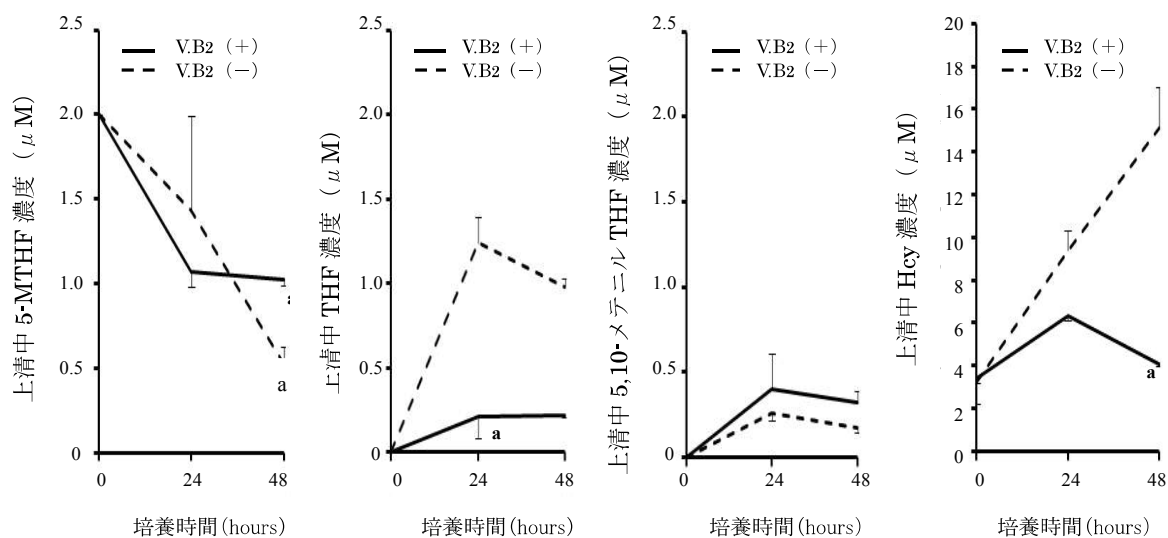


図5-4. 培養上清中5-MTHF、THF、5,10-メチレンTHF濃度およびHcy濃度変化に及ぼす葉酸、V.B2添加の影響

メチオニン無添加条件下で  $2\mu\text{M}$  の 5-MTHF (A) または THF (B) を添加した条件において、V.B2 を無添加 (V.B2 (-) : ---) または  $2.64\mu\text{M}$  添加 (V.B2 (+) : —) して 48 時間培養した際の上清中 Hcy 濃度変化 (n=3) について、Mean $\pm$ SD で示した。a:  $p < 0.05$ , b :  $p < 0.05$  vs V.B2 (-)

(A) メチオニン・5-MTHF 添加条件



(B) メチオニン・THF 添加条件

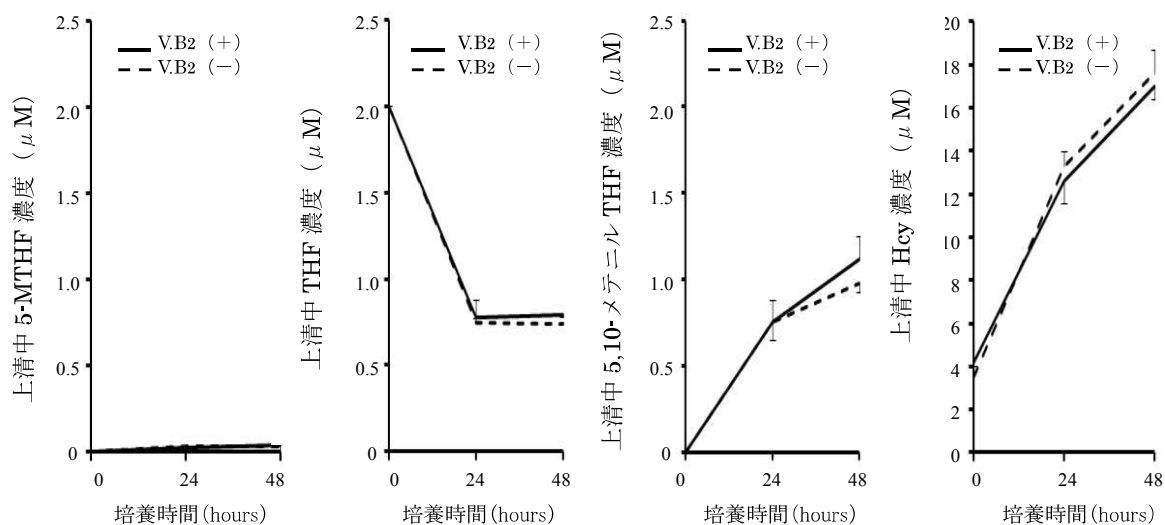


図5-5. 培養上清中5-MTHF、THF、5,10-メチレンTHF濃度およびHcy濃度変化に及ぼすメチオニン、葉酸、V.B2添加の影響

メチオニン 5mM 添加条件下で 2 μM の 5-MTHF (A) または THF (B) を添加した条件において、V.B2 を無添加 (V.B2 (-): ---) または 2.64 μM 添加 (V.B2 (+): —) して 48 時間培養した際の上清中 Hcy 濃度変化(n=3) について、Mean ± SD で示した。a: p < 0.05 vs V.B2 (-)



## 2章 結語

第1章において、V.B<sub>2</sub>を含めHcy代謝に必要なビタミンを複合的に含む食事の摂取が高Hcy血症の予防に有効である可能性が示唆されたが、V.B<sub>2</sub>がHcy代謝に及ぼす影響に関する報告は少ない。そこで、ヒトを対象とした介入研究[研究4]およびラット肝細胞を用いた培養実験[研究5]にて葉酸とV.B<sub>2</sub>の相互作用がHcy代謝指標の変化に及ぼす影響を検討した。

### 研究4

20代健常男性を対象とし、葉酸とV.B<sub>2</sub>サプリメントの短期投与試験を実施した。葉酸群と葉酸&V.B<sub>2</sub>群の血中葉酸濃度は2週間で顕著に上昇したが、血清葉酸濃度変化量は両群で差がなく、Hcy濃度は葉酸群でのみ低下した。葉酸&V.B<sub>2</sub>群のHcy低下作用は軽度であったが、コレステロール濃度は低下傾向にあり、動脈硬化予防の観点からは、葉酸サプリメント摂取時にV.B<sub>2</sub>をあわせて摂取することの有用性が示唆された。

### 研究5

ラット肝細胞を用い、Hcyの前駆体であるメチオニン(Met)の無添加及び添加条件下で、サプリメント型の5-MTHFまたは食事由来型のTHFとV.B<sub>2</sub>の相互作用が肝細胞培養上清中のHcyと葉酸濃度変化に及ぼす影響を検討した。Met存在下の5-MTHF添加ではHcy濃度が増加したが、V.B<sub>2</sub>との同時添加によってHcy濃度は低値となり、V.B<sub>2</sub>が5-MTHFによるHcyの再メチル化を促進したと推察された。一方、THF添加ではV.B<sub>2</sub>添加によるHcy濃度低下作用は認められず、核酸代謝に必要な5,10-メテニルTHF濃度が維持された。

以上のことから、葉酸とV.B<sub>2</sub>の相互作用がHcyおよび葉酸代謝に及ぼす影響は血中Hcy濃度やビタミン濃度のレベルによって異なり、Hcy濃度が極めて高く、葉酸および

V.B<sub>2</sub>濃度が低い条件では、Hcy高濃度状態の改善に5-MTHFとV.B<sub>2</sub>の組み合わせが有効となる可能性が示唆された。

また、V.B<sub>2</sub>は高濃度葉酸のリスクを抑制し、THFは核酸代謝に必要な5,10-メチルTHF等の葉酸の保持に優先的に働く可能性も考えられた。安全かつ効率の良い高Hcy血症予防および改善のために、5-MTHFとTHFがHcy代謝に及ぼす影響について、V.B<sub>2</sub>との相互作用や核酸代謝への影響も含めたさらなる検討が必要と思われた。

## 総括

Hcy は血管内皮障害や平滑筋細胞増殖を介して動脈硬化促進的に作用する。

欧米諸国では高 Hcy 血症が動脈硬化性疾患の危険因子とされ、Hcy 代謝に必要な葉酸等のビタミン B 群欠乏や 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子多型等の遺伝素因のほか、加齢や性別、喫煙等の影響が明らかにされている。日本ではまだ高 Hcy 血症が動脈硬化の確立された危険因子とみなされていないが、食生活の欧米化に伴い今後日本でも高 Hcy 血症が増加する可能性が危惧される。そこで、高 Hcy 血症の効果的な予防及び改善のための食事摂取法に関する検討を行った。

日本人の血漿Hcy濃度に関するデータは少なく、動脈硬化のリスクが高いとされる男性や糖尿病患者のHcy代謝指標について、食習慣や遺伝素因の関連をあわせて検討した報告はない。また、わが国では葉酸の主な供給源となる野菜摂取量が特に20-40代で少なく、高Hcy血症に対する予防的措置を講じるために実態について把握する意義は大きい。そこで、第1章では20代[研究1]および30-40代[研究2]勤労男性と2型糖尿病患者[研究3]を対象として断面調査を実施した

[研究1]では、対象とした20代勤労男性の約1割が軽度-中等度高Hcy血症であり、MTHFR 遺伝子多型変異ホモ型である TT 型の血漿 Hcy 濃度が高く、血清葉酸濃度が低いことが明らかであった。MTHFR 遺伝子多型で調整して Hcy 代謝指標と食習慣の関連を検討すると、主成分分析で抽出された野菜、海藻、きのこ・こんにゃく、果物、大豆・大豆製品、大豆以外の豆・豆製品、魚で構成される日本食型とみなされる食事パターンスコアと血漿 Hcy 濃度が逆相関、血清葉酸濃度が正相関を示し、これらの食品の複合的摂取が高 Hcy 血症予防に有用である可能性が示唆された。

[研究2]で対象とした30-40代勤労男性では軽度-中等度高Hcy血症者が約3割と多く加齢に伴う因子の関与が示唆された。研究1の日本食型パターンの構成食品摂

取頻度得点の合計は、MTHFR 遺伝子多型で調整した血清葉酸濃度と正相関傾向にあり、特に喫煙者では有意であった。中年男性においても日本食型の食事パターンが高 Hcy 血症予防に関与する可能性が示唆された。

[研究 3]で対象とした 2 型糖尿病患者は全体的に血漿 Hcy 濃度が低く、血清葉酸および V.B12 濃度は比較的高く、この特徴は女性で顕著だった。男性は女性より海藻・きのこ、野菜、果物、大豆・大豆製品、魚の摂取頻度とこれらを組み合わせた食事パターンのスコアが低く、糖尿病の食事療法におけるこれらの食品の積極的摂取状況に性差があることが示唆された。このスコアは対象全体と男性において血漿 Hcy 濃度と逆相関を示し、2 型糖尿病患者においてもこれらの食品の複合的摂取が血漿 Hcy 濃度に影響することが示された。

第 1 章で Hcy 代謝に対して共通に有効性が示唆された食品は、葉酸、V.B6、V.B12、V.B2 の供給源となるものであった。Hcy 代謝に関連するこれらのビタミンのうち、V.B2 が Hcy 代謝に及ぼす影響に関する報告はほとんどない。そこで、第 2 章では、葉酸と V.B2 の相互作用による Hcy 代謝指標の変化について検討した。

[研究 4]では 20 代健常男性を対象とし、葉酸と V.B2 サプリメントの短期投与試験を実施した。葉酸群と葉酸 & V.B2 群の血清葉酸濃度は 2 週間で顕著に上昇し、葉酸投与の血清葉酸濃度上昇への即効性が確認された。しかし、血清葉酸濃度変化量は両群で差がなく、血漿 Hcy 濃度は葉酸群でのみ低下した。葉酸 & V.B2 群の Hcy 低下作用は軽度であったが、TC および LDL-C 濃度は低下傾向にあり、動脈硬化予防の観点からは、葉酸サプリメント摂取時に V.B2 を同時摂取することの有用性が示唆された。研究 4 では対象が健常で血漿 Hcy 濃度が比較的低く、血清葉酸および全血中総 V.B2 濃度の低値者がいなかったために V.B2 投与の効果が得られにくかった可能性が考えられる。また、葉酸として生体利用効率の高いサプリメントを用いたが、V.B2 の影響を検討するには食品由来の葉酸との相互作用についても検討すべきと考えられた。

そこで、[研究5]では、Hcyの前駆体であるメチオニン(Met)の無添加及び添加条件下で、サプリメント型の5-MTHFまたは食事由来型のTHFとV.B<sub>2</sub>の相互作用が肝細胞培養上清中のHcyと葉酸濃度変化に及ぼす影響を検討した。Met存在下の5-MTHF添加ではHcy濃度が増加したが、V.B<sub>2</sub>との同時添加によってHcy濃度は低値となり、V.B<sub>2</sub>が5-MTHFによるHcyの再メチル化を促進したと推察された。一方、THF添加ではV.B<sub>2</sub>添加によるHcy濃度低下作用は認められず、核酸代謝に必要な5,10-メチルTHF濃度が維持され、THFが核酸代謝の保持に優先的に働いた可能性が考えられた。

以上2つの章からなる研究により、これまでほとんど注目されていなかった日本人男性および2型糖尿病患者の高Hcy血症予防において、Hcy代謝に必要な葉酸やV.B<sub>6</sub>、V.B<sub>12</sub>、V.B<sub>2</sub>を複合的に含む日本型の食事の摂取が有効となる可能性を明らかにした。

また、葉酸およびV.B<sub>2</sub>濃度が低く、Hcy濃度が極めて高い条件では、Hcy高濃度状態の改善にサプリメント型の葉酸とV.B<sub>2</sub>の組み合わせが有効となる可能性が示唆されたが、食品由来型葉酸摂取時の代謝メカニズムの解明についてはさらなる検討が必要である。

## Summary

Elevated homocysteine (Hcy) levels are considered to promote atherosclerosis by vascular endothelial damage and smooth muscle cells proliferation. Hyperhomocysteinemia is regarded as a risk factor for atherosclerosis in Western countries. The relation among Hcy elevation and deficiencies of folate and other B vitamins which related Hcy metabolism, genetic factor such as 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism, aging, male gender, and smoking had been reported. Though hyperhomocysteinemia remains to be established as a risk factor for atherosclerosis in Japan, there is a fear that hyperhomocysteinemia will also be increasing in Japan along with dietary westernization. Therefore, setting the purpose of this study was to reveal dietary methods for the effective prevention and improvement of hyperhomocysteinemia.

This study consists of two chapters [study 1–5] which cover research study [study 1–3], intervention study [study 4] conducted on Japanese, and cell cultured study [study 5].

### Chapter 1:

#### **Study on the actual conditions of hyperhomocysteinemia and the relation between plasma homocysteine levels and the risk factors for hyperhomocysteinemia among Japanese.**

A few data on plasma Hcy levels have been reported in Japanese population, and there is no report on the metabolic index of Hcy combined with dietary habits and genetic factors in high risk subjects of atherosclerosis such as men and diabetes. In Japan, the intake of vegetables, which is the main source of folate, is especially low among people aged between 20 and 40 years. Investigating the actual conditions of hyperhomocysteinemia in these subjects would be important for identification of proactive measures. Therefore, a cross-sectional survey was performed on salaried worker in their 20s [study 1], 30s and 40s [study 2], and type 2 diabetes [study 3].

In the study 1, mild-to-moderate hyperhomocysteinemia was observed in 10% of all men in their 20s, and high Hcy and low folate levels in subjects with MTHFR TT genotype were confirmed. Based on the analysis of the association of dietary habits and plasma Hcy, serum folate and vitamin B12 (V.B12) levels adjusted for MTHFR genotype, the “Japan diet pattern” score, which was extracted from the principal component analysis consisting of vegetables, seaweeds and mushrooms, vegetables, fruits, soy and soy products, other beans, and fish. This score correlated positively with plasma Hcy

levels and negatively with folate levels. The combined intake of these foods was expected to be effective for the prevention of hyperhomocysteinemia.

In the study 2, mild-to-moderate hyperhomocysteinemia was frequently observed in 30% of all men in their 30s and 40s. The total score of the “Japan diet pattern” in the study 1 was positively related with folate levels adjusted for MTHFR genotype, and a significant correlation was observed in smokers. The “Japan diet pattern” was expected for the prevention of hyperhomocysteinemia in salaried worker in their 30s and 40s.

In the study 3, plasma Hcy levels were relatively low and serum folate and V.B12 levels were relatively high in patients with type 2 diabetes, and this trend was significantly shown in women. The consumption frequencies of seaweeds and mushrooms, vegetables, fruits, soy and soy products, and fish and the “Japanese diet score”, which reflects a combination of the consumption frequencies of these foods, was lower in men than women. In all subjects and men, the “Japanese diet pattern” score correlated negatively with the plasma Hcy level. Therefore, the increase in the consumption frequencies of these food items was suggested to be effective for the prevention of hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes.

The foods commonly suggested to be effective for Hcy metabolism among the study 1 through 3 were the source of folate, vitamin B6 (V.B6), V.B12, and vitamin B2 (V.B2). The efficacy of the combined intake of such food items for the favorable maintenance of Hcy and its related parameter was anticipated.

## **Chapter 2:**

### **Effect of folate derivatives and riboflavin interaction on homocysteine metabolism**

There have been numerous reports on the effects of homocysteine reduction with folate, V.B6, and V.B12. Dietary folate is generally reduced to tetrahydrofolate and then metabolized to 5-MTHF via MTHFR, a flavoprotein enzyme, while lowering Hcy by remethylation. The relation of V.B2 and Hcy metabolism was suggested in Chapter 1. However, few studies have reported the effect of V.B2 on Hcy metabolism.

In the study 4, a short-term folic acid and/or V.B2 supplementation study among healthy men in their 20s was performed. After the intervention, serum folate levels significantly increased in the folic acid group and the folic acid & V.B2 group. However,

the within-group mean changes in serum folate levels did not differ among these two groups and plasma Hcy levels markedly decreased in the folic acid & V.B2 group. Though the Hcy reduction effect was mild in the folic acid & V.B2 group, the total and LDL cholesterol levels tended to be decreased. The combined intake of V.B2 would be useful with folic acid supplementation from the viewpoint of atherosclerosis prevention.

Therefore, in the study 5, the effects of the interaction among V.B2 and 5-MTHF as the supplemental form, or THF as the dietary-derived form on the levels of Hcy and folate derivatives in supernatants of rat hepatocytes were examined under the conditions with or without the addition of methionine as the precursor of Hcy. Under the condition of methionine loading, the Hcy level become high in the medium supplementation with 5-MTHF, while the Hcy level was low in the medium with both 5-MTHF and V.B2. The added V.B2 presumably contributed to the enhancement of Hcy remethylation. This effect is, however, less marked with THF supplementation and maintained the level of 5,10-methenyl THF necessary for nucleic acid metabolism. THF may have acted to maintain the nucleic acid metabolism preferentially.

These findings of the present study suggested that hyperhomocysteinemia can be prevented through intake of the diet rich in vitamins that affect Hcy metabolism, including V.B2, in Japanese men and patients with type 2 diabetes. Additionally, the combination of supplemental form of folate and V.B2 for hyperhomocysteinemia improvement has been suggested. Further examination is needed to clarify the mechanism of changes in Hcy metabolism by the dietary-derived form of folate, including the interactions between V.B2 and nucleic acid metabolism.



## 参考文献

- 1) Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH (1995) Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Eng J Med.* **332**, 286-291
- 2) Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA.* **277**, 1775-1781
- 3) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **346**, 476-483
- 4) Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Rennie JA, Appleby P, Harris N, Gout S, Emery PW, Sanders TA (2005) Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer.* **92**, 838-42
- 5) Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM (1999) Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation.* **99**, 178-182
- 6) 日本動脈硬化学会 (2012) 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年度版 p57
- 7) Selhub J and Miller JW (1992) The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr.* **55**, 131-138
- 8) Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G (1995) Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA.* **274**, 1526-1533
- 9) Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr.(1996) Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr.* **64**, 587-593
- 10) Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Guéant JL (2004) High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr.* **79**, 619-624
- 11) McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* **56**, 111-128
- 12) 佐藤一精 (1997) メチオニン合成酵素が関係するアテローム性動脈硬化症の指標としてのホモシステイン,葉酸,コバラミンと組織培養におけるシアノコバラミン[c-ラク

タム] の作用. ビタミン. **71**, 552-554

13) Sunder-Plassmann G, Födingen M (2003) Genetic determinants of the homocysteine. *Kidney Int.* **84**, 141-144.

14) Domagala TB, Adamek L, Nizankowska E, Sanak M, Szczeklik A (2002) Mutations C677T and A1298C of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **13**, 423-431

15) Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kara I (2005) Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct.* **23**, 51-54

16) Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, Matsuo M, Sumino K (1996) A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. *Jpn J Hum Genet.* **41**, 247-251

17) Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Pienczk-Reclawowicz K, Reclawowicz D, Emich-Widera E, Pilarska E (2012) The TT genotype of methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism increases the susceptibility to pediatric ischemic stroke: meta-analysis of the 822 cases and 1,552 controls. *Mol Biol Rep.* **39**, 7957-7963

18) Guthikonda S, Haynes WG (1999) Homocysteine as a novel risk factor for atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol.* **14**, 283-291

19) Keebler ME, De Souza C, Fonesca V (2001) Diagnosis and treatment of hyperhomocysteinemia. *Curr Atheroscler Rep* **3**, 54-63

20) 松井輝明 (2011) Helicobacter pylori にまつわる疾患の話題 Helicobacter pylori と動脈硬化. *癌と化学療法.* **38**, 365-369

21) Bakker RC, Brandjes DP, Snel P, Lawson JA, Lindeman J, Batchelor D (1997) Malabsorption syndrome associated with ulceration of the stomach and small bowel caused by chronic intestinal ischemia in a patient with hyperhomocysteinemia. *Mayo Clin Proc.* **72**, 546-550

22) Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2008) Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr.* **28**, 273-293

23) Fung TT, Rimm EB, Spiegelman, Rifai N, Tofler GH, Willett WC and Hu FB (2001) Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* **73**, 61-67

24) Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH. (2001) The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol.* **10**, 2181-2189

- 25) Kenari AY, Karimi M, Salimi J, Khashayar P (2013) Plasma levels of homocysteine in Buerger's sufferers and healthy heavy smokers and non-smokers. *Clin Lab.* **59**, 93–96
- 26) de la Vega MJ, Santolaria F, González-Reimers E, Alemán MR, Milena A, Martínez-Riera A, González-García C (2001) High prevalence of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: the importance of the thermolabile form of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Alchol.* **25**, 59–67
- 27) Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, Steegers-Theunissen RP (1999) Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr.* **129**, 1135–1139
- 28) Broekmans WM, Klöpping-Ketelaars IA, Schuurman CR, Verhagen H, van den Berg H, Kok FJ, van Poppel G (2000) Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J Nutr.* **130**, 1578–1583
- 29) Gao X, Bermudez OI, Tucker KL (2004) Plasma C-reactive protein and homocysteine concentrations are related to frequent fruit and vegetable intake in Hispanic and non-Hispanic white elders. *J Nutr.* **134**, 913–918
- 30) 厚生労働省 (2010) 国民健康・栄養調査報告書. p68–71
- 31) Maruyama C, Araki R, Takeuchi M, Kuniyoshi E, Iwasawa A, Maruyama T, Nakano S, Motohashi Y, Nakanishi M, Kyotani S, Tsushima M (2004) Relationships of nutrient intake and lifestyle-related factors to serum folate and plasma homocysteine concentrations in 30–69 year-old Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol.* **50**, 1–8
- 32) Hiraoka M, Kato K, Saito Y, Yasuda K, Kagawa Y (2004) Gene-nutrient and gene-gene interactions of controlled folate intake by Japanese women. *Biochem Biophys Res Commun.* **316**, 1210–1216
- 33) Castelli WP (1984) Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med.* **76**, 4–12
- 34) Haffner SM, Lehto S, Rönkämaa T, Pyörälä K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* **339**, 229–234
- 35) Fenech M, Aitken C, Rinaldi J (1998) Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis.* **19**, 1163–1171
- 36) Tamura T, Turnlund JR (2004) Effect of long-term, high-copper intake on the concentrations of plasma homocysteine and B vitamins in young men. *Nutrition.* **20**, 757–759

- 37) Iso H, Moriyama Y, Sato S, Kitamura A, Tanigawa T, Yamagishi K, Imano H, Ohira T, Okamura T, Naito Y, Shimamoto T (2004) Serum total homocysteine concentrations and risk of stroke and its subtypes in Japanese. *Circulation*. **109**, 2766-2772
- 38) Ishihara J, Yamamoto S, Iso H, Inoue M, Tsugane S; JPHC FFQ Validation Study Group (2005) Validity of a self-administered food frequency questionnaire (FFQ) and its generalizability to the estimation of dietary folate intake in Japan. *Nutr J*. **4**, 1475-2891
- 39) 金井泉, 金井正光 (2002) 臨床検査法提要 改訂第 31 版. 金原出版, p 504-508, 511, 515-516, 555-560
- 40) Krauss RM and Burke DJ (1982) Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res*. **23**, 97-104
- 41) 金井泉, 金井正光 (2002) 臨床検査法提要 改訂第 31 版. 金原出版, p645-647, 661-662
- 42) Frick B, Schröcksnadel K, Neurauder G, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, Fuchs D (2003) Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clin Chim Acta*. **331**, 19-23
- 43) 朱雀恵、萩原貴裕、川崎芳正 (2006) ADIVA Centaur によるビタミン B<sub>12</sub> および葉酸の測定. 生物試料分析. **29**, 235-242
- 44) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. **10**, 111-113
- 45) Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM (1994) Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr*. **124**, 1934-1941
- 46) Araki R, Maruyama C, Igarashi S, Yoshida M, Maruyama T, Satoh T, Yoshida M, and Umegaki K (2006) Effects of short-term folic acid and/or riboflavin supplementation on serum folate and plasma total homocysteine concentrations in young Japanese male subjects. *Eur J Clin Nutr*. **60**, 573-579
- 47) Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, Steegers-Theunissen RP (1999) Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr*. **129**, 1135-1139
- 48) 湯浅直樹, 石川達也, 徳岡健太郎, 北川泰久, 高木繁治. (2008) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子異常による若年性脳梗塞の 1 例. *臨床神経*. **48**, 422-425

- 49) Tada N, Maruyama C, Koba S, Tanaka H, Birou S, Teramoto T, Sasaki J (2011) Japanese dietary lifestyle and cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb.* **18**, 723-734
- 50) Konstantinova SV, Vollset SE, Berstad P, Ueland PM, Drevon CA, Refsum H, Tell GS (2007) Dietary predictors of plasma total homocysteine in the Hordaland Homocysteine Study. *Br J Nutr.* **98**, 201-210
- 51) Huang T, Zheng J, Chen Y, Yang B, Wahlqvist ML, Li D (2011) High consumption of  $\Omega$ -3 polyunsaturated fatty acids decrease plasma homocysteine: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Nutrition.* **27**, 863-867
- 52) Ganji V, Kafai MR (2004) Frequent consumption of milk, yogurt, cold breakfast cereals, peppers, and cruciferous vegetables and intakes of dietary folate and riboflavin but not vitamins B-12 and B-6 are inversely associated with serum total homocysteine concentrations in the US population. *Am J Clin Nutr.* **80**, 1500-1507
- 53) Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K (2004) Soy product intake is inversely associated with serum homocysteine level in premenopausal Japanese women. *J Nutr.* **133**, 797-800
- 54) 梶原公子 (2006) 食の外部化における若者の生活スタイルと食意識に関する研究. 日本食生活学会誌. **17**. 59-67
- 55) Mashavi M, Hanah R, Boaz M, Gavish D, Matas Z, Fux A, Shargorodsky M (2008) Effect of homocysteine-lowering therapy on arterial elasticity and metabolic parameters in metformin-treated diabetic patients. *Atherosclerosis.* **199**, 362-367
- 56) Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* **354**, 1567-1577
- 57) Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, Bønaa KH, Spence JD, Nygard O, Jamison R, Gaziano JM, Guarino P, Bennett D, Mir F, Peto R, Collins R; B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration (2010) Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med.* **170**, 1622-1631
- 58) King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* **21**, 1414-1431
- 59) Shiba N, Shimokawa H (2011) Prospective care of heart failure in Japan: lessons from CHART studies. *EPMA J.* **2**, 425-438
- 60) 厚生労働省 (2010) 国民健康・栄養調査報告書 p11-14

- 61) 井宣隆, 木原温子, 植田寛, 只野壽太郎. (1995) グルコース脱水素酵素を用いた液状試薬「メルクリキッド GLU」の評価. 日本臨床検査自動化学会会誌. **20**, 88-92
- 62) Chevenne D, Letailleur A, Trivin F, Porquet D (1998) Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin Chem.* **44**, 354-356
- 63) Liao F and Huang PC (1986) Effects of moderate riboflavin deficiency on lipid metabolism in rats. *Proc Natl Sci Counc B ROC.* **11**, 128-132
- 64) Fujishima M, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Yoshitake T (1996) Diabetes and cardiovascular disease in a prospective population survey in Japan: The Hisayama Study. *Diabetes.* **45**, 14-16
- 65) Masuda Y, Kubo A, Kokaze A, Yoshida M, Fukuhara N, Takashima Y (2008) Factors associated with serum total homocysteine level in type 2 diabetes. *Environ Health Prev Med.* **13**, 148-155
- 66) Chico A, Pérez A, Córdoba A, Arcelús R, Carreras G, de Leiva A, González-Sastre F, Blanco-Vaca F (1998) Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus: a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease? *Diabetologia.* **41**, 684-693
- 67) Satyanarayana A, Balakrishna N, Pitla S, Reddy PY, Mudili S, Lopamudra P, Suryanarayana P, Viswanath K, Ayyagari R, Reddy GB (2011) Status of B-vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: association with vitamin-B12 deficiency and hyperhomocysteinemia. *PLoS One.* **6**, e26747
- 68) González R, Pedro T, Martínez-Hervas S, Civera M, Priego MA, Catalá M, Chaves FJ, Ascaso JF, Carmena R, Real JT (2012) Plasma homocysteine levels are independently associated with the severity of peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic subjects. *J Peripher Nerv Syst.* **17**, 191-196
- 69) Iimuro S, Yoshimura Y, Umegaki H, Sakurai T, Araki A, Ohashi Y, Iijima K, Ito H; Japanese Elderly Diabetes Intervention Trial Study Group (2012) Dietary pattern and mortality in Japanese elderly patients with type 2 diabetes mellitus: does a vegetable- and fish-rich diet improve mortality? An explanatory study. *Geriatr Gerontol Int.* **12**, 59-67
- 70) Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ; A1c-Derived Average Glucose Study Group (2008) Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care.* **31**, 1473-1478
- 71) Rybak ME, Jain RB, Pfeiffer CM (2005) Clinical vitamin B6 analysis: an interlaboratory comparison of pyridoxal 5'-phosphate measurements in serum. *Clin Chem.* **51**, 1223-1231

- 72) 日本糖尿病学会 (2003) 糖尿病食事療法のための食品交換表. 文光堂
- 73) de Jager J, Kooy A, Leher P, Wuffle MG, van der Kolk J, Bets D, Verburg J, Donker AJ, Stehouwer CD (2010) Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomized placebo controlled trial. *BMJ*. **340**, c2181
- 74) Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, van het Hof KH, Eskes TK, Hautvast JG, Steegers-Theunissen RP (1999) Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr*. **129**, 1135-1139
- 75) Venn BJ, Mann JI, Williams SM, Riddell LJ, Chisholm A, Harper MJ, Aitken W (2002) Dietary counseling to increase natural folate intake: a randomized, placebo-controlled trial in free-living subjects to assess effects on serum folate and plasma total homocysteine. *Am J Clin Nutr*. **76**, 758-765
- 76) 厚生労働省 (2010) 国民健康・栄養調査報告書 p68-71
- 77) Sun J, Xu Y, Lu H, Zhu Y (2009) Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene association with homocysteine and ischemic stroke in type 2 diabetes. *Meurol India*. **57**, 589-593
- 78) Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H, Deng H, Fan Y, Sun S, Zhang Y (2003) The relationship between MTHFR gene polymorphisms, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Med J*. **116**, 45-147
- 79) Bates CI and Fuller NJ (1986) The effect of riboflavin deficiency on methylentetrahydrofolate reductase and folate metabolism in the rat. *Br J Nutr*. **55**, 455-464.
- 80) McNulty H, McKinley MC, Barbara W, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG and Scott JM (2002) Impaired functioning of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status. *Am J Clin Nutr*. **76**, 436-441
- 81) Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P and Fenech M (2004) Methylentetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr*. **134**, 48-56
- 82) Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjørke-Monsen AL and Schneede J (2000) Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the Methylentetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem*. **46**, 1065-1071
- 83) Shimakawa T, Nieto FJ, Malinow MR, Chambless LE, Schreiner PJ and Szklo M (1997) Vitamin intake: a possible determinant of plasma homocyst(e)ine among

middle-aged adults. *Ann Epidemiol.* **7**, 285–293.

84) Gao X, Yao M, McCrory MA, Ma G, Li Y, Roberts SB and Tucker KL (2003) Dietary pattern is associated with homocysteine and B vitamin status in an urban Chinese population. *J Nutr.* **133**, 3636–3642

85) McKinley MC, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ and Scott JM (2002) Effect of riboflavin supplementation on plasma homocysteine in elderly people with low riboflavin status. *Eur J Clin Nutr.* **56**, 850–856

86) Lakshmi AV and Ramalakshmi BA (1998) Effect of pyridoxine or riboflavin supplementation on plasma homocysteine levels in women with oral lesions. *Natl Med J India.* **11**, 171–172

87) Smith AD, Kim YI, and Refsum H (2008) Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr.* **87**, 517–533

88) Hultquist DE, Xu F, Quandt KS, Shlafer M, Mack CP, Till GO, Seekamp A, Betz AL and Ennis SR (1993) Evidence that NADPH-dependent methemoglobin reductase and administered riboflavin protect tissues from oxidative injury. *Am J Hematol.* **42**, 13–18

89) Boisvert WA, Castaneda C, Mendoza I, Langeloh G, Solomons NW, Gershoff SN and Russell RM (1993) Prevalence of riboflavin deficiency among Guatemalan elderly people and its relationship to milk intake. *Am J Clin Nutr.* **58**, 85–90

90) Yoshida K, Hosokawa A and Yoshida S (1961) Microdetermination of riboflavin in the human blood and their results with three methods in different principles. *Mie Med J.* **11**, 13–15

91) Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A and Brattström L (1995) Plasma homocysteine in acute myocardial infarction. *J Intern Med.* **237**, 381–388

92) Klerk M, Verhoef P, Verbruggen B, Schouten EG, Blom HJ, Bos GM and den Heijer M (2002) Effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of clotting activation. *Thromb Haemost.* **88**, 230–235

93) Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH and Selhub J (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* **73**, 613–621

94) Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjørke-Monsen AL and Schneede J (2000) Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the Methylentetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem.* **46**, 1065–1071

95) Chen FP, Lin CC, Chen TH, Tsai MC and Huang YC (2013) Higher plasma



homocysteine is associated with increased risk of developing colorectal polyps. *Nutr Cancer*. **65**, 195–201

96) Powers HJ, Hill MH, Welfare M, Spiers A, Bal W, Russell J, Duckworth Y, Gibney E, Williams EA and Mathers JC (2007) Responses of biomarkers of folate and riboflavin status to folate and riboflavin supplementation in healthy and colorectal polyp patients (the FAB2 Study). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **16**, 2128–2135

97) Brouwer IA, Dusseldorp M, Thomas CMG, Duran M, Hautvast JG, Eskes TK and Steegers-Theunissen RP (1999) Low dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr*. **69**, 99–104

98) den Heijer M, Brouwer IA, Bos GM, Blom HJ, van der Put NM, Spaans AP, Rosendaal FR, Thomas CM, Haak HL, Wijermans PW and Gerrits WB (1998) Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **18**, 356–361

99) Brouwer IA, Dusseldorp M, Duran M, Thomas CM, Hautvast JG, Eskes TK, and Steegers-Theunissen RP (1999) Low-dose folic acid supplementation dose not influences plasma methionine concentrations in young non-pregnant women. *Br J Nutr*. **82**, 85–89

100) 丹野慶紀, 田中恒明 (1985) 抗脂血症剤. 医薬ジャーナル. **21**, 1869–1873

101) Jencks DA, Mathews RG

(1987) Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem*. **262**, 2485–2493

102) Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A and Becker PJ (1993): Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr*. **57**, 47–53

103) Biamonte AR and Schneller GH (1951) A study of folic acid stability in solutions of the B complex vitamins. *J Am Pharm Assoc*. **40**, 313–320

104) McNulty H, Dewey LRC, Strain JJ, Dunne A, Ward M, Molloy, McAnena LB, Hughes JP, Hannon-Fletcher M and Scott JM (2006) Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677CT polymorphism. *Circulation*. **113**, 74–80

105) Christensen B, Refsum H, Vintermyr O and Ueland PM (1991) Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of non-transformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. *J Cell Physiol*. **146**, 52–62

106) Chen FP, Lin CC, Chen TH, Tsai MC and Huang YC (2013) Higher plasma

homocysteine is associated with increased risk of developing colorectal polyps. *Nutr Cancer*. **65**, 195–201

107) Nakata R (2000) Determination of folate derivatives in rat tissues during folate deficiency. *J Nutr Sci Vitaminol*. **46**, 215–221

108) Horne DW (2001) High-performance liquid chromatographic measurement of 5,10-methylenetetrahydrofolate in liver. *Anal Biochem*. 297, 154–159

109) McNulty H, McKinley MC, Wilson B, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG and Scott JM (2002) Impaired function of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status: implications for riboflavin requirements. *Am J Clin Nutr*. 76, 436–441

110) Zhang X, Zhang J, Mao X, Zou Q, Hu Y and Wang DC (2010) Crystallization and preliminary crystallographic studies of a flavin-dependent thymidylate synthase from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. **66**, 513–515

111) Vahteristo LT, Ollilainen V, Varo P (1997) Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. *J AOAC Int*. **80**, 373–378

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、長年にわたる懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました日本女子大学教授 丸山千寿子先生に心より深く感謝申し上げます。また、本研究に関しご指導とご助言を賜りました同教授 佐藤和人先生、本論文を御高覧頂き貴重なご助言を賜りました本間健先生、五関正江先生、ならびにホモシステイン代謝指標の測定等についてもご指導いただきました国立健康・栄養研究所 梅垣敬三先生に深謝致します。

本研究の遂行において多くのご協力をいただいた埼玉社会保険病院 丸山太郎先生、鈴木裕也先生、右田友房氏ならびに臨床検査室の皆様、住友商事診療所 木村正儀先生、岡本妙子氏、帝京大学教授 寺本民生先生に厚く御礼申し上げます。

また、実験や調査の実施にあたりご協力いただいた諏訪かな子氏、関根明世氏、五十嵐さとみ氏、吉田真奈美氏、山口玲奈氏、曳地真喜子氏、荒井祐貴子氏、今田季穂氏、鹿島日布美氏をはじめとした日本女子大学 栄養教育・臨床栄養学研究室の皆様にも深く感謝致します。

遺伝子多型の測定についてご教示いただきました慶應義塾大学教授 村田満先生、山田悟先生(現:北里研究所病院)、葉酸の測定についてご教示いただきました国立健康・栄養研究所 佐藤(三戸)夏子先生(現:麻布大学准教授)ならびに奈良女子大学教授 中田理恵子先生、肝細胞培養実験についてご教示いただきました東京農工大学教授 三浦豊先生、統計手法についてご教示いただきました慶應義塾大学教授 岡村智教先生、日本女子大学教授 今野良彦先生ならびに順天堂大学教授 丸井英二先生、論文投稿時の英文校正をして下さったBiert Barford氏に深く感謝致します。葉酸およびV.B12濃度の測定にあたりご協力いただきましたロシュダイアグノスティックス株式会社 佐藤智晃氏ならびに吉田雅之氏、介入試験に使用する乳糖製錠をご提供いただきました東京理科大学 海保房夫先生に深く感謝致します。

なお、本研究は科学研究費補助金(No.18300257および18700615)の助成を受けて実施したものであり、ここに記して感謝の意を表します。