

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの
食品添加物指定に関する要請書

Merck Eprova AG
Im Laternenacker 5, CH-8200
Schaffhausen, Switzerland
Tel: +41-52-630 72 72
Fax: +41-52-630 72 55

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの食品添加物指定に関する要請書

目次	3 頁
略号表	6 頁
1. 資料概要	7 頁
2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	9 頁
(1) 起源又は発見の経緯	
(2) 外国における使用状況	
① 米国：「GRAS」自己認証	
② 米国：新しい食品成分としての届出（75・日市販前届出）	
③ ヨーロッパにおける状況：欧州食品安全委員会（EFSA）における評価	
④ FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）における評価	
⑤ 諸外国での使用状況や医薬品等としての使用実績	
3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料	11 頁
(1) 名称	
(2) 構造式又は示性式	
(3) 分子式及び分子量	
(4) 含量規格	
(5) 製造方法（非公開）	
(6) 性状	
(7) 確認試験	
① 赤外吸光分析	
② カルシウム	
(8) 示性値	
① 融点	
② 比旋光度	
③ pH	
(9) 純度試験	
① その他の葉酸及び関連物質	
② D-5-メチルテトラヒドロ葉酸	
③ カルシウム	
④ ホウ素	
⑤ 残留溶媒（エタノール）	
⑥ 重金属	
(10) 乾燥減量、強熱減量又は水分	
(11) 強熱残分（強熱残留物）	
(12) 定量法	
(13) 食品添加物の安定性	
(14) 食品中の食品添加物の分析法	
(15) 成分規格案の設定根拠	
4. 有効性に関する資料	36 頁
(1) 食品添加物としての有効性及び他の同種の添加物との効果の比較	
① 5-メチルテトラヒドロ葉酸は多くの食品中の主な天然型葉酸	
② 生理活性	
③ 生物学的有効性	
④ 5-メチルテトラヒドロ葉酸の摂取はビタミン B ₁₂ 欠乏症の臨床症状を隠蔽しない	

(2) 食品中での安定性	
① 総合ビタミン/ミネラル錠における安定性	
② 総合ビタミン錠における安定性	
③ 単一ビタミン錠における安定性	
④ B群ビタミンカプセルにおける安定性	
⑤ 水溶液における安定性	
⑥ UHT 処理中の溶液における安定性	
⑦ マイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの安定性	
(3) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	
① 製パン中の安定性	
② 食品加工中の安定性	
③ 液体特殊調整乳中の安定性	
④ 医薬品との相互作用	
5. 安全性に関する資料	43 頁
(1) 毒性に関する資料	
① 毒性試験のまとめ	
② 単回投与毒性試験	
③ 90 日間反復投与毒性試験	
④ 繁殖試験／催奇形性試験	
⑤ 抗原性に関する考察	
⑥ 変異原性試験	
i) Ames 試験	
ii) TK 遺伝子座試験	
iii) DNA 合成と修復試験	
iv) 小核試験	
⑦ ヒトにおける安全性に関する資料	
(2) 体内動態に関する資料	
① 天然の葉酸類の吸収	
② 葉酸の吸収	
③ 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの吸収	
④ 5-メチルテトラヒドロ葉酸の循環系から細胞への葉酸の取り込み	
⑤ 5-メチルテトラヒドロ葉酸の代謝、分布、排泄	
(3) 食品添加物の 1 日摂取量に関する資料	
6. 使用基準案に関する資料	53 頁
(1) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを栄養強化を目的とした使用の場合の 摂取基準（上限量）	
(2) 摂取基準案の設定根拠	
(3) 葉酸と 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの換算	
7. その他参考となる資料	55 頁
(1) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのラセミ体 (D,L-5-MTHF-Ca) による毒性試験	
8. 添付資料一覧	57 頁
[1] 専門家パネル報告：一般食品およびダイエタリーサプリメントにおける L-5-メチルテトラヒドロ葉酸の使用について (Borzelleca, et.al.,1999)	
[2] 葉酸の許容上限摂取量に関する欧州食品科学委員会の見解 (SCF 2000)	
[3] 欧州委員会の諮問に対する食品添加物・香料・加工助剤および食品接触物質 科学パネルの見解：L-メチル葉酸カルシウム	
[4] 改定 Directive 2001/15/EC (2006/34/EC) および改定 Directive 2002/46/EC (2006/37/EC)	
[5] 第 65 回 FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) の概要および結論	

- [6] 原料および製造工程で用いられた化学物質の規格
- [7] 製造工程の管理
- [8] ICP-MS について
- [9] L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム結晶の保存安定性
- [10] 微細粒 L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム結晶の保存安定性
- [11] 食品中の食品添加物分析法解説書（葉酸）
- [12] 食品添加物規格「葉酸」
- [13] 欧州および JECFA における 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの成分規格
- [14] L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのビタミン錠剤、カプセルにおける安定性
- [15] 平成 18 年国民健康・栄養調査結果の概要
- [16] 日本人の食事摂取基準（2005 年版）（葉酸）
- [17] Calcium-L-Mefolate (L-MTHF): 13 Week Oral Toxicity Study in Wister Rats (Hamann, et al., 2001)
- [18] Metafolin: Prenatal developmental toxicity study after administration to rats (Schubert & Jacobs, 2003)
- [19] Calcium-L-Mefolate: Bacterial Mutagenicity Assay, Salmonella typhimurium and Escherichia coli (Utesch, 1999a)（非公開）
- [20] Calcium-L-Mefolate: In vitro mammalian cell gene mutation test (L5178/TK^{+/+}) (Utesch, 2000a)（非公開）
- [21] Calcium-L-Mefolate: Measurement of unscheduled DNA synthesis in rat liver using an *in vivo* / *in vitro* procedure (Howe, 2002)
- [22] Calcium-L-Mefolate: Micronucleus test in male rats after administration (Utesch, 2000b)（非公開）
- [23] 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について（平成 12 年 12 月 28 日児母第 72 号・健医地生発第 78 号）
- [24] 食品衛生法施行規則、栄養機能食品の規格基準および特定保健用食品の表示

9. 参考文献一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58 頁

略号表

本文中で用いられている略号は以下の通りである。

略号	説明
ABGA	4-Aminobenzoylglutamic acid 4-アミノベンゾイルグルタミン酸
AUC	Area Under Curve 曲線下面積
BASF	Badische Anillin & Soda Fabrik AG 会社名
CAS	Chemical Abstracts Service 化学物質アブストラクトサービス
CFR	Code of Federal Register (米国) 連邦規則
CFU	Colony Forming Units コロニー形成単位
CH ₂ THFA	5,10-Methylenetetrahydrofolic Acid 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸
CIP	Cahn-Ingold-Prelog system
DHFA	7,8-Dihydrofolic Acid 7,8-ジヒドロ葉酸
DiMeTHFA	N ² -Methylamino-5-methyltetrahydrofolic Acid N ² -メチルアミノ-5-メチルテトラヒドロ葉酸
D-Mefox	D-Pyrazino-s-triazine derivative D-ピラジノ-s-トリアジン誘導体
D-5-MTHF	D-5-Methyltetrahydrofolic Acid D-5-メチルテトラヒドロ葉酸
d.s.	dry substance 無水物換算
DSHEA	Dietary Supplements Health and Education Act 米国栄養補助食品健康教育法
EFSA	European Food Safety Authority 欧州食品安全機関
FA	Folic Acid 葉酸
FDA	Food and Drug Administration 米国食品医薬品庁
FD&CA	Food, Drug and Cosmetic Act 連邦食品医薬品化粧品法
FOB	Functional Observational Battery 機能観察バッテリー
GMP	Good Manufacturing Practice 優良製造規範
GNC	General Nutrition Corporation 会社名
GRAS	Generally Recognized as Safe 一般的に安全とみなされる
HOME ₂ THFA	4 α -Hydroxy-5-methyltetrahydrofolic Acid 4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸
HPLC	High Performance Liquid Chromatography 高速液体クロマトグラフィー
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry 誘導結合プラズマ質量分析
ISTD	Internal Standard 内部標準
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
L-Mefox	L-Pyrazino-s-triazine derivative L-ピラジノ-s-トリアジン誘導体
L-5-MTHF	L-5-Methyltetrahydrofolic Acid L-5-メチルテトラヒドロ葉酸
L-5-MTHF-Ca	L-5-Methyltetrahydrofolic Acid, Calcium Salt L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level 最小毒性量
MeTHFA	5-Methyltetrahydrofolic Acid 5-メチルテトラヒドロ葉酸
MeTHPA	5-Methyltetrahydropteroic Acid 5-メチルテトラヒドロプテロイル酸
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolic Acid 5-メチルテトラヒドロ葉酸
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level 無毒性量
r.h.	relative humidity 相対湿度
SCF	Scientific Committee on Food 欧州食品安全委員会
THF, THFA	Tetrahydrofolic Acid テトラヒドロ葉酸
UHT	Ultra High Temperature 超高温処理

1. 資料概要

はじめに

葉酸（一般的記述に際しては、folic acid および folate(s) は単に葉酸とした。ただし、特定の葉酸のタイプを示す場合にはそのように表記した）は、通常の食生活では欠乏することはほとんどないが、妊娠中の女性では欠乏が見られることがあるとされている。重篤な葉酸欠乏症には巨赤芽球形貧血がある。また、欧米における調査によると、受胎前後における十分な葉酸の摂取は、神経管の発育不全による二分脊椎、無脳症、脳質ヘルニアなどの神経管障害の発生や、次の妊娠時にそうした障害を持つ新生児の誕生の防止に有効なことが認められている。

天然に存在する葉酸は植物、動物および人の組織中に、従って当然食品中にも見出され、通常一般的に、 γ -ペプチド連鎖によって互いに結合した 5~7 個のグルタミン酸残基から成るポリグルタミル側鎖を持っている。プテロイルモノグルタミン酸（葉酸）は、各種の葉酸化合物の内、構造的に最も単純なものであり、現在、日本において食品および錠剤、カプセル状等食品（いわゆる栄養補助食品、サプリメント）の栄養素強化用としての使用が認められている唯一のものである。しかしながら、プテロイルモノグルタミン酸としての葉酸は天然には僅かな量が見出されているだけであり、またさらに、葉酸はそのままでは、直接補酵素として作用することはできない。即ち、葉酸は体内に取り込まれた後テトラヒドロ葉酸（THF）に還元され、葉酸としての機能を果たしている。

5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MTHF）は食品中に存在する天然の葉酸化合物の内の主な還元型の葉酸であり、そのモノグルタミン酸塩が循環血液に見出される主な型の葉酸である。さらに葉酸に対する 5-メチルテトラヒドロ葉酸の別の潜在的な長所は、ビタミン B₁₂ 欠乏症の臨床症状を隠蔽する可能性のないことである。葉酸によるビタミン B₁₂ 欠乏症の隠蔽作用は、葉酸のサプリメントとしての摂取に関してこれまで主に懸念されていることであり、葉酸の許容摂取量の上限値を 1,000 $\mu\text{g}/\text{日}$ に制限している一つの理由でもある。**5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（5-MTHF-Ca）**は、摂取時あるいは溶解時に 5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MTHF）とカルシウム（Ca²⁺）に容易にかつ完全に解離し、5-メチルテトラヒドロ葉酸として機能する。

起源又は発見の経緯及び使用状況に関する資料（9 頁）

1994 年、Merck Eprova AG 社は、立体化学的に純粋な 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの葉酸からの合成法を確立した。同社は、1999 年米国連邦規則 21CFR170.30 に従い「GRAS」として自己認証を行ない、さらに 2004 年欧州食品安全機関 EFSA および 2005 年 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 JECFA より、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの食品への葉酸の給源としての使用は安全上問題ないとの結論を得た。

物理化学的性質及び成分規格に関する資料（11 頁）

一般名は 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム。示性式および分子量は $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_6 \cdot \text{Ca} = 497.5$ （無水物として）。5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、5-メチルテトラヒドロ葉酸のカルシウム塩であり、プテロイルモノグルタミン酸（葉酸）の還元によって得られたテトラヒドロ葉酸をメチル化し、得られた 5-メチルテトラヒドロ葉酸をカルシウム塩として結晶化したものである。

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの純度は $>95\% \text{w/w}$ 、純度に関する規格は：その他の葉酸および関連物質 2.5%以下；D-5-メチルテトラヒドロ葉酸（6R, α S 異性体）1.0%以下；カルシウム 7.0~8.5%（無水物、無溶媒換算）；ホウ素 20mg/kg 以下；残留溶媒（エタノール）0.5%以下；重金属（Pb として）20mg/kg 以下；ヒ素（As 2O₃ として）mg/kg 以下；水分 17.0%以下である。

なお、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの製品は種々の量の結晶水を含有するが、構造式には含まれていない。

有効性に関する資料（36 頁）

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの有効性および必要性については、以下の点から説明される。

- 1) 5-メチルテトラヒドロ葉酸が多くの食品中の主な天然型葉酸であること。すなわち、5-メチルテトラヒドロ葉酸は食品中に存在する天然の葉酸化合物の内の主な還元型の葉酸であり、そのモノグルタミン酸塩が循環血液に見出される主な型の葉酸である。
5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは5-メチルテトラヒドロ葉酸のカルシウム塩であり、摂取時あるいは溶解時に5-メチルテトラヒドロ葉酸とカルシウム(Ca^{2+})に容易にかつ完全に解離し、5-メチルテトラヒドロ葉酸として機能する。
- 2) メチル化反応において5-メチルテトラヒドロ葉酸の生物学的有効性は葉酸と同等か、あるいは僅かに高いとされる。すなわち、プテロイルモノグルタミン酸（葉酸）においては、活性メチル化に供される前に2段階の還元が必要とされるが、5-メチルテトラヒドロ葉酸は既に還元型であり、このメチル化反応に直接供されるため、その生物学的有効性が少なくとも同等か高いことが当然予測される。
- 3) ビタミン B_{12} 欠乏症の臨床症状を隠蔽しない。ビタミン B_{12} 欠乏による血液学的作用は、葉酸欠乏から生じる血液学的作用と区別することはできず、いずれの欠乏症においても DNA の合成が傷害される。
ビタミン B_{12} 欠乏症の場合、コバラミン補酵素の欠如により、ビタミン B_{12} が共役因子であるメチオニン合成酵素の活性が低下する。ビタミン B_{12} 欠乏によるメチオニン合成酵素活性低下の条件下で、葉酸投与によりテトラヒドロ葉酸 (THF) の供給を補うこととなり、それにより DNA の合成および赤血球形成に至る代謝経路が回復し、ビタミン B_{12} 欠乏による血液学的作用は、葉酸によって改善することになり、ビタミン B_{12} 欠乏が隠蔽されることとなる。
一方、ビタミン B_{12} 欠乏によるメチオニン合成酵素活性低下の条件下で、5-メチルテトラヒドロ葉酸はテトラヒドロ葉酸 (THF) に変換されず、従って THF は枯渇し、ビタミン B_{12} 欠乏による血液学的な症状は影響されることなく持続する。すなわち、5-メチルテトラヒドロ葉酸の摂取により、ビタミン B_{12} 欠乏が隠蔽されることがない。

安全性に関する資料 (43 頁)

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの LD_{50} はラットで $2,000\text{mg/kg bw}$ 。また、ラットに 400mg/kg bw および $1,000\text{mg/kg bw}$ までの最大用量の5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムをそれぞれ投与した13週亜慢性毒性試験からはいかなる有害作用も明らかにならなかった。これは、日本人の食事摂取基準 2005 年版において示された葉酸の許容摂取量の上限值 $1,000 \mu\text{g/日/成人}$ （プテロイルモノグルタミン酸として）の少なくとも 20,000 倍の用量の5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに相当する。

1日投与量 100、300 および $1,000\text{mg/kg bw}$ の5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを用いた標準的胚毒性/催奇形性試験において、胎仔毒性、胚毒性または催奇形性作用は認められなかった。

さらに、種々の変異原性試験（エームス試験、染色体異常試験、TK 遺伝子座試験、不定期 DNA 合成試験および小核試験）の結果から、遺伝毒性のないことが認められた。

使用基準案に関する資料 (53 頁)

使用基準案	5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、保健機能食品及び特別用途食品以外の食品に使用してはならない。 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、プテロイルモノグルタミン酸として一日当たり $1,000 \mu\text{g}$ を超えて使用してはならない。
-------	--

5-メチルテトラヒドロ葉酸を保健機能食品および特別用途食品の葉酸強化のための給源として使用する際、栄養機能食品として葉酸の強化を行った旨の適切な表示が行われる場合には、 $60 \mu\text{g/日}$ （下限値）～ $200 \mu\text{g/日}$ （上限値）の範囲で使用されること、また、疾病リスク低減表示に係る特定保健用食品にあっては、一日摂取量の範囲は $400 \mu\text{g/日}$ ～ $1,000 \mu\text{g/日}$ であることから、5-メチルテトラヒドロ葉酸の許容上限値を「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」における葉酸の許容摂取量上限値 $1,000 \mu\text{g/成人/日}$ （成人の許容摂取上限値：通常の商品以外から摂取されるプテロイルモノグルタミン酸として $1,000 \mu\text{g/日}$ ）と同等とすることが妥当であると考え、標記の使用基準案を設定した。

2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

(1) 起源又は発見の経緯

- 1930/31 年：ある種の貧血を予防するとされる酵母中にビタミン様物質の存在が最初に示唆された。
- 1941 年：酵母から分離された *Lactobacillus casei* の成長因子に対して、「葉酸」の名前が提唱された。
- 1943 年：純粋な「葉酸」が初めて分離された。
- 1945/46 年：葉酸の化学構造および合成法が明らかにされた。
- 1946 年：肝臓中に存在する葉酸は、ポリグルタミン酸塩であることが明らかにされた。また、純粋の葉酸は分離生成物であること、および、天然に存在する葉酸は (1)ポリグルタミン酸塩、(2)ジヒドロ葉酸塩あるいはテトラヒドロ葉酸塩に還元されたもの、(3)メチル基、フォルミル基、メチレン基、メテニルグループが N-5 位あるいは N-10 位に結合したものであり、純粋の葉酸とは異なっていることが認識された。
- 1950-60 年：葉酸の代謝および作用機序が解明された。
- 1965 年：Merck Eprova AG 社は、5-フォルミルテトラヒドロ葉酸カルシウムのラセミ体の商業生産を開始した。
- 1984 年：Merck Eprova AG 社は、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) のカルシウム塩あるいはマグネシウム塩 (ラセミ体) の製造工程を明らかにした。
- 1994 年：Merck Eprova AG 社は、立体化学的に純粋な L- 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (L- 5-MTHF-Ca、以後 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム) の製造工程を明らかにした。
- 1999 年：独立した資格のある安全性専門家パネルは、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、一般の食品および医療用食品ならびにサプリメントにおいて葉酸の給源として用いるのに「一般的に安全であるとみなされる」(「GRAS」)と結論した。
- 2001 年：米国食品医薬品庁 (FDA) は、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを、新規の食品素材 (New Dietary Ingredient, NDI) としてサプリメントへの使用に関する届出に対し、特に異議を示さなかった。
- 2002 年：米国において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを用いた最初のサプリメントが発売された。
- 2004 年：10 月、欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority : EFSA) は、葉酸の給源としての 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの、特殊栄養用途食品、サプリメントおよび一般の食品における使用は、許容摂取量上限値を 1 mg/成人/日として安全上問題ないと結論した。
- 2005 年：6 月、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) は、食品への葉酸の給源としての 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの使用は、安全上問題ないと結論した。

(2) 外国における使用状況

① 米国：「GRAS」自己認証

米国連邦規則 21CFR170.30 に従い、独立した資格のある安全性専門家パネルの報告に基づき、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは一般の食品および医療用食品ならびにサプリメントにおいて葉酸の給源として用いるのに「一般的に安全であるとみなされる」(「GRAS」)と判断された (添付資料 [1])。

② 米国：新しい食品成分としての届出 (75-日市販前届出)

連邦食品医薬品化粧品法 (FD&CA) の第 413b 項および栄養補助食品健康教育法 (DSHEA) の第 8 項の要件に従い、Merck KgaA 社 (スイス) は栄養補助食品に用いるための新規の食品素材 (New Dietary Ingredient, NDI) として 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 75 日市販前届出書を提出した。この届出は米国食品医薬品庁 FDA のウェブサイト上で公開されている

(http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/dockets/95s0316/rpt0095_01.pdf)。

同届出書に添付された 2 つの専門家報告において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの

安全性、その生理的役割およびバイオアベイラビリティならびに生物学的有効性について、葉酸との同等性に関する主要なデータが要約されている（添付資料〔1〕、参考文献 72）。届出期間の終了日（2001 年 5 月 27 日）以降、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは米国においてダイエタリーサプリメントに合法的に使用されている。

③ ヨーロッパにおける状況：欧州食品安全委員会（EFSA）における評価

ヨーロッパにおいて 2006 年以前、食品の栄養強化およびサプリメントに用いることが認められているビタミン類は、それぞれ EC 指令の 2001/15/EC（特殊栄養用途食品）および 2002/46/EC（フードサプリメント）に記載されており、葉酸類としては葉酸（プテロイルモノグルタミン酸）のみであった。

欧州食品安全委員会（SCF）における葉酸に関する安全性評価は、1992 年に行なわれており（参考文献 68）、2000 年には 1 日摂取上限量を 1,000 $\mu\text{g}/\text{日}/\text{成人}$ とした。同委員会と同報告書において、「天然の還元型葉酸類の大量摂取に伴うリスクについての証拠は認められない。合成の葉酸および還元型葉酸塩類のいずれについても、体系的な毒性評価の報告或いは利用可能な毒性評価結果はない。葉酸の代替としての合成の還元型葉酸、即ち、メチル葉酸についての安全性および有効性についての更なる検討が必要である。」とした（添付資料〔2〕）。

そこで本要請者は 2003（平成 15）年 9 月、天然に存在するメチル葉酸のジアステレオ異性体のカルシウム塩である 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムについて、欧州食品安全機関（European Food Safety Authority：EFSA）による安全性評価のため資料を提出した。5-メチルテトラヒドロ葉酸は天然の葉酸類の主たる部分であり、従って食事より摂取される葉酸の主たるものであることから、EC 法 No.258/97 の新食品（Novel Foods）には該当せず、既存の EC 指令の 2001/15/EC および 2002/46/EC のビタミンリスト、および食品用の栄養素リスト DG SANCO/329/2003 に加えるよう要請した。

2004 年 10 月、欧州食品安全機関は、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの、特殊栄養用途食品、サプリメントおよび一般の食品における葉酸の給源としての使用は、許容摂取量上限値を 1,000 $\mu\text{g}/\text{日}/\text{成人}$ として、安全上問題ないと結論した（添付資料〔3〕）。

この評価結果を受けて、EC 委員会は 2006 年、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを 2001/15/EC（特殊栄養用途食品）および 2002/46/EC（フードサプリメント）の各ビタミンリストに記載することを決定した（添付資料〔4〕）。

④ FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）における評価

2005 年 6 月、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、同第 65 回会議において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの、食品への葉酸の給源としての使用は安全上問題ないと結論した（添付資料〔5〕）。

なお、JECFA においては葉酸の一日許容摂取量（ADI）を設定していない。JECFA における ADI の概念は食品添加物に対してのものであり栄養素には当てはまらないとされ、ビタミン等の栄養素については、無毒性量（NOAEL）あるいは許容摂取量上限値が該当する。即ち、NOAEL として 5mg/b.w./day、不確定係数（UF）5 を用い許容摂取量上限値を 1 mg/b.w./day としている。

⑤ 諸外国での使用状況や医薬品等としての使用実績

米国において、2001 年 Merck KgaA 社（スイス）が、栄養補助食品に用いるための新しい食品成分として 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 75 日市販前届出書を提出したが、それより先に、Badische Anilin & Soda Fabrik AG（BASF）と提携していた General Nutrition Corporation（GNC）はメチル葉酸カルシウムに関し、別の新しい食品成分としての届出を FDA に提出していた（参考文献 20）。ただし、GNC/BASF の製品は本要請書の主題である物質とは異なり、（6R）と（6S）ジアステレオ異性体をそれぞれ 50%ずつ含有するラセミ混合体である。GNC/BASF の届出は、同じく FDA のウェブサイト上で公開されている

（http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/dockets/95s0316/rpt0023_01.pdf）。

また、BASF 社のラセミ混合体製品は、高用量（15mg/day）を経口的または非経口的に投与する目的で、イタリアにおいて医薬品（商品名 Prefolic）として長年販売されている。

3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料

(1) 名 称

一般名：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (Calcium 5-Methyltetrahydrofolate)

この用語は、Medline、Biosis、Chemical Abstracts、Toxline および Pascal の文献検索による表題および抄録における 100 以上の科学文献において用いられている。その他以下の一般名が用いられている。

L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム [L-5-MTHF-Ca]

(6S)-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム [(6S)-5-MTHF-Ca]

(6S)-5-メチル-5,6,7,8-テトラヒドロプテロイル-L-グルタミン酸カルシウム

別名：L-5-メチル-テトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) (すなわち、陽イオンは規定されていない)

化学名 [CAS (Chemical Abstracts Service) に従っている。]：

N-{4-[[[(6S)-2-アミノ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-5-メチル-4-オキソ-6-プテリジニル)メチル]アミノ]ベンゾイル}-L-グルタミン酸カルシウム

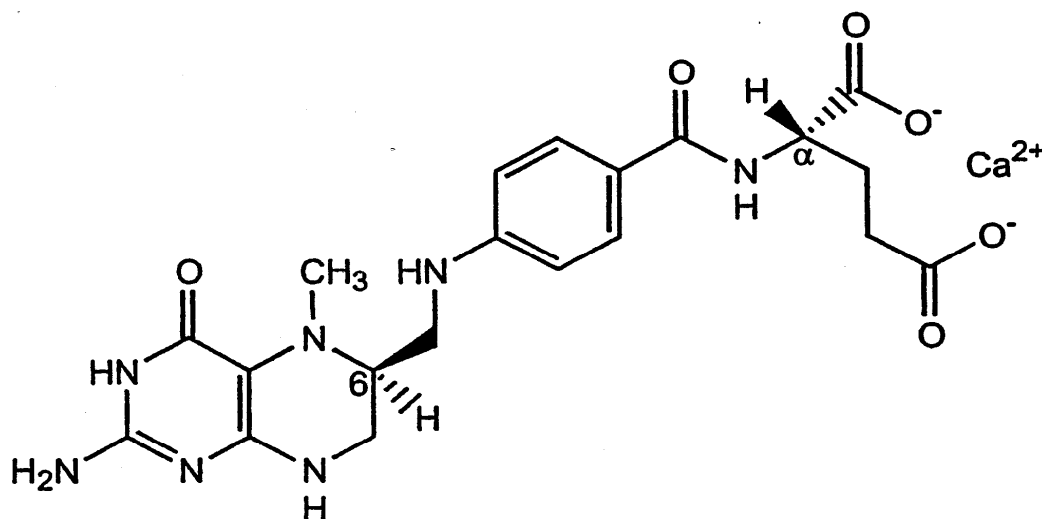
N-{4-[[[(6S)-2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahydro-5-methyl-4-oxo-6-pteridiny]methyl]amino]benzoyl}-L-glutamic acid, calcium salt

CAS 登録 No.：

151533 - 22 - 1 (L-5-MTHF/Ca²⁺の比率が 1:1 に規定されたカルシウム塩)

(2) 構造式又は示性式

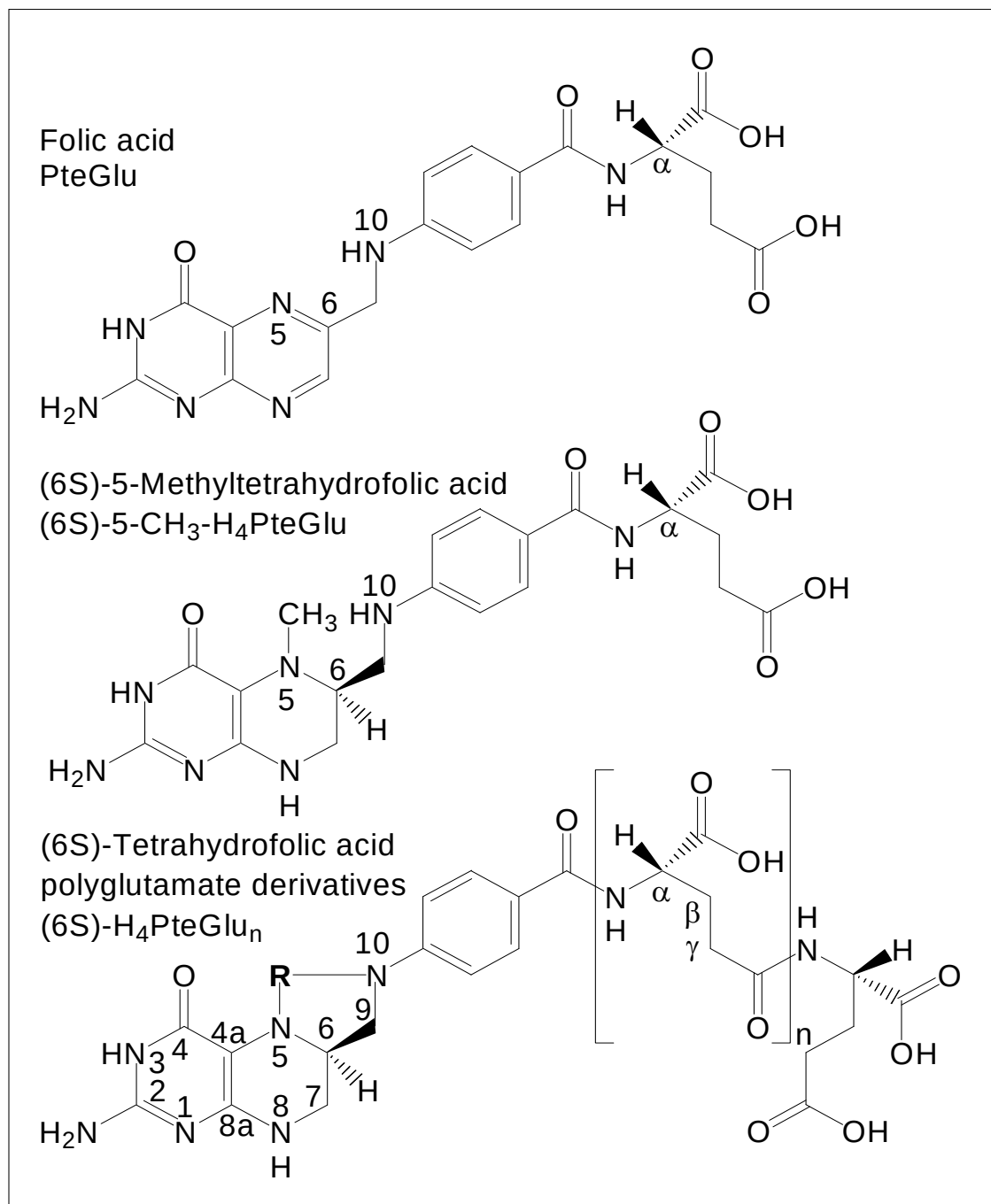
構造式：示性式および分子量は C₂₀H₂₃ Ca N₇O₆ = 497.5 (無水物として)



5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムには 2 つの不斉炭素原子があり、プテロイル部分の 6 位の C 原子と L-グルタミン酸部分の α -C 原子である (参考文献 27)。その結果、本化合物には 4 つのジアステレオ異性体: (6S, α S)、(6S, α R)、(6R, α S)、(6R, α R) が存在する可能性がある。テトラヒドロ葉酸およびその 5-置換誘導体の天然に生じる異性体は (6S, α S) – ジアステレオ異性体であるが、10-置換化合物と 5,10-橋状化合物の天然異性体は (6R, α S) – ジアステレオ異性体である。天然の 10-置換化合物と 5,10-橋状化合物の 6 位の C 原子の立体配置は天然に生じるテトラヒドロ葉酸と異ならないが、CIP (Cahn-Ingold-Prelog) 命名法によると、その立体配置は (6R) である。構造化学に関する混乱を避けるために、還元型葉酸の天然ジアステレオ異性体はすべて L-ジアステレオ異性体として定義し、非天然ジアステレオ異性体はすべて D-ジアステレオ異性体として定義することで一致している。

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの L-グルタミン酸部分の α -C 原子は出発物質の葉酸から生じ、その立体配置 (α S または L) は本指定要請者が用いた工程および本文書に記載した工程に従って 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを合成している間も変化しないままである。このため、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムにおける 2 つの不斉中心の立体配置はいずれも天然 L 型である。図 3-1 に、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの構造式を葉酸およびテトラヒドロ葉酸 (ポリグルタミン酸塩、即ち、天然型あるいは生体内での存在型) の構造式と比較する。

図 3-1 : 葉酸類の化学構造



Substituent (R)	Position	Chemical name
-CH ₃	5	(6S)-5-Methyltetrahydrofolic acid
-CHO	5	(6S)-5-Formyltetrahydrofolic acid
-CHO	10	(6R)-10-Formyltetrahydrofolic acid
-CH=NH	5	(6S)-5-Formiminotetrahydrofolic acid
-CH ₂ -	5 and 10	(6R)-5,10-Methylenetetrahydrofolic acid
-CH ⁺ =	5 and 10	(6R)-5,10-Methenyltetrahydrofolic acid

(3) 分子式及び分子量

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム： $C_{20}H_{23}CaN_7O_6$

分子量： 497.5 (無水物として)

(4) 含量規格

本品を乾燥したものは、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム 95.0 – 102.0%w/w を含む。

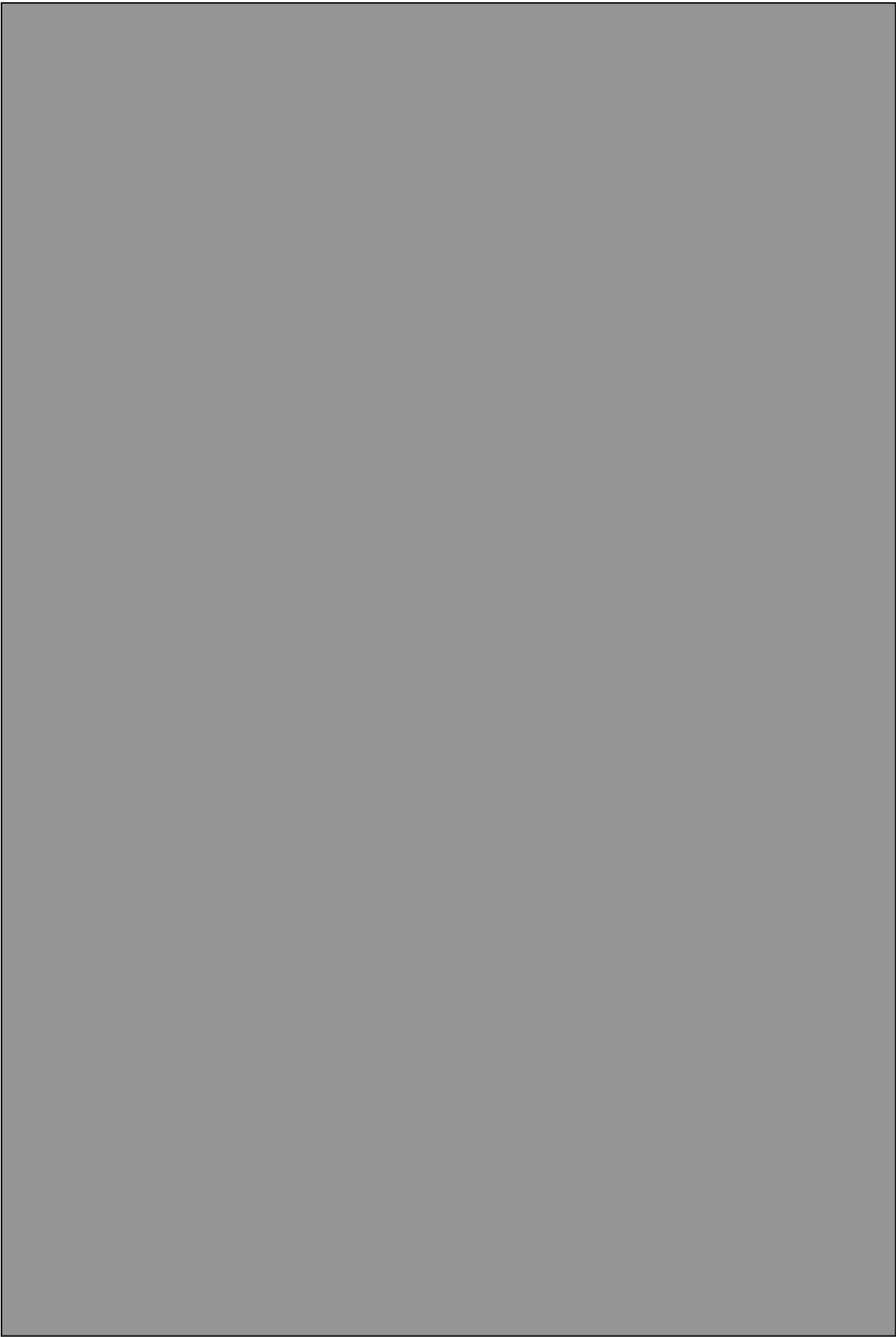
(5) 製造方法



工程管理

なお、適用した原料物質（葉酸）および製造過程で使用した化学物質の規格を添付資料〔6〕に、適用した工程管理を添付資料〔7〕に示した。

図 3-2： 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの製造工程のフローチャート



(6) 性 状

本品は、白色～淡黄色の結晶性粉末で、臭いはほとんどない。

(7) 確認試験

① 赤外吸光分析：

本品を臭化カリウム錠剤法により赤外吸収スペクトルを測定するとき、 3304 cm^{-1} 、 1588 cm^{-1} および 1338 cm^{-1} のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

② カルシウム：

本品 20 mg を酢酸〔酢酸 (98%) 30g→水 100 ml〕 5ml に加え、さらにフェロシアン化カリウム $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5.3g→水 100 ml〕 0.5ml を加えて混和した後、約 50 mg の塩化アンモニウムを加えると白色の結晶状沈澱物を生成する (Ph. Eur. 2.3.1)。

(8) 示性値

① 融点： 300℃以上 (分解)

② 比旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ ： +45.0～+50.0°

③ pH： 6.5～7.5 (本品 0.5g を量り、水を加えて 100ml とする)

(9) 純度試験

① その他の葉酸 (A)、関連物質 (B) および (C) (D-5-MTHF を除く)： 2.5%以下

② D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF の(6R)-ジアステレオ異性体) (C)： 1%以下

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムにおいては、以下の3種の不純物 (A、B 及び C) が識別されている。

(A) その他の葉酸、すなわち、葉酸 (PGA)、テトラヒドロ葉酸 (THF) および 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (図 3-3 A)。なお、テトラヒドロ葉酸 (THF) と 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸は食物中に天然に存在する (添付資料 [2])。

(B) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの分解および酸化産物、すなわち、4-アミノベンゾイルグルタミン酸、5-メチルテトラヒドロプテロイン酸、4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸、およびピラジノ-s-トリアジン誘導体 (図 3-3 B)。なお、分解産物の 4-アミノベンゾイルグルタミン酸、5-メチルテトラヒドロプテロイン酸、4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸も内生の葉酸分解の結果として食物中に検出されている (参考文献 9、23、24、65)。4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸は経口投与した葉酸の代謝物としてラットの尿中にも検出された (参考文献 4)。

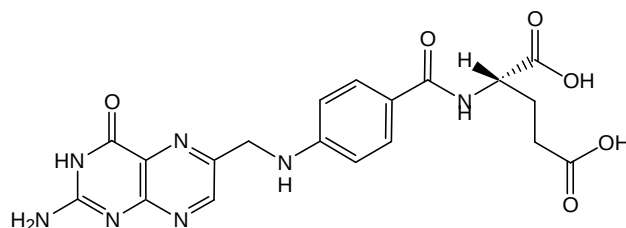
(C) その他の産物、すなわち、5-メチルテトラヒドロ葉酸の(6R)-ジアステレオ異性体 (D-5-MTHF) およびジメチル型テトラヒドロ葉酸 (図 3-3 C)。ただし、D-5-MTHF は L-5-MTHF のジアステレオ異性体のため、特に構造式では示していない。

図 3 - 3 A : 製造工程に伴う副生成物 (By-products of the production process)

Name	Structural formula	Typical levels found
------	--------------------	----------------------

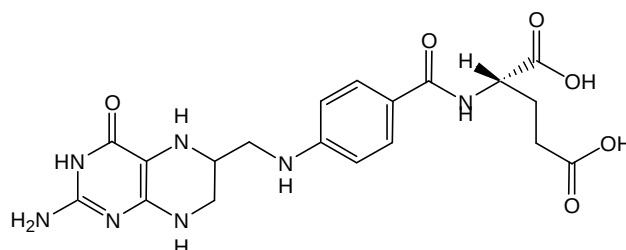
(A) Other folates (その他の葉酸)

Folic acid



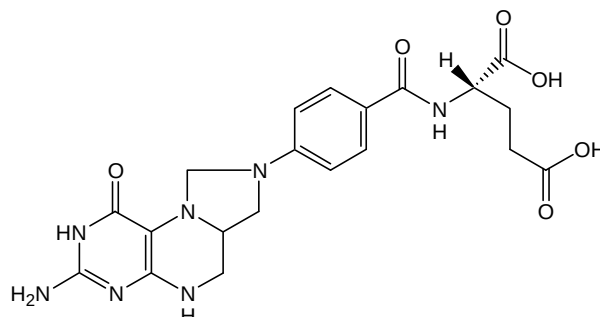
0.05%¹⁾

Tetrahydrofolic acid



0.01%¹⁾

5,10-Methylene-tetrahydrofolic acid



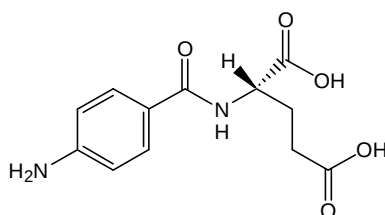
0.03%¹⁾

¹⁾ Limit of detection: 0.01%

図 3 - 3 B (続き)

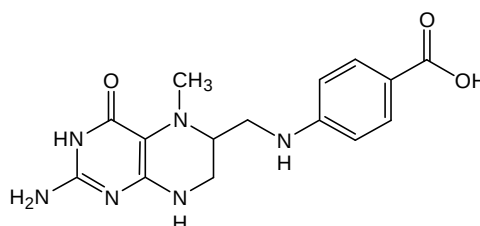
(B) Oxidation and degradation products without folate activity (葉酸活性の無い酸化或いは分解物)

4-Aminobenzoylglutamic acid



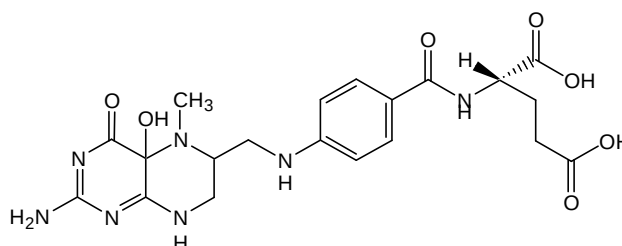
0.05%¹⁾

5-Methyltetrahydro-
pteroic acid



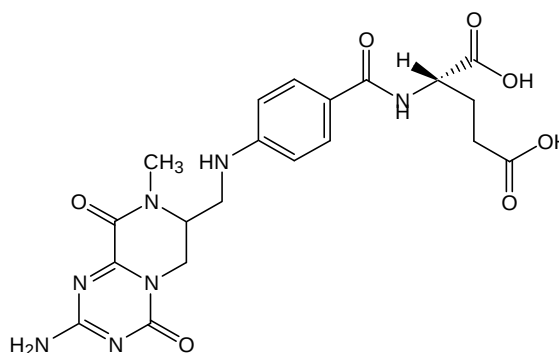
0.25%¹⁾

4 α -Hydroxy-5-methyl-
tetrahydrofolic acid



0.12%

Pyrazino-s-triazine
derivative²⁾



0.13%¹⁾

¹⁾ Limit of detection: 0.01%

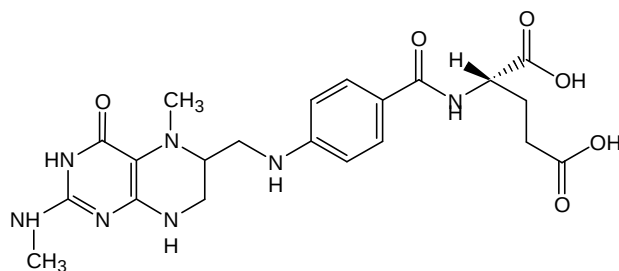
²⁾ 2-Amino-8-methyl-4,9-dioxo-7-methyl-p-aminobenzoylglutamate-6,7,8,9-tetrahydro-4H-pyrazino-(1,2-a)-s-triazine

図 3 - 3 C (続き)

(C) Others (ジメチルテトラヒドロ葉酸)

Dimethyltetrahydro-
folic acid

0.1%¹⁾



¹⁾ Limit of detection: 0.01%

その他の葉酸および関連物質および D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸の定量分析：

5 - メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム試験試料について、含まれるその他の葉酸および関連物質、および D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸を、2 種の異なる液体クロマトグラフィー条件によって定量する。最初の分析法 1) では、その他の葉酸および関連物質を、総 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (L - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸および D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸) から分離、定量する。次いで 2 つ目の分析法 2) で、2 つの光学異性体、すなわち L - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸と D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸を分離定量する。

1) その他の葉酸および関連物質の定量分析

その他の葉酸および関連物質を、総 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (L - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸および D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸) から分離、定量する。

標準品の調製： 約 50 mg の L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (L-5-MTHF-Ca ; Merck Eprova AG 標準品) を正確に秤量、100 ml のメスフラスコに入れ、少量の脱イオン水で溶解の後、標線まで水を加える。

試験試料の調製： 約 50 mg の試料を正確に秤量し、標準品と同様に調製する。

測 定 (注 1)：

カラム： Hypersil-ODS、5 μ m ; 250 x 4 mm (Thermo Hypersil Keystone または同等品)。なお、分析後、カラムはメタノール／水 (85:15) で洗い流し、同一の条件下で保管する。

移動相：
A： 7.80 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.05 mol) を 1000 ml の水に溶解し、32% の NaOH で pH を 6.5 に調整する。溶液を濾過して脱気する。
B： 5.07 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04 mol) を 650 ml の水と 350 ml のメタノール (LiChrosolv または同等品) に溶解する。32% NaOH で pH を 8.0 に調整する。溶液を濾過して脱気する。

流速： 1.1 ml/分

時間 (分)	%A	%B	注
0	100	0	開始時
0-14	100-45	0-55	線形勾配
14-17	45-0	55-100	線形勾配
17-22	0	100	維持
22-31	100	0	再調整

温度： 室温

注入量： 10 μ l

検出： UV (280 nm)

測定時間： 22 分

その他の葉酸および関連物質	保持時間
4-アミノベンゾイル・グルタミン酸 (ABGA)	約 3.1 分
4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (HOMeTHFA)	約 4.3 分
D-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (D-Mefox)	約 6.1 分
L-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (L-Mefox)	約 6.3 分
テトラヒドロ葉酸 (THFA)	約 8.5 分
7,8-ジヒドロ葉酸 (DHFA)	約 11.2 分

葉酸 (FA)	約 11.4 分
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (CH ₂ THFA)	約 11.7 分
5-メチルテトラヒドロ葉酸 (MeTHFA, 5-MTHF)	約 13.6 分
5-メチルテトラヒドロプテロイル酸 (MeTHPA)	約 15.1 分
N ² -メチルアミノ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (DiMeTHFA)	約 17.6 分

計 算： それぞれのその他の葉酸および関連物質（5-MTHF を除く）について、下記の計算式より Xi(%)を求め、それらの総和からその他の葉酸および関連物質（5-MTHF を除く）の総量を求める。

$$Xi(\%) = Ai \times Ws \times S \times Rfi / As \times W$$

Ai：それぞれのその他の葉酸および関連物質（5-MTHF を除く）のピーク面積

As：L-5-MTHF-Ca 標準品のピーク面積

Ws：L-5-MTHF-Ca 標準品の重量 (mg)

W：試験試料の重量 (mg)

S：L-5-MTHF-Ca 標準品中の L-5-MTHF の比率 (%)

Rfi：物質(i)の UV (280 nm) における 5-MTHF に対する応答因子。

応答因子 (RF)：

その他の葉酸および関連物質	RF
4-アミノベンゾイル・グルタミン酸 (ABGA)	0.93
4α-ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (HOMeTHFA)	1.11
D-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (D-Mefox)	1.11
L-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (L-Mefox)	1.11
テトラヒドロ葉酸 (THFA)	1.00
7,8-ジヒドロ葉酸 (DHFA)	0.98
葉酸 (FA)	0.86
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (CH ₂ THFA)	1.00
5-メチルテトラヒドロプテロイル酸 (MeTHPA)	0.68
N ² -メチルアミノ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (DiMeTHFA)	1.00

なお、上記以外の不純物質が認められた場合には、それらについては全て RF=1.00 を用いる。

(注1) システム適合性試験：

溶液 A：約 50 mg の ABGA、HOMeTHFA、L-Mefox、DHFA、FA、および MeTHPA を正確に秤量し、100 ml のメスフラスコに入れる。水（脱イオン水）と炭酸水素ナトリウムおよび炭酸ナトリウムを各々薬匙 1 杯ずつ加えて溶解し、次に標線まで水を加えて希釈する。

システム適合性試験溶液 (SST 溶液)： DiMeTHFA を含有する MeTHFA 試料約 50 mg を正確に秤量し、100 ml のメスフラスコに入れる。1 ml の溶液 A を加え、標線まで水を加えて溶解、希釈する。

システム適合性試験： 10 μl の SST 溶液を注入する。MeTHFA と MeTHPA の分解能は最低 5 でなければならない。

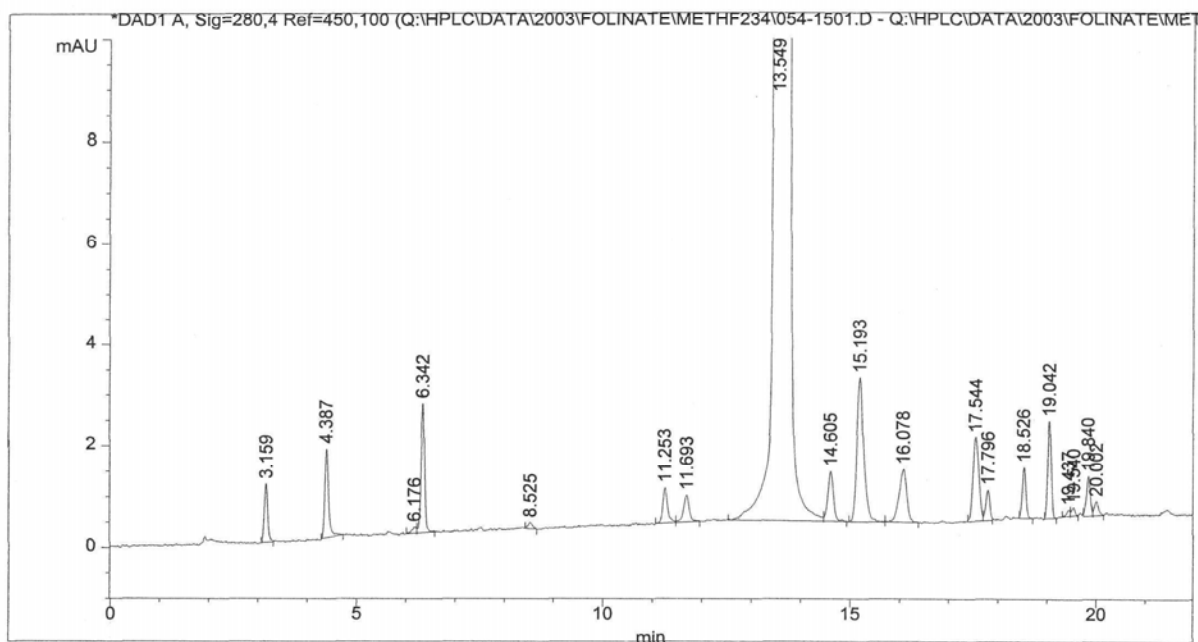
なお低レベルのこれらの不純物を示す典型的な HPLC クロマトグラムを次頁の図 3 - 4 に示した。

図 3 - 4 : 低レベルの不純物を示す典型的な HPLC クロマトグラム

HP-1100-III : Q:\HPLC\DATA\2003\FOLINATE\METHF234\054-1501.D

Page 1 of 1

Sample Name : LMCA-7422 Acquis.Operator : BS
 Sample Info : An:03-0323 nach dem Mahlen 1.Einw.
 Method Info : MeTHFS Gehalt mit ODS, 250*4mm, 5µm, 0820721H Thermo Hypersil-Keystone
 Method : METHF.M Start Temp. : 23.0 °C Injection Number : 1
 Inject.Time : 16:37:44 Start Press. : 124 bar Injection Volume : 10 µl
 Inject.Date : 12.02.2003 Start Flow : 1.10 ml/min Vial Number : 54



Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=450,100

No.	RT[min]	Type	Area[mAU*s]	Height[mAU]	Area %	Name
1	3.159	PB	5.7920	1.153	0.049	ABGA
2	4.387	MM	9.4606	1.757	0.079	HOME THFA
3	6.176	MF	0.7602	0.128	0.006	D-Mefox
4	6.342	FM	12.9410	2.549	0.108	L-Mefox
5	8.525	BP	0.8430	0.125	0.007	THFA
6	11.253	MF	4.8675	0.698	0.041	DHFA
7	0.000		0.0000	0.000	0.000	FA
8	11.693	FM	4.2917	0.529	0.036	CH2THFA
9	13.549	MF	11812.2998	1449.007	98.946	MeTHFA
10	14.605	FM	7.8095	0.981	0.065	
11	15.193	MF	27.8688	2.841	0.233	MeTHPA
12	16.078	FM	11.4012	1.038	0.096	
13	17.544	BV	13.8704	1.650	0.116	DiMeTHFA
14	17.796	MF	3.4934	0.602	0.029	
15	18.526	MM	5.2229	0.999	0.044	
16	19.042	BP	9.5980	1.908	0.080	
17	19.437	MF	0.6164	0.125	0.005	
18	19.540	FM	0.8120	0.172	0.007	
19	19.840	BV	4.4228	0.782	0.037	
20	20.002	VB	1.7316	0.279	0.015	

Integ.by: Me (Hans-Peter Meier)
 Printed : 18.02.2003 from Q:\HPLC\DATA\2003\FOLINATE\METHF234\054-1501.D\18103722.WIN
 Software: Rev. A.09.03 [1417] Copyright © Agilent Technologies

2) D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) の定量分析

2つの光学異性体、すなわち L - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸と D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸を分離定量する。

標準品の調製： 約 50 mg の L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (L-5-MTHF·Ca ; Merck Eprova AG 標準品) を正確に秤量、100 ml のメスフラスコに入れ、少量の脱イオン水で溶解の後、標線まで水を加える。

試験試料の調製： 約 50 mg の試料を正確に秤量し、標準品と同様に調製する。

測 定 (注 2)：

カラム： キラル HSA、5 μm、150 x 4 mm (ChromTech または同等品)
移動相： 970 ml の 0.03 M NaH₂PO₄ を 30 ml のアセトニトリル (LiChrosolv または同等品) と混合する。32% NaOH でこの溶液の pH を 6.8 に調整した後、濾過、脱気する。
流速： 1 ml/分
温度： 40℃
注入量： 10 μl
検出： UV (280 nm)
測定時間： 22 分
保持時間： L-5-MTHF 約 11 分
D-5-MTHF 約 15 分

計 算：

L - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) と D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) のピーク面積の総和 (A_T) に対する D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) のピーク面積 (A_D) の比率。

$$\text{D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) (\%)} = \frac{100 \times A_D}{A_T} \quad (\text{D})$$

(注 2) システム適合性試験：

システム適合性試験溶液 (SST 溶液)：

約 1.0 mg の HOMeTHFS、1.5 mg の ABGA、2.0 mg の L-Mefox および MeTHPS、3.0 mg の FA、4.0 mg の DHFA、10 mg の L,D-MeTHFA および D,D-MeTHFA (D グルタミン酸置換を伴う L-MeTHFA および D-MeTHFA) ならびに 50 mg のラセミ酸 MeTHFA (L-MeTHFA および L グルタミン酸置換を伴う L-MeTHFA) を正確に秤量して 200 ml のメスフラスコに入れ、適量の NaHCO₃ を加えて水で溶解し、標線まで水を満たす。

③ カルシウム： 7.0-8.5% (無水物換算)

約 500 mg の試料を正確に秤量して 150 ml の水に溶解し、20 ml の pH 10 緩衝液 (NH₃/NH₄Cl) を加える。薬匙 1 杯分のエリオクロムブラック T を加え、溶液に攪拌中しながら 0.1 M Titriplex 溶液または同等品 (EDTA) で滴定する。紫色から青／緑に変わった時点を終点とする。

計算： 1.0 ml の 0.1 M Titriplex (EDTA) は 4.008 mg のカルシウムに相当する。

$$\% \text{ Ca (無水・無溶媒)} = \frac{V \times F \times 4.008 \times 10000}{E \times (100 - \% \text{H}_2\text{O} - \% \text{EtOH})}$$

v = 0.1 M Titriplex (ml) の消費量
 F = 0.1 M Titriplex 溶液の換算係数
 E = 試料重量 (mg)
 % H₂O = 水分含有量 (%)
 % EtOH = エタノール含有量 (%)

④ ホウ素： 20 µg/g 以下

誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって測定する (添付資料 [8])。

⑤ 残留溶媒 (エタノール)： 0.5% 以下

装置

GLC： Agilent HP 6890 または同等品
 ヘッドスペースサンプラー： Agilent HP 7694 または同等品
 カラム： Optima-624、30 m、0.32 mm、3 µm または同等品
 ヘッドスペース用バイアル： 20 ml、PTFE/シリコン隔壁付ガラス製または同等品

試薬

脱イオン水
 メタノール；Merck p.a.または同等品
 エタノール；Synopharm または同等品
 アセトン；Merck p.a.または同等品
 2-プロパノール；Merck p.a.または同等品
 n-プロパノール；Merck p.a.または同等品
 クエン酸三ナトリウム二水和物；Merck p.a.または同等品

パラメータ クロマトグラフィ

分配比： 1 : 5
 注入温度： 180°C
 キャリアガス： ヘリウム、1.4 ml/分 定流量
 オープン温度： 40°C 0°C/分 40°C 8 分
 40°C 30°C/分 100°C 1 分
 ポストラン 200°C 5 分
 検出温度： 320°C

パラメータ ヘッドスペース法

オープン温度： 80°C
 ループ温度： 110°C
 トランスファーライン温度： 130°C
 バイアル平衡時間： 10 分
 バイアル加圧時間： 0.10 分
 ループ充填時間： 0.20 分
 ループ容量： 3 ml

ループ平衡時間： 0.05 分
試料注入時間： 1.50 分
振盪： 低速
バイアルの圧力： 55 kPa
キャリアー流量： 約 27 ml (175 kPa)

溶液の調製：

希釈溶液：5 g のクエン酸三ナトリウム二水和物を 100 ml の脱イオン水に溶解する。

内部標準溶液 1 (ISTD 1)：

1.0 ml の n-プロパノールに 100 ml の希釈溶液を加える => 溶液 A。

溶液 A を希釈溶液で 1 : 100 に希釈する。

内部標準溶液 2 (ISTD 2)：

溶液 A (ISTD 1 参照) を、希釈溶液を用いて 1 : 50 に希釈する。

アルコール標準溶液 1：

15.0* ml のメタノール、アセトン、および 2-プロパノールに希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。
得られた溶液を希釈液で 1 : 25 に希釈する。*：濃度を考慮すること。

アルコール標準溶液 2：

2.5* ml のエタノールに希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。*：濃度を考慮すること。

標準溶液 (STD)：

3.0 ml の保存溶液 1 と 1.0 ml の保存溶液 2 に希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。得られた溶液 5.0 ml と 5.0 ml の ISTD 2 液をヘッドスペース用バイアルに入れ、バイアルを密封する。

試験試料溶液：

250 mg の試料を正確に秤量してヘッドスペース用バイアルに入れ、10.0 ml の ISTD 1 を加えてバイアルを密封する。

保持時間：

メタノール	約 3.9 分
エタノール	約 5.4 分
アセトン	約 6.3 分
2-プロパノール	約 6.8 分
n-プロパノール	約 9.4 分

計算：

N-プロパノールを内部標準とし、各種アルコールの保持時間からアルコールの種類を特定し、希釈係数を用いてエタノールの濃度を算出する。

⑥ 重金属： 20 µg/g 以下

現行 USP <231>、Method II にしたがって灰化（硫酸灰化法）した後に測定。

(10) 乾燥減量、強熱減量又は水分： 17.0%以下（直接滴定）

水分含有量は Karl Fischer 法で測定する。メタノールを溶媒として用い、抽出時間は 15 分。

(11) 強熱残分（強熱残留物）： カルシウムとして 7.0-8.5%（無水物換算）

純度試験のカルシウムの項参照。

(12) 定量法

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（L-5-MTHF-Ca）の含有量（%）は、純度試験の項で求めたその他の葉酸および関連物質、および D-5-メチルテトラヒドロ葉酸の定量分析値（%）を用い、水分補正を行ない以下の式によって求める。

$$\text{L-5-MTHF-Ca (\%)} = 100 \times A_T \times W_s \times S (100-D) \times 1.083 / A_s \times W \times (100-H_2O\%)$$

A_T : L-5-メチルテトラヒドロ葉酸（L-5-MTHF）と D-5-メチルテトラヒドロ葉酸（D-5-MTHF）のピーク面積の総和

D : D-5-メチルテトラヒドロ葉酸（D-5-MTHF）の試験試料中の比率（%）

A_s : L-5-MTHF-Ca 標準品のピーク面積

W_s : L-5-MTHF-Ca 標準品の重量（mg）

W : 試験試料の重量（mg）

S : L-5-MTHF-Ca 標準品中の L-5-MTHF の比率（%）

$H_2O\%$: 試験試料中の水分含量（%）

1.083 : 5-MTHF に対する 5-MTHF-Ca の比率（497.5/459.5）

なお、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの代表的バッチの分析結果を表 3-1 に示す。

表 3-1：5-メチルテトラヒドロ葉酸の代表的バッチの分析結果

Variable	Specification	Batch No				
		LMCA-011 ^{a)}	LMCA-7077 ^{a)}	LMCA-7078 ^{a)}	LMCA-7079 ^{a)}	LMCA-7422
Assay	95.0-102.0% (d.s.)	97.1	97.2	98.6	99.2	100.6
Other folates and related compounds	≤ 2.5% (d.s.)	1.26	0.85	0.66	0.73	0.87
D-5-MTHF-Ca (unnatural isomer)	≤ 1% (d.s.)	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4
Water	≤ 17.0%	16.3	14.9	13.6	14.5	12.6
Calcium	7.0-8.5% (d.s.)	8.3	8.1	8.2	8.3	8.2
Ethanol	≤ 0.5%	< 0.1	< 0.1	0.11	0.25	< 0.1
Heavy metals	≤ 20 ppm	≤ 20 ^{b)}	≤ 20 ^{b)}	≤ 20 ^{b)}	≤ 20 ^{b)}	≤ 20 ^{b)}
Boron	≤ 20 ppm	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Total viable aerobic counts	≤ 1000 CFU/g	< 10	< 10	< 10	< 10	n.d.
a) The production process of those batches includes recrystallisation of (6S)-tetrahydrofolic acid benzenesulfonate.						
b) Limit test						
Abbreviations: d.s. = dry substance, n.d. = not determined						

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 5 つの代表的バッチを分析することによって、規格

案に従っていることを証明する（表 3 - 1）。データから、製品の純度および成分が高度に一貫している安定した製造工程が示唆される。

(13) 食品添加物の安定性

主にテトラヒドロ葉酸（THF）として還元型で生じる天然葉酸は容易に酸化される。しかしながら、一炭素置換基（すなわち、ホルミル基のメチル）、特に電子求引基（すなわち、ホルミル基）または N-5 位のプロトン付加によって安定性はある程度改善する。従って本品、5-メチルテトラヒドロ葉酸は、食品の加工および種々の保存条件下で安定である。

5-メチルテトラヒドロ葉酸は結晶型で安定であるが、溶液中で容易に酸化される。最初の酸化段階において、L-5-メチル-5,6-ジヒドロ葉酸、L-5-メチル-5,8-ジヒドロ葉酸、および 4α-ヒドロキシ-5-メチル-5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸が生成される。L-5-メチル-5,6-ジヒドロ葉酸は生体内において再び L-5-MTHF に還元されるため、なお葉酸（ビタミン）活性を示す。しかしながら、L-5-メチル-5,8-ジヒドロ葉酸および 4α-ヒドロキシ-5-メチル-5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸は、さらなる酸化によってプテロイル酸ヘテロ環の不可逆性化学転位が生じ（参考文献 9、40、65）、生じたピラジノ-s-トリアジン誘導体（L-Mefox）に葉酸（ビタミン）活性はない（参考文献 43）。

天然還元型葉酸（THF）が酸化され易いことを考えると、調理中（参考文献 31、47、92）、または環境温度で保存中（参考文献 1）であっても食品中の葉酸含量が実質的に減少することはあり得る。

モデル系における結晶 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの安定性

医薬品規制のハーモナイゼーション国際会議（ICH）のガイドラインに従って、純粋な 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの安定性に関する試験を行った。HPLC 法を用いて試験物質と生成されると考えられる分解産物を定量した。

結晶 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 8 つのバッチを異なる温度条件下（最高 40℃）および相対湿度条件下（最高 75%）で最長 48 か月間保存した。5-メチルテトラヒドロ葉酸はこれらの条件下できわめて安定であることが認められた（表 3 - 2）。観察期間（主に最初の 3 か月間）中に 4-アミノベンゾイルグルタミン酸、ピラジノ-s-トリアジン製品（L-Mefox）および葉酸はわずかに増加したが、他の識別された 5-メチルテトラヒドロ葉酸の副産物は増加しなかった。なお、詳細な分析結果は添付資料 [9] に示した。

結晶、超微粉 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（粒子径 < 100 μm）を最高 40℃および 75%の相対湿度で 12 か月間保存したところ、本質的に同じ結果が得られた（添付資料 [10]）。超微粉粒子の試験の結果から、表面積が大きくなることによって安定性が低下するということはなかった。

表 3 - 2：各種の温度、湿度条件下における 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（結晶）の安定性試験 1)

Storage time months	% L-5-MTHF·Ca ²⁺			
	25°C (60% r.h.)	40°C (75% r.h.)	5°C (hum. not spec.)	-20°C (hum. not spec.)
0	99.2	99.2	99.2	99.2
3	97.6	96.9	98.8	n.d.
6	98.7	98.3	99.6	n.d.
9	97.6	96.7	98.1	n.d.
12	97.5	97.3	98.6	98.5
18	98.1	n.d.	98.8	n.d.
24	97.9	n.d.	99.3	99.4
36	98.9	n.d.	98.8	99.6

48	98.7	n.d.	99.3	100.1
1) Batch LMCA-7079 was used for this study.				
2) Determined by HPLC as described for "Assay" in Specifications				
Abbreviations: r.h. = relative humidity; n.d. = not determined				

(14) 食品中の食品添加物の分析法

天然の葉酸は、ポリグルタミン側鎖におけるグルタミン酸残基の数（一般的には1～7個のグルタミン酸残基）、N-5 または N-10 位においてそれらが運搬する一炭素基、およびそれらの酸化状態によってそれぞれ異なっている。この異質性のために、その特異的な化学構造にもかかわらず、食物中の葉酸の分析は伝統的に微生物学的に活性な葉酸（葉酸換算値で表される）をすべて捕捉する微生物検査に頼っている（しかしながら、前もって加水分解しない限り、ポリグルタミン酸型は *Lactobacillus casei* によって容易に利用されないことには注意が必要である）。しかしながら、微生物分析は時間がかかるため、最近、5-メチルテトラヒドロ葉酸を含む葉酸類に属する異なる葉酸を特異的に検出する HPLC 法も開発されている（参考文献 44、57、76）。ただし、HPLC 法における試料の調整に適用しなければならない抽出手順と精製手順は、この方法の実行には不可欠である。適切に行われない場合、酸化的分解により生物学的に活性な葉酸が喪失する可能性がある。

微生物分析を適用している実験室間において、微生物試験における混合野菜の葉酸含量と HPLC による定量を比較することによって 2 つの方法間の差が証明されている（参考文献 41）。平均すると、HPLC によって検出された葉酸の合計は分析した混合野菜において微生物学的に測定した葉酸の約 73% であった。しかし、HPLC によって検出された 5-メチルテトラヒドロ葉酸の含量について、6 つの参加実験室間の差は約 ±10% にとどまった（1 つの追加の実験室からきわめて低い値が得られたが、これは純粋に技術的な問題であった）。

葉酸の異なる分析法の長所と短所に関して議論が続いているが、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムならびに天然の L-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF)、または添加した葉酸が微生物分析や HPLC によって同等によく定量できる。一般的に葉酸の微生物分析において試験株として用いられる *Lactobacillus casei* の増殖反応は L-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) と葉酸とで殆ど同じである（参考文献 64）。このため、既存の微生物分析は添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを分析するために用いることが出来る。L-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) は主要な型の天然葉酸であるため、これを検出するためにすでにデザインされている既存 HPLC 法のすべてに同じことがあてはまる。

食品中の葉酸の分析に際して考慮すべき点は、一つは添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸であり、もう一方は食品由来の葉酸およびその関連化合物である。食品の栄養表示あるいは栄養成分表示という視点から考えた場合、当該食品に含まれる葉酸の総量を表示すべきであるという点を考慮し、食品中の葉酸は、*Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いる微生物定量法により定量することが望ましい。食品中には添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸以外に、素材由来の葉酸およびその関連化合物が含まれている場合もある。従って、試験検体中にこれらの素材を含む場合には、葉酸の定量値は添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸と素材由来の葉酸およびその関連化合物との合計値となる（食品中の食品添加物分析法解説書：添付資料 [11]）。

(15) 成分規格案の設定根拠

成分規格(案)は、葉酸の食品添加物規格(添付資料[12])に準じ、本品の製造元、欧州 Commission Directives および JECFA における規格(添付資料 [13])を基に設定した。なお、それら規格の比較表を次頁に示す。

成分規格の比較表

成分規格項目	「5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム」の成分規格案	EU (Commission Directives)	JECFA	「葉酸」規格
含 量	本品を乾燥したものは、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム 95.0 - 102.0 %を含む。	95.0 - 102.0 % (無水物換算)	95.0 - 102.0 % (無水物換算)	本品は、葉酸 98.0 ~ 102.0 % を含む。
性 状	本品は、白色～淡黄色の結晶性粉末で、臭いはほとんどない。	白色から淡黄色をおびた結晶状の粉末。	白色から淡黄色をおび、臭いはほとんどない結晶状の粉末。	本品は、黄～だいたい黄色の結晶性粉末で、においがいい。
溶解性			水にやや溶け易く、有機溶媒には極僅かまたは殆んど溶けない。アルカリ溶液に溶けやすい。	
確認試験				本品 1.5mg に水酸化ナトリウム溶液 (1→250) を加えて溶かし、100ml とした液は、波長 255 ~ 257、281 ~ 285 及び 361 ~ 369nm に極大吸収部がある。
赤外吸光分析	本品を臭化カリウム錠剤法により赤外吸収スペクトルを測定するとき、3304、1588、および 1338 cm ⁻¹ で特徴的なピークを示す。	3304、1588、および 1338 cm ⁻¹ で特徴的なピークを示す。	臭化カリウム法により赤外吸収スペクトルを測定するとき、標準品に準拠する。	
カルシウム	確認試験により、白色の結晶状沈殿物を生成する。	検定試験により陽性を示す。	確認試験により、白色の結晶状沈殿物を生成する。	
高速液体クロマトグラフ		標準品に準拠する。	標準品に準拠する。	
純度試験				遊離アミン：1.0%以下
その他の葉酸および関連物質	2.5 %以下	2.5 %以下	2.5 %以下	
D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (光学異性体)	1.0 %以下	1.0 %以下	1.0 %以下	
カルシウム	7.0 - 8.5 % (無水物換算)	7.0 - 8.5 % (無水物換算)	7.0 - 8.5 % (無水物換算)	
ホウ素	20 µg/g	20 mg/kg		
残留溶媒 (エタノール)	0.5 % 以下	0.5 % 以下		
重金属	20 µg/g	20 mg/kg	鉛：2 mg/kg 以下	
水 分	17.0 %以下	17.0 %以下	17.0 %以下	8.5%以下
強熱残分	カルシウムとして 7.0 - 8.5 % (無水物換算)			0.50%以下
一般生菌数		1,000 CFU/g	1,000 CFU/g	
定量法	純度試験で求めた「その他の葉酸および関連物質」および「D-5-メチルテトラヒドロ葉酸」を用い、水分補正を行い求める。	純度試験で求めた「その他の葉酸および関連物質」および「D-5-メチルテトラヒドロ葉酸」を用い、水分補正を行い求める。	純度試験で求めた「その他の葉酸および関連物質」および「D-5-メチルテトラヒドロ葉酸」を用い、水分補正を行い求める。	日本食品添加物規格「葉酸」定量法

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの規格（案）

含 量：本品を乾燥したものは、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム 95.0 – 102.0%w/w を含む。

性 状：本品は、白色～淡黄色の結晶性粉末で、臭いはほとんどない。

確認試験：

（１）赤外吸光分析：

本品を臭化カリウム錠剤法により赤外吸収スペクトルを測定するとき、 3304 cm^{-1} 、 1588 cm^{-1} および 1338 cm^{-1} のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

（２）カルシウム：

本品 20 mg を酢酸〔酢酸（98%）30g→水 100 ml〕 5ml に加え、さらにフェロシアン化カリウム〔 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5.3g→水 100 ml〕 0.5ml を加えて混和した後、約 50 mg の塩化アンモニウムを加えるとき白色の結晶状沈澱物を生成する（Ph. Eur. 2.3.1）。

純度試験：

（１）その他の葉酸および関連物質： 2.5%以下

本品および L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム標準品約 50 mg ずつを正確に秤量、100 ml のメスフラスコに入れ、少量の脱イオン水で溶解の後、標線まで水を加える。試料調整後直ちに、以下の測定条件に従い、それぞれ高速液体クロマトグラフィーを実施し、下記の計算式によりその他の葉酸および関連物質の量を求める。

測定条件：

カラム： Hypersil-ODS、 $5\text{ }\mu\text{m}$ ；250 x 4 mm（Thermo Hypersil Keystone または同等品）。なお、分析後、カラムはメタノール／水（85:15）で洗い流し、同一の条件下で保管する。

移動相： A： 7.80 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ （0.05 mol）を 1000 ml の水に溶解し、32% の NaOH で pH を 6.5 に調整する。溶液を濾過して脱気する。

B： 5.07 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ （0.04 mol）を 650 ml の水と 350 ml のメタノール（LiChrosolv または同等品）に溶解する。32% NaOH で pH を 8.0 に調整する。溶液を濾過して脱気する。

流速： 1.1 ml/分

勾配：	時間（分）	%A	%B	注
	0	100	0	開始時
	0-14	100-45	0-55	線形勾配
	14-17	45-0	55-100	線形勾配
	17-22	0	100	維持
	22-31	100	0	再調整

温度： 室温

注入量： 10 μl

検出： UV (280 nm)
 測定時間： 22 分
 保持時間：

その他の葉酸および関連物質	保持時間
4-アミノベンゾイル・グルタミン酸 (ABGA)	約 3.1 分
4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (HOMeTHFA)	約 4.3 分
D-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (D-Mefox)	約 6.1 分
L-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (L-Mefox)	約 6.3 分
テトラヒドロ葉酸 (THFA)	約 8.5 分
7,8-ジヒドロ葉酸 (DHFA)	約 11.2 分
葉酸 (FA)	約 11.4 分
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (CH ₂ THFA)	約 11.7 分
5-メチルテトラヒドロ葉酸 (MeTHFA, 5-MTHF)	約 13.6 分
5-メチルテトラヒドロプテロイル酸 (MeTHPA)	約 15.1 分
N ² -メチルアミノ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (DiMeTHFA)	約 17.6 分

計 算： それぞれのその他の葉酸および関連物質 (5-MTHF を除く) について、下記の計算式より Xi(%)を求め、それらの総和からその他の葉酸および関連物質 (5-MTHF を除く) の総量を求める。

$$Xi (\%) = Ai \times Ws \times S \times Rfi / As \times W$$

Ai：それぞれのその他の葉酸および関連物質 (5-MTHF を除く) のピーク面積

As：L-5-MTHF-Ca 標準品のピーク面積

Ws：L-5-MTHF-Ca 標準品の重量 (mg)

W：試験試料の重量 (mg)

S：L-5-MTHF-Ca 標準品中の L-5-MTHF の比率 (%)

Rfi：物質(i)の UV (280 nm) における 5-MTHF に対する応答因子。

応答因子 (RF)：

その他の葉酸および関連物質	RF
4-アミノベンゾイル・グルタミン酸 (ABGA)	0.93
4 α -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (HOMeTHFA)	1.11
D-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (D-Mefox)	1.11
L-ピラジノ-s-トリアジン誘導体 (L-Mefox)	1.11
テトラヒドロ葉酸 (THFA)	1.00
7,8-ジヒドロ葉酸 (DHFA)	0.98
葉酸 (FA)	0.86
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (CH ₂ THFA)	1.00
5-メチルテトラヒドロプテロイル酸 (MeTHPA)	0.68
N ² -メチルアミノ-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (DiMeTHFA)	1.00

なお、上記以外の不純物質が認められた場合には、それらについては全て RF=1.00 を用いる。

(2) D - 5 - メチルテトラヒドロ葉酸： 1%以下

本品および L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム標準品約 50 mg ずつを正確に秤量、100 ml

のメスフラスコに入れ、少量の脱イオン水で溶解の後、標線まで水を加える。試料調整後直ちに、以下の測定条件に従い、それぞれ高速液体クロマトグラフィーを実施し、下記の計算式により **D-5-メチルテトラヒドロ葉酸** の量を求める。

測定条件：

カラム：キラル HSA、5 μ m、150 x 4 mm (ChromTech または同等品)
 移動相：970 ml の 0.03 M NaH_2PO_4 を 30 ml のアセトニトリル (LiChrosolv または同等品) と混合する。32% NaOH でこの溶液の pH を 6.8 に調整した後、濾過、脱気する。
 流速：1 ml/分
 温度：40℃
 注入量：10 μ l
 検出：UV (280 nm)
 測定時間：22 分
 保持時間：L-5-MTHF 約 11 分
 D-5-MTHF 約 15 分

計 算：

L-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) と D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) のピーク面積の総和 (A_T) に対する D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) のピーク面積 (A_D) の比率。

$$\underline{\text{D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) (\%)}} = \underline{100 \times A_D / A_T} \quad (\text{D})$$

(3) カルシウム： 7.0-8.5% (無水物換算)

約 500 mg の試料を正確に秤量して 150 ml の水に溶解し、20 ml の pH 10 緩衝液 ($\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$) を加える。薬匙 1 杯分のエリオクロムブラック T を加え、溶液に攪拌中しながら 0.1 M Titriplex 溶液または同等品 (EDTA) で滴定する。紫色から青／緑に変わった時点を終点とする。

計算： 1.0 ml の 0.1 M Titriplex (EDTA) は 4.008 mg のカルシウムに相当する。

$$\underline{\% \text{Ca (無水・無溶媒)}} = \frac{V \times F \times 4.008 \times 10000}{E \times (100 - \% \text{H}_2\text{O} - \% \text{EtOH})}$$

v = 0.1 M Titriplex (ml) の消費量
 F = 0.1 M Titriplex 溶液の換算係数
 E = 試料重量 (mg)
 % H_2O = 水分含有量 (%)
 % EtOH = エタノール含有量 (%)

(4) ホウ素： 20 $\mu\text{g/g}$ 以下

誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって測定する (添付資料 [8])。

(5) 残留溶媒 (エタノール) : 0.5% 以下

装置

GLC : Agilent HP 6890 または同等品
ヘッドスペースサンプラー : Agilent HP 7694 または同等品
カラム : Optima-624、30 m、0.32 mm、3 μ m または同等品
ヘッドスペース用バイアル : 20 ml、PTFE/シリコン隔壁付ガラス製または同等品

試薬

脱イオン水
メタノール ; Merck p.a. または同等品
エタノール ; Synopharm または同等品
アセトン ; Merck p.a. または同等品
2-プロパノール ; Merck p.a. または同等品
n-プロパノール ; Merck p.a. または同等品
クエン酸三ナトリウム二水和物 ; Merck p.a. または同等品

パラメータ クロマトグラフィ

分配比 :	1 : 5			
注入温度 :	180°C			
キャリアガス :	ヘリウム、1.4 ml/分	定流量		
オーブン温度 :	40°C	0°C/分	40°C	8 分
	40°C	30°C/分	100°C	1 分
		ポストラン	200°C	5 分
検出温度 :	320°C			

パラメータ ヘッドスペース法

オーブン温度 :	80°C
ループ温度 :	110°C
トランスファーライン温度 :	130°C
バイアル平衡時間 :	10 分
バイアル加圧時間 :	0.10 分
ループ充填時間 :	0.20 分
ループ容量 :	3 ml
ループ平衡時間 :	0.05 分
試料注入時間 :	1.50 分
振盪 :	低速
バイアルの圧力 :	55 kPa
キャリア流量 :	約 27 ml (175 kPa)

溶液の調製 :

希釈溶液 : 5 g のクエン酸三ナトリウム二水和物を 100 ml の脱イオン水に溶解する。

内部標準溶液 1 (ISTD 1) :

1.0 ml の n-プロパノールに 100 ml の希釈溶液を加える => 溶液 A。溶液 A を希釈溶液で 1:100

に希釈する。

内部標準溶液 2 (ISTD 2) :

溶液 A (ISTD 1 参照) を希釈溶液を用いて 1 : 50 に希釈する。

アルコール標準溶液 1 :

15.0* ml のメタノール、アセトン、および 2-プロパノールに希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。得られた溶液を希釈液で 1 : 25 に希釈する。: *濃度を考慮すること。

アルコール標準溶液 2 :

2.5* ml のエタノールに希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。: *濃度を考慮すること。

標準溶液 (STD) :

3.0 ml の保存溶液 1 と 1.0 ml の保存溶液 2 に希釈溶液を加えて 100.0 ml とする。得られた溶液 5.0 ml と 5.0 ml の ISTD 2 液をヘッドスペース用バイアルに入れ、バイアルを密封する。

試験試料溶液 :

250 mg の試料を正確に秤量してヘッドスペース用バイアルに入れ、10.0 ml の ISTD 1 を加えてバイアルを密封する。

保持時間 :

メタノール	約 3.9 分
エタノール	約 5.4 分
アセトン	約 6.3 分
2-プロパノール	約 6.8 分
n-プロパノール	約 9.4 分

計算 : N-プロパノールを内部標準とし、各種アルコールの保持時間からアルコールの種類を特定し、希釈係数を用いてエタノールの濃度を算出する。

(6) 重金属 : 20 $\mu\text{g/g}$ 以下

現行 USP <231>、Method II にしたがって灰化 (硫酸灰化法) した後に測定。

(7) 乾燥減量、強熱減量又は水分 : 17.0%以下 (直接滴定)

水分含有量は Karl Fischer 法で測定する。メタノールを溶媒として用い、抽出時間は 15 分。

(8) 強熱残分 (強熱残留物) : カルシウムとして 7.0-8.5% (無水物換算)

純度試験のカルシウムの項参照。

(9) 定量法

5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF-Ca) の含有量 (%) は、純度試験の項で求めたその

他の葉酸および関連物質、および D-5-メチルテトラヒドロ葉酸の定量分析値 (%) を用い、水分補正を行ない以下の式によって求める。

$$\text{L-5-MTHF-Ca (\%)} = 100 \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{W_S}{W} \times \frac{S}{100-D} \times \frac{1.083}{100-H_2O\%}$$

- A_T : L-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (L-5-MTHF) と D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) のピーク面積の総和
 D : D-5-メチルテトラヒドロ葉酸 (D-5-MTHF) の試験試料中の比率 (%)
 A_S : L-5-MTHF-Ca 標準品のピーク面積
 W_S : L-5-MTHF-Ca 標準品の重量 (mg)
 W : 試験試料の重量 (mg)
 S : L-5-MTHF-Ca 標準品中の L-5-MTHF の比率 (%)
 $H_2O\%$: 試験試料中の水分含量 (%)
 1.083 : 5-MTHF に対する 5-MTHF-Ca の比率 (497.5/459.5)

4. 有効性に関する資料

(1) 食品添加物としての有効性及び他の同種の添加物との効果の比較

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムには、葉酸と比較し、以下の長所が認められる（参考文献 30、69）。

① 5-メチルテトラヒドロ葉酸は多くの食品中の主な天然型葉酸

食品中の種々の葉酸の分布に関するデータは限られている。しかしながら、入手したデータによって、5-メチルテトラヒドロ葉酸が食品に見出された総葉酸活性の大部分を占めることが明らかにされている（参考文献 45）。葉酸の1日摂取量に大きく寄与する一部の食物（たとえば、オレンジ ジュース、卵黄、キャベツ、レタス等）では、5-メチルテトラヒドロ葉酸のみが存在する。5-メチルテトラヒドロ葉酸は食品中に生じる天然葉酸化合物のうちの主な還元型の葉酸であり、一炭素単位の転移、酸化および還元の際に補酵素として機能している。5-メチルテトラヒドロ葉酸のモノグルタミン酸塩も循環血液に見出される主な型の葉酸である。従って、以上のことから5-メチルテトラヒドロ葉酸は食品中に生じる天然葉酸化合物のうちの主な還元型の葉酸であることが明らかである（表 4-1）。5-メチルテトラヒドロ葉酸は、天然に生じる葉酸の本質的な型でもあり、その型でヒトの身体中に貯えられる。従ってこの事実から、この天然型葉酸、すなわち5-メチルテトラヒドロ葉酸の有効性が十分に推論される（参考文献 69）。

表 4-1：葉酸を添加していない一般食品中の総葉酸量および5-メチルテトラヒドロ葉酸含有量

食品（群）：（）内は試験した食品数	総葉酸量（HPLC）	総葉酸量中の5-メチルテトラヒドロ葉酸の割合（%）	参考文献
白パン	21.3±0.69 μg/100g	22.5 %	参考文献 59
小麦パン	29.8±1.94 μg/100g	11 %	
白米	10.8±0.57 μg/100g	34.9 %	
スパゲティ	22.3±1.77 μg/100g	12.7 %	
オレンジ ジュース	0.23-0.40 μg/ml	100 %	参考文献 22 参考文献 91
野菜、果物製品（49）	10-187 μg/100g	70 %（平均）	参考文献 52
卵、肉、魚製品（15）	1-963 μg/100g	4.5-90.6 %	参考文献 53
乳製品（10）	0.3-398 μg/100g	5.1-36.2 %	
卵黄	1.93 nmol/g	100 %	参考文献 73
牛肝臓	7.69 nmol/g	19.4 %	
リマ豆	2.27 nmol/g	35.2 %	
パン酵母	69.1 nmol/g	86.4 %	
キャベツ	0.8 nmol/g	100 %	
レタス	3.0 nmol/g	100 %	
ポテト	12 μg/100g	96 %	参考文献 45

② 生理活性

健康女性ボランティアに葉酸と等モルの5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを単回投与（400 μ）した場合のバイオアベイラビリティを比較した試験において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム投与被験者の方が血漿中葉酸濃度の曲線下面積（AUC）および最高濃度（C_{max}）の値が高かったことから、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは葉酸よりバイオアベイラビリティが一貫して、わずかではあるが高かったことが認められた（参考文献 62）。また、他の研究者によっても、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの吸収率が葉酸と比較し、僅かに高かったことが観察されている（参考文献 18）

③ 生物学的有効性

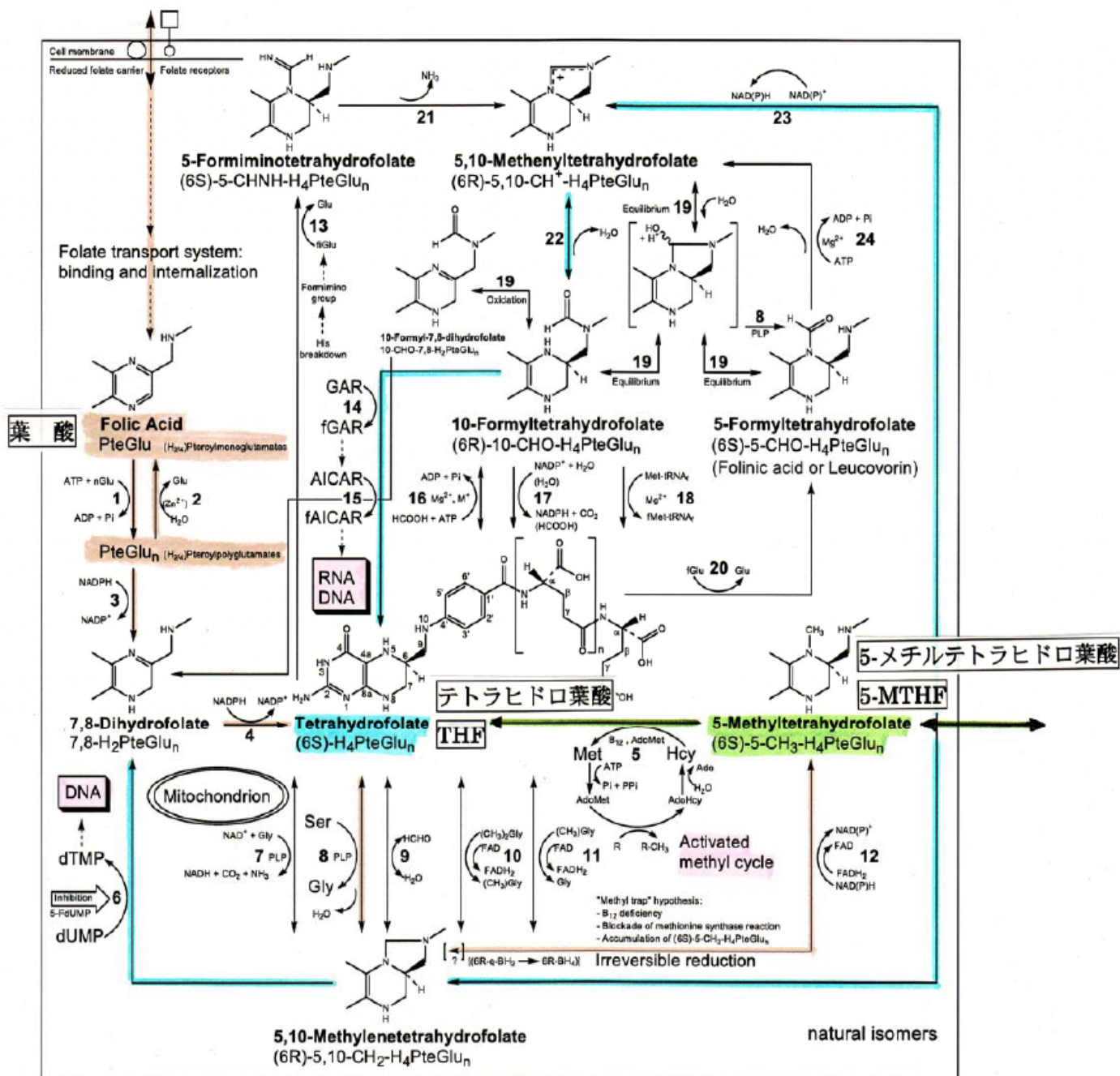
生物学的有効性とは、摂取した栄養が吸収されたのち活性型の栄養素に変換される効率のことであると定義される（参考文献 83）。葉酸は活性メチル化サイクル（activated methyl cycle）における共同因子（cofactor）として供される前に2段階で還元される必要がある（同じ酵素ジヒドロ葉酸レダクターゼによって触媒される）（図 4-1）。これに対し、5-メチルテトラヒドロ葉酸は

メチル化反応に直接供することができる。このため、ホモシステインのメチル化といった、葉酸が関与するメチル化反応において5-メチルテトラヒドロ葉酸の生物学的有効性が高いことが当然予測される。

実際、5-メチルテトラヒドロ葉酸を毎日の食事に添加して摂取した場合、等モル量の葉酸を摂取した場合より血漿ホモシステイン濃度の低下がわずかではあるが有意であったことから、天然型葉酸、即ち5-メチルテトラヒドロ葉酸の生物学的有効性はわずかに高いことが指摘された（参考文献 46、85）。なお、血漿ホモシステイン濃度の上昇はアテローム性動脈硬化症、動脈閉塞性疾患および静脈血栓塞栓症の独立危険因子である（参考文献 15、17、63）。ノルウェーの疫学研究において、血漿ホモシステイン濃度と2つの非血管性および心臓血管性の死因との間にも関係が認められている（参考文献 89）。

ビタミン B₁₂ 依存性のメチルトランスフェラーゼによって触媒される反応において、5-メチルテトラヒドロ葉酸のメチル基はホモシステインに転移され、その結果、メチオニンに変換される（参考文献 71）。従って、冠動脈心疾患（CHD）患者では血漿ホモシステイン濃度と血漿 L-メチル葉酸濃度との間に相関関係が存在する（参考文献 48）。反対に、高ホモシステイン血症の被験者に葉酸を投与するとホモシステイン濃度は低下する（参考文献 13）。特に、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ（MTHFR）活性が低下した場合には、ホモシステイン濃度が過剰に上昇しないようにするために適切な葉酸を摂取する必要がある。MTHFR は葉酸代謝における鍵の酵素であり、メチレンテトラヒドロ葉酸を5-メチルテトラヒドロ葉酸に変換する（図 4-1）。

図 4 - 1 : 葉酸の生体内代謝に関する生化学 (Biochemical pathways of folates)



- 1 Pteroylpolylglutamate synthetase
- 2 γ -Glutamyl hydrolase
- 3 Dihydrofolate reductase
- 4 Dihydrofolate reductase
- 5 Methionine synthase
- 6 Thymidylate synthase
- 7 Glycine cleavage system
- 8 Serine hydroxymethyltransferase
- 9 Equilibrium (non-enzymatic reaction)
- 10 Dimethylglycine dehydrogenase
- 11 Monomethylglycine dehydrogenase
- 12 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase

- 13 N-Formimino-L-glutamate: tetrahydrofolate 5-formiminotransferase¹⁾
- 14 Glycinamide ribonucleotide formyltransferase
- 15 Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide formyltransferase
- 16 10-Formyltetrahydrofolate synthetase²⁾
- 17 10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase
- 18 Methionyl-tRNA-formyltransferase
- 19 Non-enzymatic reactions
- 20 N-Formylglutamate: tetrahydrofolate 5-formyltransferase
- 21 5-Formiminotetrahydrofolate cyclodeaminase¹⁾
- 22 5,10-Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase²⁾
- 23 5,10-Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase²⁾
- 24 5-Formyltetrahydrofolate cyclodehydrase

1) Bifunctional enzyme in mammals (Formiminotransferase-Cyclodeaminase)

2) Trifunctional enzyme in mammals (C₇-Tetrahydrofolate synthase)

(Merck Eprova 社資料より一部改変)

④ 5-メチルテトラヒドロ葉酸の摂取は、ビタミン B₁₂ 欠乏症の臨床症状を隠蔽しない

葉酸を上回る 5-メチルテトラヒドロ葉酸の別の潜在的長所は、5-メチルテトラヒドロ葉酸がビタミン B₁₂ 欠乏症の臨床症状を隠蔽する可能性のないことである（参考文献 20、28、69）。葉酸によるビタミン B₁₂ 欠乏症のマスキング作用は、葉酸サプリメントの摂取に関して、これまで主に懸念されていることであり、葉酸の許容摂取量の上限値を 1,000 µg/日に制限する理由でもある（添付資料 [2]、参考文献 32、67、77、）。

60 歳以上の 10～15% がビタミン B₁₂ 欠乏症に罹患（参考文献 2）し、治療しない場合、巨赤芽球性貧血（悪性貧血）および、あるいは神経障害を引き起こすことがある。ビタミン B₁₂ 欠乏による血液学的作用は葉酸欠乏から生じる血液学的作用と区別することは極めて困難である。即ち、いずれの欠乏症においても DNA の合成が傷害されることによる。ビタミン B₁₂ 欠乏症の場合、コバラミン補酵素の欠如により、ビタミン B₁₂ が共同因子であるメチオニン合成酵素の活性が低下する。この酵素は実際に L-メチル葉酸からテトラヒドロ葉酸（THF）への不可逆性の変換を触媒している（図 4-1）。THF は、特に、迅速に増殖する細胞（たとえば、骨髄細胞）において、チミジン合成酵素を必要とし、このため DNA 合成を維持する必要があるメチレンテトラヒドロ葉酸に変換される。ビタミン B₁₂ 欠乏によるメチオニン合成酵素活性低下の条件下で、5-メチルテトラヒドロ葉酸は、THF に変換されず蓄積される（メチルトラップ）（参考文献 70）。従って、5-メチルテトラヒドロ葉酸を含むサプリメントの摂取によって、この状況について何ら変化することはない。すなわちビタミン B₁₂ 欠乏による血液学的な症状は、影響されることなく持続する（参考文献 28）。

しかしながら、葉酸を摂取した場合には、ビタミン B₁₂ 非依存性の 2 段階の還元反応において、葉酸は葉酸レダクターゼによって THF に還元される。これによって DNA の合成および赤血球の生成が再開される。結果として、ビタミン B₁₂ 欠乏による巨赤芽球性貧血（悪性貧血）が緩和される。即ち、根本の原因であるビタミン B₁₂ 欠乏が改善していないにもかかわらず、葉酸摂取の結果としての悪性貧血が改善し、原因であるビタミン B₁₂ 欠乏をマスキングしてしまうことになる。

ビタミン B₁₂ 欠乏症による神経障害の原因は完全には解明されていない。ビタミン B₁₂ の補充後に神経障害が可逆性であるかどうかはその期間によって左右される。高用量の葉酸を悪性貧血患者に投与するとこのビタミン B₁₂ 欠乏による血液状態は修正され、このため、基礎にあるビタミン B₁₂ 欠乏症が隠蔽される可能性がある。しかしながら、ビタミン B₁₂ 欠乏による併発神経障害は進行する。その後、葉酸治療に応じて血液学的指標が正常化した時に初めて神経障害が臨床的に顕在化すると推測される。こうした条件下では、基礎にあるビタミン B₁₂ 欠乏症は認知されず、適切な治療の機会が失われると考えられる。

（2）食品中での安定性

① 総合ビタミン/ミネラル錠における安定性

総合ビタミン/ミネラル錠は 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（0.14mg/錠）を用いて調製した。この錠剤を 25℃、60%r.h.；40℃、75%r.h.；および 60℃で保存した。25℃で 18 か月間保存した後、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 92% はなお存在した。40℃で 75% の高い相対湿度で保存した場合、6 か月後に 57% の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを回収した。60℃では、3 か月後に 93% が回収された（添付資料 [14]）。

② 総合ビタミン錠における安定性

総合ビタミン錠は 5-メチルテトラヒドロ葉酸（0.28mg/錠）を用いて調製した。この錠剤を 25℃、60%r.h.；40℃、75%r.h.；および 60℃で保存した。25℃で 18 か月間保存した後、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸の 92% はなお存在した。40℃で 75% の高い相対湿度で保存した場合、6 か月後に 74% の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを回収した。60℃では、3 か月後に 92% が回収された（添付資料 [14]）。

③ 単一ビタミン錠における安定性

単一ビタミン錠は 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（0.8mg/錠）を用いて調製した。こ

の錠剤を 25℃、60%r.h.；および 40℃、75%r.h.で保存した。25℃で 12 か月間保存した後、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 99%はなお存在した。40℃で 75%の高い相対湿度で保存した場合、12 か月後に 97%の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを回収した（添付資料〔14〕）。

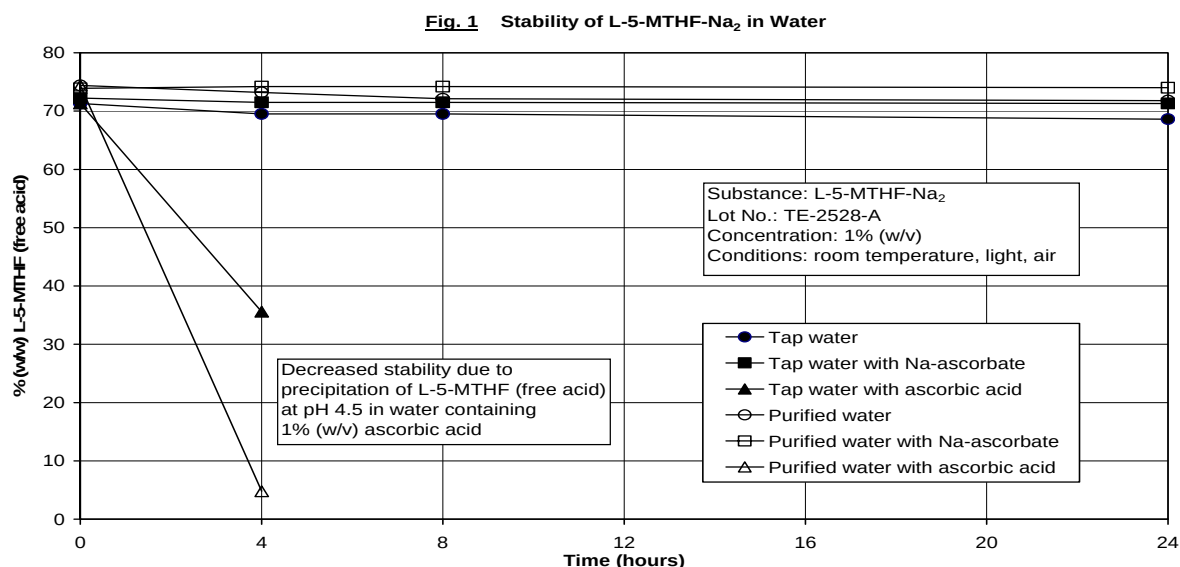
④ B 群ビタミンカプセルにおける安定性

B 群ビタミンカプセルは 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムとシアノコバラミン（25.0mg および 1.0mg/カプセル）を用いて調製した。このカプセルを 25℃、60%r.h.；および 40℃、75% r.h.で保存した。25℃で 18 か月間保存した後、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの 94%はなお存在した。40℃で 75%の高い相対湿度で保存した場合、12 か月後に 94%の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを回収した（添付資料〔14〕）。

⑤ 水溶液中における安定性

抗酸化剤としてアスコルビン酸を添加した場合と添加しない場合の 5-メチルテトラヒドロ葉酸のナトリウム塩の水溶液（1% w/v）の安定性を 24 時間にわたって試験した。この溶液を遮光せずに大気中の酸素が利用できる室温で保存した試験において試験物質の安定性が認められた。しかしながら、5-メチルテトラヒドロ葉酸（フリー）の場合には、pH が 4.5 と低いためにアスコルビン酸を含有する溶液中に 5-メチルテトラヒドロ葉酸の沈殿物を形成した（図 4-2）。また、異なる緩衝系における 5-メチルテトラヒドロ葉酸と葉酸の安定性に関する比較試験では、5-メチルテトラヒドロ葉酸は、特に酸性水溶液中では、葉酸より安定性が低いことを示唆している（参考文献 54、56）。

図 4-2：水溶液中における安定性



⑥ UHT 処理中の溶液における安定性

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムをリン酸緩衝液（pH7）中に溶解した（260 μ g/100ml）。この溶液の酸素濃度は低いか正常のいずれかであり（それぞれ 6.8ppm および 0.3ppm）、110～150℃で 0.08 分～6.49 分間処理した。結果から、酸素が存在すると高温（140～150℃）でのみ分解が促進されることが示唆された（参考文献 88）。従って、5-メチルテトラヒドロ葉酸の酸化分解を最小限に保つためには脱気処理が推奨される。

⑦ マイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの安定性

マイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、異なる不活性担体（麦芽デキストリン、微小結晶性セルロース、リン酸水素カルシウム）にこの物質を吸収させ、食品用のセルロ

ースまたはセラックといった 1 層または 2 層の適切なフィルムコーティング物質を用いてこの混合物をコーティングすることによって調製した。製品の調製に抗酸化剤は用いなかった。

i) 約 8~10mg/100g の計算濃度となるように純粋またはマイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを添加することによってパンを作成した。5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを添加していないパンの葉酸含量は約 0.2mg/100g であった。添加した純粋 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムおよびマイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの回収率はそれぞれ 89~94%および 86~105%であった (275g のパン)。焼く時間の長い大きなパン (1kg) の場合では、回収率は 80%であった。

ii) インスタントの朝食用シリアルは市販の製造ラインを用いて純粋 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムまたはマイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを添加することによって調整した。製品中の純粋 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの回収率は 74%であり、マイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの回収率は 79~80%であった (参考文献 5)。人工消化系を用いた追加実験において、pH1 で 1 時間反応させた後、pH6.8 で 3 時間反応させたところ、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは人工消化系においてマイクロカプセルから完全に放出されたことを認めた (例外: グリセロールトリステアレートによるコーティングは葉酸の放出を阻害した) (参考文献 6)。

iii) ビタミン B₁ および B₆ を添加した錠剤と添加しない錠剤におけるマイクロカプセル化 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの安定性を室温 (25℃、60%r.h.) および加速条件下 (40℃、75% r.h.) で試験した。15 週間の観察期間中すべての試料は安定であった (参考文献 7、8)。

(3) 食品中の栄養成分に及ぼす影響 (食品中の内生 5-メチルテトラヒドロ葉酸の安定性)

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムと他の栄養成分およびその他の成分との相互作用についての文献は特に見当たらない。しかしながら、5-メチルテトラヒドロ葉酸は天然の還元型の葉酸であり、また、生体に吸収された後には、葉酸の活性型としての還元葉酸とは区別できないことから、基本的には葉酸と同等であり、従って、葉酸と他の成分との相互作用に関する資料を使用することが出来ると考えられる。

① 製パン中の安定性

小麦粉に 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (3 μg/g) を添加したのち、スポンジ・ドウ法によってパンに加工した。添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸と内生葉酸 (小麦粉および酵母由来の) の含量に生じた変化を HPLC によって測定した。添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸と本来の葉酸の安定性はパン焼き工程では相対的に良好であることを認めた。パン焼きによる天然葉酸の喪失は相対的にわずかであり (~20%)、添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸の喪失と同等であった。パン焼きによって 5-メチルテトラヒドロ葉酸の濃度は低下せず、実際には未だ識別されていない機序によって、寧ろ上昇したことは注目に値する (参考文献 55)。

② 食品加工中の安定性

オーブンで焼いている間 (200℃、30 分) の魚および鶏肉、調理中の肝ソーセージ、および冷凍保存中の牛の肝および苺においても本来 (内生) の 5-メチルテトラヒドロ葉酸の良好な安定性が観察された (参考文献 82)。

③ 液体特殊調製乳に添加した L-メチル葉酸 (L-5-MTHF) の安定性

モデル食品系として液体特殊調製粉乳を用いて、異なる期間 (最長 250 分) 加熱 (100~140℃) 処理している間、10mg/kg の濃度で添加した 5-メチルテトラヒドロ葉酸および葉酸の安定性を試験した。適用した試験条件下で、5-メチルテトラヒドロ葉酸の安定性は葉酸の安定性よりほんのわずかに高いことを認めた。また、葉酸より 5-メチルテトラヒドロ葉酸の安定性が著しく高いことがスポーツドリンクにおいても報告されている (参考文献 30)。アスコルビン酸および硫酸第一鉄を添加するとさらに安定化し、これによって溶存酸素の濃度は低下した (参考文献 16)。

本試験の結果に加えて食物中の内生 5-メチルテトラヒドロ葉酸に良好な安定性が観察されたことから、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは単純な水溶液中の場合と異なり、より複雑な食品系において安定であることが示唆される。この考えは対応する葉酸による観察によって裏付けられる（参考文献 50、51）。熱処理が行われていない乳製品において、牛乳中に天然に存在する葉酸結合蛋白質は牛乳中の優勢な葉酸である 5-メチルテトラヒドロ葉酸に対して特に効果的な安定化作用を示す（参考文献 39）。

以上の結果、安定性の観点から、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムならびに葉酸はビタミンが豊富な食物に添加するのに適していると考えられた。しかしながら、長期安定性が必要な場合または他の食物成分と化学反応を生じる可能性がある場合（酸性水溶液中等）、安定性の低下を回避するため、できれば抗酸化剤としてアスコルビン酸を添加したマイクロカプセル型の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの使用を考慮することが勧められる。

④ 医薬品等との相互作用

独立行政法人国立健康・栄養研究所の「健康食品」の素材情報データベース、葉酸の項に示された資料によれば、「医薬品等との相互作用」として、以下の通り示されている。

(<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail605.html>)

- クロラムフェニコールとの併用は、貧血の治療に対する葉酸の効果を減じる恐れがある。
- コレスチラミンやコレスチポル（胆汁酸吸収剤）との併用は、葉酸のサプリメントの生体内での有効性を減じる恐れがある。
- パンクレアチン（すい臓酵素）やスルファサラジンなどの薬剤との併用は、葉酸の吸収を阻害する恐れがある。
- 葉酸と併用するとがん化学療法薬のメトトレキセートは、効果を減じる恐れがある。しかし、リウマチ性関節炎と乾癬治療へのメトトレキセートの使用では、高用量の葉酸摂取は効果を減じることなくメトトレキセートの副作用を減少させる可能性がある。
- フェニトイン、フォスフェニトイン、ピリミドン、フェノバルビタールなどの神経系薬剤は、葉酸との併用により代謝が促進され血中レベルが減少する恐れがあり、またこれらの薬剤は葉酸レベルに影響を与える可能性がある。
- ピリメタミン（抗マラリア薬）と葉酸の併用は、薬剤の効果を減じる恐れがある。
- ビタミン K あるいは亜鉛との併用摂取を長期間続けると、それらの体内濃度を低下させることがある。
- 抗精神・抗てんかん薬であるカルバマゼピンは、葉酸吸収の阻害や肝酵素誘導による葉酸代謝促進により葉酸レベルを低下させることがある。
- 降圧利尿薬であるトリウムテレンは、葉酸から活性体への変換を抑制し葉酸の吸収を阻害する恐れがある。

5. 安全性に関する資料

(1) 毒性に関する資料

① 毒性試験のまとめ

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの LD₅₀ はラットで 2,000mg/kg bw。また、ラットに 400mg/kg bw および 1,000mg/kg bw までの最大用量の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムをそれぞれ投与した 13 週亜慢性毒性試験からはいかなる有害作用も明らかにならなかった。これは、日本人の食事摂取基準 2005 年版において示された葉酸の許容摂取量の上限值 1,000 µg/日/成人（プテロイルモノグルタミン酸として）の少なくとも 20,000 倍の用量の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに相当する。

1 日投与量 100、300 および 1,000mg/kg bw の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを用いた標準的胚毒性/催奇形性試験において、胎仔毒性、胚毒性または催奇形性作用は認められなかった。

さらに、種々の変異原性試験（エームス試験、染色体異常試験、TK 遺伝子座試験、不定期 DNA 合成試験および小核試験）の結果から、遺伝毒性のないことが認められた。

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに関して行った毒性試験を表 5-1 に要約した。

表 5-1：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（L-5-MTHF-Ca）の毒性試験のまとめ

試験の種類	動物種 投与方法	投与量 投与期間	結果
急性 毒性試験	ラット（雌雄各 3 匹） 経口（経口チューブ）	2,000 mg/kg bw 1 日（単回投与）	特に異常は認められず、死亡例なし。 LD ₅₀ > 2,000 mg/kg bw （参考文献 33）
亜慢性 毒性試験	ラット（雌雄各 10 匹／群） 経口（経口チューブ）	0, 25, 100, 400 mg/kg bw 13 週間	投与の過誤により死亡した高用量群の雌 1 匹を除き、全ての動物は生存。体重増加、投与に関わる特別な変化なし。 無毒性量（NOAEL）：400 mg/kg bw （添付資料〔17〕）
胎仔毒性／ 催奇形性 試験	ラット（25 匹／群） 経口	0, 100, 300, 1,000 mg/kg bw 妊娠 5 日～19 日	母体に対する毒性は認められず、胚毒性、胎仔毒性或いは催奇形性は認められない。 無毒性量（NOAEL）：1,000 mg/kg bw （添付資料〔18〕）
変異原性 試験	エームス試験 （ネズミチフス菌： TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537, 大腸菌： WP2 uvr A pKM101）	5 - 5,000 µg / プレート（S9 mix による代謝活性化有りおよび無し）	変異原性は認められない。 （添付資料〔19〕）
	染色体異常試験（ヒト培養リンパ球）	1, 10, 100, 800 µg / プレート	統計学的に有意な染色体異常は認められない。 （参考文献 20）
	TK 遺伝子座試験（マウスリンパ細胞）	5 - 5,000 µg/ml (S9 mix による代謝活性化有りおよび無し)	S9mix 非存在下最大用量において、見かけ上弱い変異原性が示されたが、これは試験物質による TK 欠損細胞の成長促進効果として説明される可能性がある。 （添付資料〔20〕）
	不定期 DNA 合成試験（ラット）	0, 800, 2,000 µg / kg bw（経口）	³ H-チミジンの肝細胞核への取込みの有意な増加は認められない。 （添付資料〔21〕）
	小核試験（ラット骨髓細胞）	2,000 µg / kg bw（経口）	投与後 24 時間および 85 時間における小核細胞の有意な増加は認められない。 （添付資料〔22〕）

② 単回投与毒性試験：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムおよびその主な不純物と酸化産物の急性毒性

生後 7～8 週齢のラット（Hsd Cpb: WU 種、雄および雌、それぞれ 3 匹）において純度 97.0% の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの急性毒性試験を行った。2000mg/kg bw の用量の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを絶食ラットに経口チューブによって強制投与した。投与後 4

時間から再び給餌し、その後 15 日間観察したのち 15 日目に屠殺、剖検し、肉眼的観察を行った。すべてのラットは順当に体重が増加し、試験終了時まで生存していた。臓器に肉眼的変化は観察されなかった。以上の結果から 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの LD₅₀ は >2,000mg/kg bw であると結論した（参考文献 33）。

なお、同じ手順に従って、次の製品の急性毒性も試験した：

- 純度 96.2% の D,L-5-MTHF-Ca（D-5-MTHF-Ca と L-5-MTHF-Ca のラセミ混合体）
- 純度 97.2% の D-5-MTHF-Ca（生物学的に不活性な L-5-MTHF-Ca の光学異性体）
- 純度 97.5% の L-Mefox-Ca（L-5-MTHF の s-トリアジン酸化産物）
- 純度 98.6% の L-MTHPA-Ca（L-5-MTHF の加水分解産物）

上記の製品を摂取したすべてのラットはいずれも順当に体重が増加し、試験終了時まで生存した。剖検時に肉眼的変化は観察されなかった。この結果から、これらの製品の LD₅₀ はいずれも >2,000mg/kg bw であると結論した（参考文献 34、35、36、37）。

③ 90 日間反復投与毒性試験

げっ歯類の 28 日間反復投与毒性試験に替えて、同 13 週間（90 日間）反復投与試験結果を示す。標準的 13 週間毒性試験において、4 群の Wister ラットに 1 日投与量 0（賦形剤対照）、25、100 および 400mg/kg bw の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを、1 日 1 回経口チューブによって強制投与した。各群は雌雄それぞれ 10 匹ずつとしたが、対照群および高用量投与群では別に雌雄 5 匹ずつを追加し、それらについては 13 週間の投与後 4 週間の回復期間を設けた。

投与期間中および回復期間中、臨床徴候、ケージ外からの観察、飼料摂取量および体重を定期的に記録した。投与期間の前と終わりに眼底検査を行った。13 週間の期間中、機能観察バッテリー（FOB）、自発運動および握力を試験した。

投与期間および回復期間の終了時に、血液検査および生化学検査のための血液試料および尿検査のための試料を採集した。すべての動物を屠殺、剖検し、肉眼的観察を行った。10 個の臓器の重量を記録した（表 5-2、表 5-3、表 5-4）。すべての対照および高用量動物から得られた臓器および組織とすべての動物の肉眼的損傷について、組織検査を行った。

表 5-2：投与開始時(前)の雌雄、投与群別の体重

性別		第 1 群 (0 mg/kg)	第 2 群 (25 mg/kg)	第 3 群 (100 mg/kg)	第 4 群 (400 mg/kg)
雄	平均体重 (g)	141	142	136	141
	標準偏差 (SD)	10.7	12.8	10.7	11.6
	検体数 (N)	15	10	10	15
雌	平均体重 (g)	131	131	123	126
	標準偏差 (SD)	6.4	6.4	9.3	9.7
	検体数 (N)	15	10	10	15

表 5-3：13 週および 17 週後の体重および各臓器重量（雄）

臓器 (g)	第 1 群 (0 mg/kg)		第 2 群 (25 mg/kg)	第 3 群 (100 mg/kg)	第 4 群 (400 mg/kg)	
	13 週(N=10)	17 週(N=5)	13 週(N=10)	13 週(N=10)	13 週(N=10)	17 週(N=5)
体重	365.245 (SD:33.959)	407.136 (SD:28.182)	370.547 (SD:26.189)	343.075 (SD:18.388)	359.141 (SD:31.914)	367.008 (SD:43.130)
脳	2.09 (SD:0.12)	2.15 (SD:0.08)	2.05 (SD:0.09)	2.02 (SD:0.08)	2.06 (SD:0.08)	2.04 (SD:0.07)
心臓	1.102 (SD:0.171)	1.217 (SD:0.060)	1.083 (SD:0.103)	1.053 (SD:0.089)	1.068 (SD:0.096)	1.097 (SD:0.144)
甲状腺	0.028 (SD:0.005)	0.027 (SD:0.006)	0.026 (SD:0.002)	0.024 (SD:0.008)	0.026 (SD:0.004)	0.024 (SD:0.007)
肝臓	9.28 (SD:1.17)	9.28 (SD:0.67)	9.09 (SD:1.07)	8.44 (SD:0.61)	8.91 (SD:0.98)	8.64 (SD:1.00)

胸腺	0.28 (SD:0.06)	0.30 (SD:0.06)	0.32 (SD:0.07)	0.29 (SD:0.08)	0.32 (SD:0.06)	0.27 (SD:0.09)
腎臓	2.11 (SD:0.23)	2.19 (SD:0.11)	2.12 (SD:0.23)	2.03 (SD:0.20)	2.03 (SD:0.24)	1.99 (SD:0.28)
副腎	0.061 (SD:0.011)	0.063 (SD:0.007)	0.058 (SD:0.007)	0.058 (SD:0.008)	0.058 (SD:0.007)	0.049 (SD:0.010)
脾臓	0.753 (SD:0.086)	0.730 (SD:0.031)	0.699 (SD:0.075)	0.678 (SD:0.117)	0.748 (SD:0.119)	0.687 (SD:0.117)
精巣	3.77 (SD:0.22)	3.72 (SD:0.13)	3.68 (SD:0.26)	3.62 (SD:0.25)	3.63 (SD:0.32)	3.76 (SD:0.31)
副睾丸	1.452 (SD:0.130)	1.492 (SD:0.100)	1.450 (SD:0.133)	1.295 (SD:0.162)	1.355 (SD:0.108)	1.580 (SD:0.116)

表 5 - 4： 13 週および 17 週後の体重および各臓器重量（雌）

臓器 (g)	第 1 群 (0 mg/kg)		第 2 群 (25 mg/kg)	第 3 群 (100 mg/kg)	第 4 群 (400 mg/kg)	
	13 週(N=10)	17 週(N=5)	13 週(N=10)	13 週(N=10)	13 週(N=10)	17 週(N=4)
体重	228.571 (SD:12.595)	247.978 (SD:22.091)	234.124 (SD:10.012)	227.903 (SD:15.869)	236.188 (SD:18.716)	228.368 (SD:15.472)
脳	1.97 (SD:0.08)	2.03 (SD:0.13)	1.93 (SD:0.07)	1.96 (SD:0.07)	1.93 (SD:0.07)	1.89 (SD:0.11)
心臓	0.816 (SD:0.040)	0.857 (SD:0.063)	0.828 (SD:0.064)	0.815 (SD:0.070)	0.851 (SD:0.078)	0.831 (SD:0.112)
甲状腺	0.021 (SD:0.004)	0.022 (SD:0.004)	0.021 (SD:0.003)	0.020 (SD:0.004)	0.022 (SD:0.005)	0.022 (SD:0.007)
肝臓	5.85 (SD:0.41)	6.86 (SD:0.52)	6.24 (SD:0.37)	6.07 (SD:0.75)	6.45 (SD:0.83)	6.27 (SD:0.68)
胸腺	0.30 (SD:0.06)	0.27 (SD:0.05)	0.28 (SD:0.05)	0.32 (SD:0.07)	0.32 (SD:0.07)	0.28 (SD:0.06)
腎臓	1.39 (SD:0.13)	1.72 (SD:0.04)	1.48 (SD:0.11)	1.50 (SD:0.15)	1.49 (SD:0.10)	1.52 (SD:0.16)
副腎	0.077 (SD:0.016)	0.084 (SD:0.006)	0.075 (SD:0.012)	0.080 (SD:0.019)	0.080 (SD:0.014)	0.076 (SD:0.009)
脾臓	0.601 (SD:0.091)	0.596 (SD:0.054)	0.585 (SD:0.053)	0.588 (SD:0.082)	0.542 (SD:0.203)	0.593 (SD:0.149)
卵巣	0.121 (SD:0.024)	0.119 (SD:0.034)	0.100 (SD:0.016)	0.111 (SD:0.020)	0.120 (SD:0.024)	0.112 (SD:0.032)
子宮	1.058 (SD:0.291)	0.962 (SD:0.106)	0.976 (SD:0.185)	0.916 (SD:0.300)	1.071 (SD:0.271)	1.063 (SD:0.158)

強制投与の過誤によって死亡した高用量群の雌 1 匹を除き、すべての動物が予定の剖検まで生存した。体重はいずれも増加し、投与の影響は認められなかった。機能観察バッテリー（FOB）および自発運動試験からは投与に対応した変化は認められなかった。投与群と対照群との間で体重および飼料摂取量に差はなかった。血液学的変化は認められなかった。血漿分析から、高用量群の雄においてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびクレアチンキナーゼの濃度が有意に低下したが、雌では低下しなかった。臓器の重量には投与に対応した変化はなかった。組織病理検査からは投与に起因すると思われる異常は認められなかった。

高用量群の雄において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびクレアチンキナーゼの 3 つの酵素がわずかに低下したことが、認められた唯一の変化であった。これらの酵素の低下に毒性学的関連がなかったことや、この所見が雄に限られたことから、NOAEL は 400mg/kg bw/日、すなわち、試験した最高用量レベルであると考えられた（添付資料 [17]）。

④ 繁殖試験／催奇形性試験：ラットにおける胚毒性/催奇形性試験

標準的胚毒性/催奇形性試験において、妊娠している可能性のある Wister ラット（25 匹/群）4 群に 1 日投与量が 0（賦形剤対照）、100、300 および 1,000mg/kg bw の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを妊娠 5 日から 19 日に投与した。妊娠後 0 日から 20 日に、母ラットの臨床徴候、体重、および飼料と水の消費を定期的に観察記録した。妊娠 20 日後に母ラットを屠殺、解剖した。胎仔を子宮から取り出し発達毒性について検討した。

1 群につき 22～24 匹のラットが妊娠中であることを認めた。投与に対する耐性は十分であり、すべての動物が試験終了時まで生存した。投与群と対照群との間で、体重増加および飼料の消費量に差はみられなかった。水の摂取量は高用量群の方がわずかに多かった。生殖行動について、投与による影響はみられなかった。妊娠中の雌のいずれにも生存能力のある複数の同腹胎仔を認めた。試験した項目（胚吸収率、生存胎仔の平均数、胎仔の平均体重、および性別比）について、投与の影響を受けた項目はなかった。母ラットの剖検からは、投与に起因すると思われる肉眼的変化は明らかにならなかった。胎仔を外観、内臓および骨格系の奇形ならびに異常について検討した結果、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの胎仔毒性、胚毒性または催奇形性作用は認められなかった（添付資料〔18〕）。

⑤ 抗原性に関する考察

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム（モノグルタミン酸塩）は、食品中に生じる天然の葉酸化合物のうちの主な還元型の葉酸であり、また、通常血漿中に見出される唯一の型の葉酸塩である。すなわち、5-メチルテトラヒドロ葉酸はヒト胎児期から（免疫システムが構築される前から）既に存在し、何ら抗原性を示すことが無い。従って、生体は当該物質を生体の成分として認識し、免疫反応を示さないと考えられる。仮に、こういったビタミンに対してアレルギー反応を示すこととなった場合、ヒトはビタミン欠乏により生存できなくなる。こういった症例の報告は皆無である。

⑥ 変異原性試験

i) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムとその主な不純物および酸化産物についての Ames 試験

S. typhimurium 株 TA98、TA100、TA102、TA1535 および TA1537 と *E. coli* WP 2 uvr A pKM101 を用いて、代謝活性化（S9 mix）による場合とよらない場合で実施した Ames 試験において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの突然変異原性の可能性を試験した。5～5,000 μ g/プレートの濃度について5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを試験した。試験材料を懸濁液として平板に接種し、最高濃度、すなわち、500 および 5,000 μ g/プレートとなるように調製した。試験菌株に対する毒性は観察されず、試験した全ての菌株においてその復帰突然変異体の増加はみられなかった。この結果から、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムはこの試験の条件下では変異原性のないことが認められた（添付資料〔19〕）。

なお、同じプロトコールを適用して、次の製品の変異原性も試験した：

- 純度 96.2%の D-L-5-MTHF-Ca（D-5-MTHF-Ca と L-5-MTHF-Ca のラセミ混合体）
- 純度 97.2%の D-5-MTHF-Ca（生物学的に不活性な L-5-MTHF-Ca の鏡像異性体）
- 純度 97.5%の L-Mefox-Ca（L-5-MTHF の s-トリアジン酸化産物）
- 純度 98.6%の L-MTHPA-Ca（L-5-MTHF の加水分解産物）

試験した化合物のうち試験菌株に対する毒性が認められた化合物はなかった。試験した化合物によって、いずれの菌株にも復帰突然変異体の増加はみられなかった。このため、すべての化合物は適用した試験条件下で変異原性はないと判断された（参考文献 78、79、80、81）。

ii) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムにおける TK 遺伝子座試験

純度 97.2%の5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを 5～5,000 μ g/ml の濃度で試験した。液体媒体を用いたマイクロウェル法を適用し、マウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子突然変異分析において、代謝活性化（S9 mix）による場合とよらない場合の突然変異原性を試験した。

S9 mix の存在下で、3 時間暴露し、発現期間を 2 日間とした場合、試験した最高濃度まで細胞毒性は生じなかった。さらに、TK 遺伝子座における突然変異の発現頻度は上昇しなかった。

S9 mix の非存在下で、24 時間暴露、発現期間 2 日間の場合、3 つの最高濃度（1,580、2,810 および 5,000 μ g/ml）において細胞毒性が観察された。相対的増殖率がそれぞれ対照の 13%および 4%に低下した 2 つの最高濃度では、突然変異の発生頻度はわずかに上昇した。S9 mix の存在下および非存在下での実験によって異なる結果が得られた原因について、暴露時間が異なったため

であったかどうかを明らかにするために、S9 mix の非存在下で 2 つの追加試験を行った。3 時間および 24 時間の暴露時間を適用し、発現期間を 3 日間に延長した。

S9 mix の非存在下における、2 つの追加試験と最初の試験の間で細胞毒性に差は観察されなかった。しかしながら、暴露時間が 3 時間の試験では、突然変異の発生頻度上昇は 2 倍に満たず、毒性評価に関する協定に基づき (by convention)、この結果は陰性結果 (すなわち、物質は突然変異性でない) であるとみなされた。暴露時間が 24 時間の試験では、2 倍以上の突然変異の発生頻度上昇が最高用量でのみみられ、この用量では、相対的増殖率は対照の 0.2% に低下した。

著者らは、TK 遺伝子座試験において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは S9 mix の非存在下で弱い突然変異原性を示したと結論付けた。非毒性濃度でしかも S9 mix の存在下では突然変異性は観察されなかった。FDA ガイドライン (Redbook, 2000) によれば、毒性物質は相対的増殖率 (RTG) を 80% 低下させ、RTG が 10~20% の試験では正当な結果が得られるとみなされている。しかしながら、RTG が 10% 以下においてのみ突然変異の発生頻度の有意な上昇が見られたが、RTG が 10% 以上では突然変異原性の証拠が得られなかった場合は陽性結果であるとはみなされないとしている。本シリーズ実験において、2 倍以上の突然変異の発生頻度上昇は 3 回 (最初の試験における 2 つの最高用量レベル、第 3 回目の試験における最高用量レベル) 観察された。しかしながら、対応する RTG が明白に 10% の限界を下回わり (最初の試験および第 3 回目の試験におけるそれぞれ最高用量レベル)、さらに、低用量では突然変異の発生頻度に用量/反応関係がみられなかったため、この 3 回の突然変異の発生頻度上昇のうち 2 回は無視してもよいとされる。また、リンパ腫細胞の突然変異クローンは 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムが存在しない対照培地より 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの存在下でよく増殖する可能性がある。これらの細胞は活性チミジンキナーゼを欠き、もっぱら dUMP からチミジン 1 リン酸 (TMP) を産生しなければならない。このメチル化反応はチミジル酸シンターゼによって触媒され、5,10-メチレン-THF を必要とする。5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの添加によって、TK 欠損細胞における TMP の供給が促進され、このため、その複製が促進されることが考えられる。その後、TK 欠損細胞数の増加 (すなわち、突然変異) は弱い突然変異作用として誤って解釈されることがある。

これらの条件の下で、しかも細胞毒性 (および S9 mix によるその抑制) の機序が判明していないことを考えると、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに弱い突然変異作用が認められたと結論付けるのは早計であると考えられる。TK 遺伝子座試験 (S9 mix 非存在下) から得られた結果は、決定的ではないと結論付けることがより賢明であろう (添付資料 [20])。

iii) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムにおける DNA 合成と修復試験

標準的不定期 DNA 合成 (UDS) 試験において修復可能な DNA 損傷を誘発する可能性について 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを試験した。

複数群の雄 Wister ラットに 0.25% メトセル (賦形剤対照)、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (純度 99%) 800mg/kg bw および 2,000mg/kg bw、2-アセトアミド-フルオレン (2-AAF) 75mg/kg bw (第 1 の陽性対照)、ならびにジメチルニトロサミン (DMN) 10mg/kg bw (第 2 の陽性対照) を経口チューブによって強制投与した。陰性対照群および 2 つの 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム群は 8 匹より成り、このうち 4 匹を 2~4 時間後に、残る 4 匹を 12~14 時間後に殺処分した。DMN 群 (4 匹) および AAF 群 (4 匹) をそれぞれ 2~4 時間後および 12~14 時間後に殺処分した。肝臓を摘出し、肝細胞の初代培養細胞を作成した。培養細胞を定着させるために培養した後、培地に ³H-チミジンを添加して 4 時間培養した。その後、細胞を一夜培養した後、ただちにオートラジオグラフィーのために処理した。核内に観察される正味の核細粒の数を顕微鏡下で計数した。結果から、800mg/kg bw および 2,000mg/kg bw の L-5-MTHF-Ca を摂取した場合、この試験条件下では、ラット肝における不定期 DNA 合成は増大しなかったうえに遺伝毒性活性も認められないことが明らかであった (添付資料 [21])。

iv) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムにおける小核試験 (

雄 Wister ラットにおいて標準的小核試験を行った。2,000mg/kg bw の 5-メチルテトラヒド

ロ葉酸カルシウムを、適切な陽性対照と陰性対照（5 匹/群）も含め、ラット 10 匹に経口チューブによって強制投与した。陰性対照と陽性対照の動物および試験群の 5 匹を 24 時間後に殺処分した。試験群の残りのラットは投与後 48 時間後に殺処分した。骨髓塗抹標本を作成し、小核の存在について赤血球を試験した。微小核多染性赤血球の増加は観察されなかった。このため、著者らは、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムはこの試験条件下では突然変異原性を示さないと結論付けた添付資料〔22〕。

⑦ ヒトにおける安全性に関する資料：ヒトにおける高用量耐性

15～17mg/日の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムまたはラセミ体（D,L-5-MTHF・Ca）を血液透析患者または神経科病棟患者に最長 6 か月間経口的に投与した試験で、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの高い高用量耐性の状況証拠が得られている（添付資料〔3〕、参考文献 10、21、58）。これらの試験は、もともと高用量耐性とは異なるエンドポイントに焦点を合わせた試験であったため、種々の臨床化学的なデータは報告されなかったが、試験集団は持続的な医学的監視下にあったことから、治療に応じた臨床的に明らかな有害作用が認められた場合には報告されたと推測される。

葉酸の過剰摂取は、 $\geq 5\text{mg/日}$ の摂取でビタミン B₁₂ 欠乏症患者の神経障害を促進または悪化させることを示唆する報告がある（参考文献 38、77）。しかしながら、この点から、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの LOAEL が葉酸に対して低いと予測することはできない。反対に、吸収された未代謝の葉酸分画が神経作用を媒介したとすれば、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの LOAEL または NOAEL はむしろ高いとも言えるかもしれない。

（2）体内動態に関する資料

① 天然の葉酸類の吸収

天然の食品由来の葉酸すなわちポリグルタミン酸側鎖のある還元型葉酸は、消化管より吸収される前に、まず、腸粘膜の細胞にある γ -グルタミルヒドロラーゼによってモノグルタミン酸型（還元型モノグルタミル葉酸）に加水分解される。その後、主として十二指腸において吸収される。葉酸と還元型モノグルタミル葉酸は同じ輸送系を共有すると思われ、同様の結合活性で輸送される。しかしながら、葉酸はホルミルテトラヒドロ葉酸より大幅に遅い速度で吸収されることが認められている（参考文献 29）。吸収された葉酸は腸粘膜細胞において、テトラヒドロ葉酸（THF）を経て 5-メチルテトラヒドロ葉酸に変換される。

② 葉酸の吸収

葉酸（プテロイルグルタミン酸）は 1 個のグルタミン酸残基のみを運び、このため直接吸収される。粘膜通過中に 2 段階の還元とメチル化によって 5-メチルテトラヒドロ葉酸となる。従って、その後の 5-メチルテトラヒドロ葉酸は、基本的には吸収され代謝された天然の還元型葉酸のそれと同じである。しかしながら、葉酸摂取量が 200～300 μg を上回ると、ヒト腸粘膜の代謝能の限度を越え始め、循環血中に少量の未変化の葉酸が出現する結果となる（参考文献 3、42、49、60）。15mg/日の葉酸を透析患者に 12 週間投与した結果では、未変化の葉酸は血漿中の葉酸の 65% を占めていた（参考文献 19）。

③ 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの吸収

水溶液中の 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、溶解時に 5-メチルテトラヒドロ葉酸と Ca²⁺に容易かつ完全に解離する。その後、5-メチルテトラヒドロ葉酸は吸収され、直接循環に入る。この段階で、吸収、代謝された他の天然葉酸または非天然（合成）葉酸から生成された 5-メチルテトラヒドロ葉酸とは区別できなくなる。

5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムおよび葉酸含有量の高い食品の摂取後に増加した血漿

葉酸濃度の曲線下面積（AUC）を比較することによって葉酸の相対的バイオアベイラビリティを測定することが出来る（参考文献 61）。この方法を用いて、健常女性ボランティア 21 例を対象とした無作為化二重盲検クロスオーバー試験において、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムと葉酸（それぞれ 400 μ g 葉酸/日）のバイオアベイラビリティを比較した。摂取前およびサプリメントの摂取後 1 時間毎に 8 時間、10 日間の摂取試験の前後に血漿試料を採取した。血漿葉酸濃度の測定は免疫法によった。曲線下面積（AUC）および最高血漿葉酸濃度（Cmax）の評価から、試験開始時のバイオアベイラビリティは 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの方がわずかに高かったが、摂取試験の終了時にはその差は明らかではなかった。言い換えれば、葉酸のバイオアベイラビリティは摂取期間に応じて上昇したが、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのバイオアベイラビリティは不変のままであった（参考文献 62）。

葉酸または 5-メチルテトラヒドロ葉酸を葉酸強化食品によって供給する場合、食品マトリックスからの放出がそれらのバイオアベイラビリティに影響する可能性がある。たとえば、5-メチルテトラヒドロ葉酸は葉酸結合蛋白質を含有する牛乳の葉酸より容易に吸収されることが認められている（参考文献 87）。

④ 循環系から細胞への 5-メチルテトラヒドロ葉酸の取り込み

5-メチルテトラヒドロ葉酸（モノグルタミン酸塩）は通常血漿中に見出される唯一の型の葉酸塩であり、従って、これは細胞へ取り込まれる唯一の型である。細胞内への取り込みは還元型葉酸キャリアー（RFC）および不可欠の血漿膜蛋白質である葉酸受容体によって媒介されている（参考文献 11）。

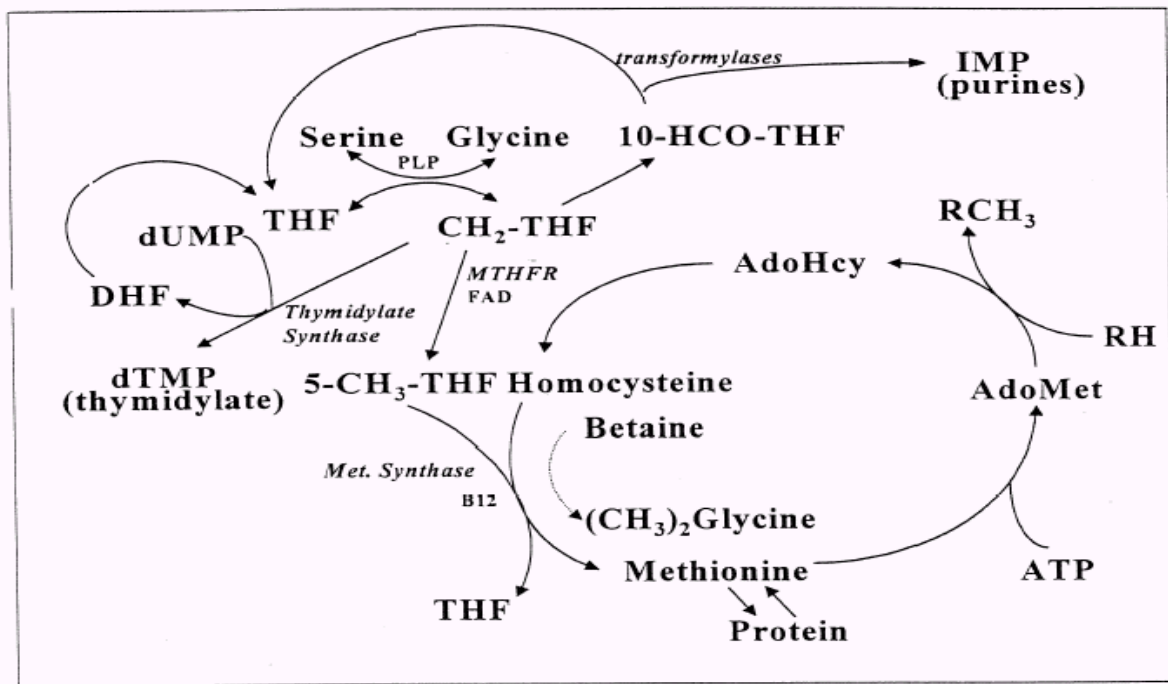
5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムおよび葉酸の有効性に関する比較試験において、妊娠可能年齢の女性に等モルの 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのサプリメント（113 μ g/日）、葉酸サプリメント（100 μ g/日）またはプラセボを 24 週間投与した。試験期間中、微生物分析を用いて血漿および赤血球中の葉酸を定期的に測定した。5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを摂取した場合と葉酸を摂取した場合とでは、摂取試験期間終了時の血漿および赤血球中の葉酸濃度は基準値より同等に上昇した。適用した用量レベルでは、平衡（飽和）には達しなかった（参考文献 84）。

⑤ 5-メチルテトラヒドロ葉酸の代謝、分布、排泄

i) 代謝：

細胞中のポリグルタミルテトラヒドロ葉酸塩（THF として）は、まずセリンから 1 炭素単位を受取り、5,10-メチレン-THF となって、これがさらに還元されて 5-メチルテトラヒドロ葉酸となる（図 5-1）。5-メチルテトラヒドロ葉酸は、単にそのメチル基をホモシステインに転移し、その結果、メチオニンと THF になる。5,10-メチレン-THF は 2 つの経路の DNA 合成において、炭素の供与体としての役割がある。まず、5,10-メチレン-THF はチミジル酸合成反応において自身の炭素を直接転移させる。更に、5,10-メチレン-THF は 10-ホルミル-THF に変化し、プリン合成経路の 2 段階で炭素の供与体として機能する。このように、葉酸は DNA 合成に本質的に関わっている。DNA 合成反応は細胞にとっての生命維持的役割であることから、葉酸欠乏は細胞生育障害（貧血症を含む）に関連している。

図 5 - 1 : メチル化反応の説明図 (Borzelleca et al., 1999: 添付資料 [1])



ii) 分布 :

葉酸が細胞（肝細胞あるいは他の細胞）に取り込まれるに際し、それらを保持させるために幾つかの機構がはたらく。細胞内への移送にあたり、葉酸塩は直ちにポリグルタミン酸へと変化を受ける（参考文献 14）。葉酸にポリグルタミン酸側鎖が導入されると、代謝トラップに資するように、多価の負荷電を帯びる。いくつかの型のポリグルタミル葉酸塩は、葉酸依存性の酵素に強く結合し、細胞保持量を増加させる。葉酸の保持メカニズムについては、更に、かなりの量の葉酸塩がミトコンドリアに移送されることにより説明される。

5-メチルテトラヒドロ葉酸は、ポリグルタミン酸化の触媒を担当する酵素である哺乳動物のホリルポリグルタミン酸合成酵素の基質には非常になり難い（参考文献 12）。従って、新たに吸収された5-メチルテトラヒドロ葉酸の細胞内保持は、主としてメチオニン合成反応（例えば、ホモシステインへメチル基を転移させ、メチオニンを得る）に利用されることによってなされる。結果として THF は、その後ポリグルタミル酸へと伸長し細胞に強く保持される。次いで、葉酸と1炭素代謝の他の局面に入る。生化学的なデータによれば、5-メチルテトラヒドロ葉酸のポリグルタミン酸は、新しく吸収された5-メチルテトラヒドロ葉酸のモノグルタミン酸が直接ポリグルタミン酸化されるのではなく、むしろ 5,10-メチレン・THF ポリグルタミン酸の還元から始まり代謝的に生成されるという視点が支持されている。2つの鍵となる酵素であるメチオニン合成酵素およびホリルポリグルタミン酸合成酵素は、5-メチルテトラヒドロ葉酸を例え多量に摂取した条件下でも、5-メチルテトラヒドロ葉酸が過度に高濃度になって蓄積しないよう代謝的に防御している。

葉酸塩の全身的な生理学は、分布および腸肝循環を含めて詳細に検討されている。ラットにおいて腸管内あるいは静脈内に投与した葉酸塩の10-20%は、最初の循環中に肝臓に取り込まれる。この事実はヒトでは直接的に調べられていないが、標識葉酸塩の経口および静脈内投与で比較すると、血漿中濃度の曲線下面積に大きな差異のあることが示され（～15倍）、これはおそらく大量の腸肝循環に伴う肝における多量の初回吸収に起因している（参考文献 61、66）。肝臓中の葉酸塩、主として5-メチルテトラヒドロ葉酸の腸肝循環は、葉酸生理学では正常で顕著な特徴である（参考文献 74、75）。葉酸は本来、5-メチルテトラヒドロ葉酸モノグルタミン酸として組織間に分布し、主に数種の血漿蛋白質に結合している。400 μg に近い葉酸（folic acid）の経口投与では、腸管および肝の代謝系にとっては過剰となり、投与用量の内の不定の画分量が、5-メチルテトラヒドロ葉酸に変換されるよりもむしろ未代謝の葉酸のまま血漿中に存在する（参考文献 42）。尿中の葉酸

塩の分析では、1 日当たり 400 μg までの投与量では、尿中の葉酸は 5-メチルテトラヒドロ葉酸であり、代謝を受けていない葉酸はほとんど、あるいは全く排泄されていない（参考文献 26）。従って、ダイエタリー・サプリメントおよび食品の栄養強化目的での 5-メチルテトラヒドロ葉酸の使用は、そのような代謝的過剰となる可能性は排除される。

腎臓は、糸球体濾過により葉酸塩を積極的に再吸収し、葉酸の保持にきわめて重大な役割を果たしている（参考文献 75）。葉酸塩の尿中排泄は、1 日当たり 200-300 μg の典型的な食事摂取による場合で、一般的に 1 日当たり 1-5 μg である（すなわち、摂取量の～1%）。尿中排泄される葉酸塩の摂取量に対する排泄率は、摂取量が 1 日当たり 400 μg あるいはそれより多くなると、顕著に増加する（参考文献 25、26）。血漿中葉酸濃度（すなわち糸球体濾過における葉酸濃度）が腎の再吸収能力を超えるとこの現象が生じる。更に、組織に保持されている新しく吸収された画分は、摂取の増加と共に下降する。結局、葉酸の摂取量にかかわらず、異化作用および糞便中排泄は排泄の主たる経路である（参考文献 26）。

食事あるいはサプリメントに由来、あるいは葉酸吸収過程で生成したいずれの 5-メチルテトラヒドロ葉酸であっても、5-メチルテトラヒドロ葉酸は肝細胞には十分に保持されない。5-メチルテトラヒドロ葉酸は主な 2 つの経路によって肝細胞から出てゆくことになる。第 1 の経路は、5-メチルテトラヒドロ葉酸が血液循環系に戻る。すなわち 5-メチルテトラヒドロ葉酸モノグルタミン酸は主な血漿中の葉酸の種類である。第 2 の経路は、胆汁を介して腸管内に逆分泌が可能なことである（参考文献 75）。全葉酸摂取の栄養学的な一般レベル（例えば、1 日当たり 400 μg 以下）で、動力学的モデルでは、分泌された胆汁中の葉酸塩の大部分が再吸収されることを示唆している（参考文献 26）。高レベルの葉酸摂取における腸肝循環に関する研究はなされていない。

iii) 排泄：

未変化の葉酸塩の尿中排泄の速度と量は、血漿中の葉酸塩レベルと相関関係にある。尿中排泄は、5-メチルテトラヒドロ葉酸の急性あるいは長期摂取における全身体への蓄積を規制する緩衝として役立っている。動力学的モデルはまた、葉酸の糞便中排泄は、直接的な評価ではないが、高レベルの摂取で増加することを示している（参考文献 26）。

（3）食品添加物の一日摂取量に関する資料

平成 18（2006）年の国民健康・栄養調査によれば、葉酸の摂取量はプテロイルモノグルタミン酸として、男性（総数）で一日当たり 314 μg 、女性（総数）299 μg 、平均（総数）306 μg となっており（添付資料〔15〕）、平成 16（2004）年に発表された日本人の食事摂取基準（2005 年版）（添付資料〔16〕）における、葉酸の食事摂取基準における成人（男女）推奨量一日当たり 240 μg を男女何れも上回っている。

平成 18（2006）年の国民健康・栄養調査より、葉酸の年齢階級別摂取量を表 5-6 に、日本人の食事摂取基準（2005 年版）より、葉酸の食事摂取基準を表 5-7 にそれぞれ示した。

表 5-6 葉酸の年齢階級別摂取量（平成 18 年国民健康・栄養調査）

	性別	総数	1-6 歳	7-14 歳	15-19 歳	20-29 歳	30-39 歳	40-49 歳	50-59 歳	60-69 歳	70 歳以上	20 歳以上（再掲）
葉酸 $\mu\text{g}/\text{日}$	総数	306	172	251	274	263	272	294	338	382	354	324
	男性	314	174	253	277	269	288	311	341	392	372	335
	女性	299	171	250	270	258	259	278	335	373	340	315

表 5-7 葉酸の食事摂取基準（2005 年版日本人の食事摂取基準）

	性別	0-11 月	1-5 歳	6-9 歳	10-11 歳	12-29 歳	30-49 歳	50-69 歳	70 歳以上	妊娠又は妊娠可能女性
葉酸 $\mu\text{g}/\text{日}$	男性	40-60	90-110	140-160	200	240	240	240	240	—
	女性	40-60	90-110	140-160	200	240	240	240	240	400

ただし、同日本人の食事摂取基準（2005）では「妊娠を計画している女性、または、妊娠の可能性がある女性は、神経管閉鎖障害のリスクの低減のために、400 μg /日の摂取が望まれる。」としているが、上記調査における 20 歳以上の女性の平均摂取量は 315 μg /日であり、妊娠又は出産可能な女性の多くはこの推奨摂取レベル（400 μg /日）には達していない。また、厚生労働省は平成 18 年 2 月、「妊産婦のための食生活指針」を発表し、その中で葉酸が神経管閉鎖障害の発症リスク低減に有用であるとして、食品からの葉酸摂取に加えて栄養機能食品などの適切な利用も勧めている（添付資料〔23〕）。

以上の通りその摂取量は、平均的には充足されているとされるが、特定の状況下若しくは対象においては、葉酸は通常の食生活の中で十分に摂取することがなかなか困難な栄養素の一つである。特に妊娠又は出産可能な女性の場合等においては、通常の食品からの葉酸摂取に加えて保健機能食品や妊産婦・授乳婦用粉乳を含む特別用途食品などの適切な利用が勧められる。

一方、食品衛生法施行規則第 21 条第 1 項第 1 号シの規定に基づく栄養機能食品表示基準及び栄養表示基準に示された「一日あたりの摂取目安量に含まれる栄養成分の上・下限値」の規格基準は、それぞれ 60 μg /日（下限値）、200 μg /日（上限値）である。従って、通常本品を栄養機能食品として葉酸の強化を行った旨の適切な表示が行われる場合には、60 μg /日～200 μg /日の範囲で使用されることとなる。ただし、疾病リスク低減表示に係る特定保健用食品にあっては、一日摂取目安量の上・下限値はそれぞれ 1,000 μg /日、400 μg /日である（添付資料〔24〕）。

6. 使用基準案に関する資料

使用基準案	5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、保健機能食品及び特別用途食品以外の食品に使用してはならない。 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、プテロイルモノグルタミン酸として一日当たり 1,000 μg を超えて使用してはならない。
-------	--

(1) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムを栄養強化を目的とした使用の場合の摂取基準(上限量)

平成 16 年 10 月に発表された「日本人の食事摂取基準(2005 年版)」において、葉酸摂取の上限量に関し、次のように報告している。

『プテロイルモノグルタミン酸の大量投与(0.35~500mg/日)によって悪影響(神経障害、発熱、じん麻疹、紅斑、そう痒症、呼吸困難)の発生が報告されている。これらはすべて悪性貧血患者を対象にしたものであるが、葉酸には明確な過剰症があり、参考データとした。一方において、妊娠可能な女性において、神経管閉鎖障害の発症及び再発を予防するために、受胎前後の 3 か月以上の間、0.36~5mg/日のプテロイルモノグルタミン酸が投与されているが、副作用が発生したという報告はない。従って、NOAEL を 5mg/日とした。この NOAEL は成人における大量摂取データを基に策定された値であるが、慢性摂取によるデータではないこと、妊婦から得られたデータであることから、上限値を 5mg/日、不確定因子(UF)を 5 とし、成人の上限量を通常の食品以外から摂取されるプテロイルモノグルタミン酸として 1,000 μg /日とした。』(添付資料 [16])

欧州食品安全委員会(SCF)は、ビタミン B₁₂ 欠乏症に対する葉酸のマスキング作用について懸念があることから、葉酸を摂取するための許容できる上限を 1mg/日に設定している(添付資料 [2])。一方、神経管欠損の最適な予防(参考文献 90)および血中ホモシステイン濃度の管理のために大量の葉酸の摂取を主張する報告もある(参考文献 86)。

なお、欧州食品安全機関は、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの、特殊栄養用途食品、サプリメントおよび一般の食品における葉酸の給源としての使用は、許容摂取量上限値を 1,000 μg /日/成人として、安全上問題ないと結論した(EFSA,2004)(添付資料 [3])。

以上のことから、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムは、葉酸と比較しビタミン B₁₂ 欠乏の場合を含めてその安全性への懸念は少ないと考えられるが、その生体利用率は食品ごとに異なることも推測されることから、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの使用の条件は質的および量的に葉酸のそれと同じであり、その範囲での使用は安全性の観点から問題なく、基本的には葉酸の使用の条件(使用基準なし)と同等でよいと考えられた。

しかしながら、5-メチルテトラヒドロ葉酸を保健機能食品および特別用途食品の葉酸強化のための給源として使用する際、栄養機能食品として葉酸の強化を行った旨の適切な表示が行われる場合には、60 μg /日(下限値)~200 μg /日(上限値)の範囲で使用されること、また、疾病リスク低減表示に係る特定保健用食品にあっては、一日摂取量の範囲は 400 μg /日~1,000 μg /日であることから、5-メチルテトラヒドロ葉酸の許容上限値を「日本人の食事摂取基準(2005 年版)」における葉酸の許容摂取量上限値 1,000 μg /成人/日(成人の許容摂取上限値：通常の食品以外から摂取されるプテロイルモノグルタミン酸として 1,000 μg /日)と同等とすることが妥当であると考え、標記の使用基準案を設定した。

(2) 使用基準案の設定根拠

- (ア) 本品を含む食品はその使用目的から、葉酸の摂取に関する安全性と有効性に関する知見に基づき、適切な量を含むことが望ましいこと。
- (イ) 本品を使用した食品は、葉酸の強化を行った旨、適切な表示が行われることが望ましいこと。
- (ウ) 専ら保健機能食品および特別用途食品において、葉酸の摂取を目的とした栄養強化食品と

して使用されること。

- (エ) 本品の許容上限値を、「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」における葉酸の許容摂取量上限値 1,000 μg /成人/日（成人の許容摂取上限値：通常の商品以外から摂取されるプロテロイルモノグルタミン酸として 1,000 μg /日）と同等とすることが妥当であるとしたこと。

以上を踏まえ、本品の使用は、保健機能食品及び特別用途食品に限るとともに、その 1 日あたりの摂取量は、「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」における、葉酸摂取の上限量 1,000 μg /日/成人と同等とすべきであるとした。

（3）葉酸と 5－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの換算

5－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムおよび葉酸（プロテロイルモノグルタミン酸）の分子量はそれぞれ以下の通りである（無水物として）。

5－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム： $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_6\text{Ca} = 497.5 \text{ g/mol}$

葉酸： $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6 = 441.4 \text{ g/mol}$

従って、葉酸 1 モル当量を摂取するための必要量は、葉酸（プロテロイルモノグルタミン酸）1 に対し、5－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムでは **1.13** となる。

なお、この許容摂取量上限値における 5－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムからの Ca^{2+} の摂取量は 0.086mg/成人/日（*）となり、これは 2300mg/人/日の Ca の許容摂取上限量（日本人の食事摂取基準 2005 年版）より有意に低い。

カルシウム 38.0

$$\begin{aligned} & 5\text{－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム } 1.13 \text{ mg} \times \frac{\text{カルシウム } 38.0}{5\text{－メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム } 497.5} \\ & = \text{カルシウム } 0.086 \text{ mg} \text{（*）} \end{aligned}$$

7. その他参考となる資料

(1) 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのラセミ体 (D,L-5-MTHF-Ca) による毒性試験
GNC (General Nutrition Corporation) および BASF (Badische Anilin & Soda Fabrik) Corporation は、400 μ g/日の D,L-5-MTHF-Ca を含むダイエタリーサプリメントを市販するに際し、米国 FDA への 75 日市販前届出として、50%の L-5-MTHF-Ca と 50%の D-5-MTHF-Ca の混合物である D,L-5-MTHF-Ca の安全性に関する資料を提出した。なお、D-5-MTHF-Ca には生理活性がないこと、すなわち、葉酸（ビタミン）として作用しないことが知られている。

その安全性評価の根拠とした毒性試験には、ラットおよびイヌにおける急性および亜慢性的毒性試験、ラットにおける 2 世代生殖毒性試験、ラットおよびウサギにおける胚毒性/催奇形性試験、ラットにおける周産期/出生後毒性試験、一組の *in vitro* 遺伝毒性試験および *in-vivo* ラット骨髄小核試験が含まれている。試験の要約、試験条件および主な結果を表 7-1 に示した。しかしながら、これらの試験の完全な報告は、何れも同社の委託試験機関 (Knoll Farmaceutici) による、言わば社内資料として公表されておらず、試験結果に関する情報は 75 日市販前届出において提供された資料情報に限られている。この情報は L-5-MTHF-Ca (またはラセミ体) の安全性評価の根拠として供するには十分詳細には述べられていないが、一方ではこのデータは、毒性または突然変異原性の徴候は適用した試験のいずれにも観察されなかったことを明らかにしていた (参考文献 20)。

表 7-1 : 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのラセミ体 (D, L-5-MTHF-Ca) の毒性試験のまとめ

試験の種類	動物種 投与方法	投与量 投与期間	結果
急性 毒性試験	ラット 経口	5,000 mg/kg bw 1 日 (単回投与)	一過性の反応は認められたが、死亡例なし。 LD ₅₀ > 2,000 mg/kg bw
亜慢性的 毒性試験	ラット 経口	0, 40, 120, 360 mg/kg bw 4 週間	無毒性量 (NOAEL) : 360 mg/kg bw
	犬 経口	0, 40, 120, 360 mg/kg bw 4 週間	臨床検査項目に異常は認められなかったが、360 mg/kg bw 群で飼料摂取量の減少。 無毒性量 (NOAEL) : 120 mg/kg bw
	ラット 経口	0, 40, 120, 360 mg/kg bw 26 週間	120 mg/kg bw、360 mg/kg bw 群で体重増加量の 減少、360 mg/kg bw 群で飼料摂取量の減少。高用 量群の終了時、血糖上昇。臓器重量、組織病理学的 異常は認められず。
	犬 経口	0, 20, 60, 180 mg/kg bw 26 週間	投与に関連した異常は認められず。 無毒性量 (NOAEL) : 180 mg/kg bw
二世世代生殖 毒性試験	ラット 経口	0, 40, 120, 360 mg/kg bw 雄：交尾前 60 日、 雌：交尾前 14 日か ら分娩後 21 日迄	交尾行動、受精能力に影響なし。雌、中等及び高 用量群で僅かな体重増。胎仔毒性或いは出生児生 存率に影響は認められない。 無毒性量 (NOAEL) : 360 mg/kg bw
胎仔毒性 試験	ラット 経口	0, 50, 150, 450 mg/kg bw 分娩後 6-15 日	母体に対する毒性は認められず、胚毒性、胎仔毒 性或いは催奇形性は認められない。 無毒性量 (NOAEL) : 450 mg/kg bw
胎仔毒性 試験	ウサギ 経口	0, 50, 150, 450 mg/kg bw 分娩後 6-18 日	高用量群で低めの体重増。母体に対する毒性は認 められず、胚毒性、胎仔毒性或いは催奇形性は認 められない。 無毒性量 (NOAEL) : 450 mg/kg bw
分娩前後観 察試験	ラット 経口	0, 40, 120, 360 mg/kg bw 雌：交尾後 15 日か ら分娩後 21 日迄	授乳期間中、高用量群で僅かに低い体重増。授乳 期間中及び授乳後の出生児の成長に影響なし。

変異原性試験	エームス試験 TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538	1, 10, 100, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (S9 mix による代謝活性化有り及び無し)	変異原性は認められない。
	染色体異常試験 (ヒト培養リンパ球)	1, 10, 100, 800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	統計学的に有意な染色体異常は認められない。
	V79細胞における遺伝子変異試験	10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (S9 mix による代謝活性化有り及び無し)	統計学的に有意な遺伝子変異は認められない。
	不定期 DNA 合成試験 (Hela 細胞)	1, 10, 100, 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (S9 mix による代謝活性化有り及び無し)	^3H -チミジンの肝細胞核への取込みの有意な増加は認められない。
	小核試験 (ラット骨髓細胞)	700 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ (静注)	投与後 17, 42 時間および 65 時間における小核細胞の有意な増加は認められない。

8. 添付資料一覧

- [1] 専門家パネル報告：一般食品およびダイエタリーサプリメントにおける L-5-メチルテトラヒドロ葉酸の使用について
- [2] 葉酸の許容上限摂取量に関する欧州食品科学委員会 (SCF) の見解
- [3] 欧州委員会の諮問に対する食品添加物・香料・加工助剤および食品接触物質 科学パネル (EFSA) の見解：L-メチル葉酸カルシウム
- [4] 改定 Directive 2001/15/EC (2006/34/EC) および改定 Directive 2002/46/EC (2006/37/EC)
- [5] 第 65 回 FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) の概要および結論
- [6] 原料および製造工程で用いられた化学物質の規格
- [7] 製造工程の管理
- [8] ICP-MS について
- [9] L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム結晶の保存安定性
- [10] 微細粒 L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム結晶の保存安定性
- [11] 食品中の食品添加物分析法解説書 (葉酸)
- [12] 食品添加物規格「葉酸」
- [13] 欧州および JECFA における 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの成分規格
- [14] L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムのビタミン錠剤、カプセルにおける安定性
- [15] 平成 18 年国民健康・栄養調査結果の概要
- [16] 日本人の食事摂取基準 (2005 年版) (葉酸)
- [17] Calcium-L-Mefolate (L-MTHF): 13 Week Oral Toxicity Study in Wistar Rats (Hamann, et al., 2001)
- [18] Metafolin: Prenatal developmental toxicity study after administration to rats (Schubert & Jacobs, 2003)
- [19] Calcium-L-Mefolate: Bacterial Mutagenicity Assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (Utesch, 1999a) (非公開)
- [20] Calcium-L-Mefolate: In vitro mammalian cell gene mutation test (L5178/TK^{+/+}) (Utesch, 2000a) (非公開)
- [21] Calcium-L-Mefolate: Measurement of unscheduled DNA synthesis in rat liver using an *in vivo* / *in vitro* procedure (Howe, 2002)
- [22] Calcium-L-Mefolate: Micronucleus test in male rats after administration (Utesch, 2000b) (非公開)
- [23] 神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について (平成 12 年 12 月 28 日児母第 72 号・健医地生発第 78 号)
- [24] 食品衛生法施行規則、栄養機能食品の規格基準および特定保健用食品の表示

9. 参考文献一覽

1. **Andersson I. and Öste R. (1992).** Loss of ascorbic acid, folacin and vitamin B12, and changes in oxygen content of UHT milk. I. Introduction and methods. *Milchwissenschaft* 47 (4): 223-302.
2. **Baik H.W. and Russell R.M. (1999).** Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 357-377.
3. **Bailey St.W., Malinow M.R., Hess D.L., Upson B.M., Graf E., Cohen M.V., Nozawa M., Alverson P.B. and Ayling J.E. (2003).** Folic acid pharmacokinetics: dose-dependent metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26 (Suppl. 1): 166.
4. **Barford P.A. and Blair J.A. (1975).** Novel urinary metabolites of folic acid in the rat. *Chem. Biol. Pteridines*: 413-427.
5. **Biodar (2000a).** Microencapsulated Ca-Mefolate Project. Final Report. Unpublished study of Bio Dar Ltd., Yavne (Israel).
6. **Biodar (2000b).** Microencapsulated Ca-mefolate project. Development Report (December 2000). Unpublished study report of Bio Dar Ltd., Yavne (Israel).
7. **Biodar (2001a).** Microencapsulated Ca-Mefolate Project. Development Report (January 2001). Unpublished study report of Bio Dar Ltd., Yavne (Israel).
8. **Biodar (2001b).** Microencapsulation of Ca-MTHF. Progress Report (March 2001). Unpublished study report of Bio Dar Ltd., Yavne (Israel).
9. **Blair J.A., Pearson A.J. and Robb A.J. (1975).** Autoxidation of 5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid. *J.C.S. Perkin II*, p. 18-21.
10. **Bostom A.G., Shemin D., Bagley P., Massy Z.A., Zanabli A., Christopher K., Spiegel P., Jacques P.F., Dworki L., and Selhub J. (2000).** Controlled comparison of L-5-methyltetra-hydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 101: 2829-2832.
11. **Brzezinska A., Winska P. and Balinska M. (2000).** Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochim. Polonica* 47: 735-749.
12. **Cichowicz, D.J. and Shane, B. (1987).** Mammalian folylpoly- γ -glutamate synthetase. 2. Substrate specificity and kinetic properties. *Biochemistry* 26: 513-521
13. **Clarke R. (1998).** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 316: 894-898.
14. **Cook, J.D., Cichowicz, D.J. George, S., Lawler, A. and Shane, B. (1987).** Mammalian folylpoly- γ -glutamate synthetase. 4. In vitro and in vivo metabolism of folates and analogues and regulation of folate homeostasis. *Biochemistry* 26: 530-539.
15. **D'Angelo A., Mazzola G., Crippa L., Fermo I. and D'Angelo S.V. (1997).** Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolic disease. *Rev. Haematologica* 82: 211-219.
16. **Day B.P.F. and Gregory J.F. (1983).** Thermal stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems. *J. Food Sci.* 48: 581-599.
17. **Duell P.B. and Malinow M.R. (1997).** Homocysteine: an important risk factor for atherosclerosis vascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 8: 28-34.
18. **Finglas, P.M. (2000).** Folate: from food to functionality and optimal health (Final Report)
19. **Ghandour H., Bagley P.J., Shemin D., Hsu N., Jacques P.F., Dworkin L., Bostom A.G. and Selhub J. (2002).** Distribution of plasma folate in hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid. *Kidney Internat.* 62: 2246-2249.
20. **GNC/BASF (1998).** 75-Day premarket notification for new dietary ingredients.

21. Godfrey P.S.A., Toone B.K., Carney M.W.P., Flynn T.G., Bottiglieri T., Laundy M., Chanarin I. and Reynolds E.H. (1990). Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet* 336: 392-395.
22. Gregory J.F., Sartain D.B. and Day B.P.F. (1984). Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *J.Nutr.* 114: 341-353.
23. Gregory J.F. (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research: Analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. *Advances in Food and Nutrition Research* 33: 1-101.
24. Gregory J.F. (1996). Vitamins. *Food Chemistry*, 3rd ed. (O.R. Fennema. ed.), M. Dekker, p. 531-532, 590-599, 610-616.
25. Gregory,J.F., Williamson, J., Bailey, L.B. & Toth, J.P.(1998a). Urinary excretion of [²H₄] folate following a single oral dose of [²H₄] folic acid is a functional index of folate nutritional status. *J. Nutr.* 128: 1907-1912.
26. Gregory,J.F., Williamson, J., Liao, J-F., Bailey, L.B. & Toth, J.P.(1998b). Kinetic model of folate metabolism in nonpregnant women consuming [²H₄] folic acid: Isotopic labeling of urinary folate and the catabolite para-acetamidobenzoylglutamate indicates slow, intake-dependent, turnover of folate pools. *J. Nutr.* 128: 1896-1906.
27. Groehn V. and Moser R. (1999). Synthesis of optically pure diastereoisomers of reduced folates. *Pteridines* 10 (3): 95–100.
28. Gutstein S., Bernstein L.H., Levy L. and Wagner G. (1973). Failure of response to N⁵-methyltetrahydrofolate in combined folate and vitamin B₁₂ deficiency. Evidence in support of the "folate trap" hypothesis. *Digest. Dis.* 18 (2): 142-146.
29. Hart D.J., Finglas P.M., Wolfe C.A., Mellon F., Wright A.J.A. and Southon S. (2002). Determination of 5-methyltetra-hydrofolate (¹³C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochem.* 305: 206-213.
30. Hasselwander O., Hönlein W., Schweillert L. and Krömer K. (2000). 5-Methyltetrahydrofolate – the active form of folic acid. *Functional Foods 2000, Conference Proceedings*, p. 48-59.
31. Hawkes J.G. and Villota R. (1989). Folate in foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 439-538.
32. Health Council of the Netherlands (2000). Risks of folic acid fortification. Publication no. 2000/21.
33. Heusener A. and v. Eberstein M. (1998a). Calcium-L-Mefolinat - Acute toxicity study in rats after oral administration (ATC method). Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland).
34. Heusener A. and v. Eberstein M. (1998b). Calcium-D/L-Mefolinat - Acute toxicity study in rats after oral administration (ATC method). Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland).
35. Heusener A. and v. Eberstein M. (1998c). Calcium-D-Mefolinat - Acute toxicity study in rats after oral administration (ATC method). Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland).
36. Heusener A. and v. Eberstein M. (1998d). Calcium-L-Mefox - Acute toxicity study in rats after oral administration (ATC method). Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland).
37. Heusener A. and v. Eberstein M. (1998e). Calcium-L-MTHPA - Acute toxicity study in rats after oral administration (ATC method). Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland).
38. IOM (2002) Institute of Medicine, Dietary reference intakes for B-vitamins and choline, Section 8 Folate, p. 196-305, National Academy Press, Wash. DC
39. Jones M.L. and Nixon P.F. (2002). Tetrahydrofolates are greatly stabilized by binding to bovine milk

- folate-binding protein. *J. Nutr.* **132**: 2690-2694.
40. **Jongejan J.A., Mager H.I.X. and Berends W. (1979).** Antioxidation of 5-alkyl-tetrahydropteridines the oxidation product of 5-methyl-THF. *The Chemistry and Biology of Pteridines* (Kisliuk R. ed.), Elsevier North Holland, p. 241-246.
 41. **Kariluoto S., Vahteristo L.T., Finglas P.M., de Meer K., Nau H. and Kehlenbach U. (2002).** Population estimates of folate intake from food analyses. *Am. J. Clin. Nutr.* **76** (3): 689-691.
 42. **Kelly P., McPartlin J., Goggins M., Weir D.G. and Scott J.M. (1997).** Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 1790-1795.
 43. **Kennelly J.C., Blair J.A. and Pheasant A.E. (1982).** The metabolism of 5-methyltetrahydropteroyl-L-glutamic acid and its oxidation products in the rat. *Biochem. J.* **206**: 373-378.
 44. **Konings E.J.M. (1999).** A validated liquid chromatographic method for the determination of folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *J. AOAC Int.* **82** (1): 119-127.
 45. **Konings E.J.M., Roomaans H.H.S., Dorant E., Goldbohm R.A., Saris W.H.M., and Van den Brandt P.A. (2001).** Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 765-76.
 46. **Lamers Y., Prinz-Langenohl R., Moser R. and Pietrzik K. (2003).** [6S]-5-methyltetrahydrofolate is as effective as folic acid in lowering plasma total homocysteine. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26** (Suppl. 1), p. 10.
 47. **Leichter J., Switzer V.P. and Landymore A.F. (1978).** Effect of cooking on folate content of vegetables. *Nutr. Rep. Int.* **18**: 475-479.
 48. **Loehrer F.M.T., Angst Ch.P., Haefeli W.E., Jordan P.P., Ritz R. and Fowler B. (1996).** Low whole-blood S-adenosyl-methionine and correlation between 5-methyltetrahydrofolate and homocysteine in coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 727-733.
 49. **Lucock M., Wild J., Smithells R. and Hartley R. (1989).** Biotransformation of pteroylmonoglutamic acid during absorption: implications of Michaelis-Menten kinetics. *Eur. J. Clin. Nutr.* **43**: 631-635.
 50. **Mnkeni A.P. and Beveridge T. (1982).** Thermal destruction of pteroylglutamic acid in buffer and model food systems. *J. Food Sci.* **47** (6): 2038.
 51. **Mnkeni A.P. and Beveridge T. (1983).** Thermal destruction of 5-methyltetrahydrofolic acid in buffer and model food systems. *J. Food Sci.* **48**: 595-599.
 52. **Müller H. (1993a).** Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Gemüse und Obst mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **196**: 137-141.
 53. **Müller H. (1993b).** Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Lebensmitteln tierischer Herkunft mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **197**: 518-521.
 54. **O'Broin J., Temperley I.J., Brown J.P. and Scott J.M. (1975).** Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **28**: 438-444.
 55. **Osseyi E.S., Wehling R.L. and Albrecht J.A. (2001).** HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. *Cereal Chem.* **78** (4): 375-378.
 56. **Paine-Wilson B. and Chen T.-S. (1979).** Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. *J. Food Sci.* **44**: 717-722.
 57. **Pawlosky R.J., Flanagan V.P. and Doherty R.F. (2003).** A mass spectrometric validated high-performance liquid chromatography procedure for the determination of folates in foods. *J. Agric. Food Chem.* **51** (13): 3726-3730.
 58. **Perna A.F., Ingrosso D., De Santo N.G., Galetti P., Brunone M. and Zappia V. (1997).** Metabolic

- consequences of folate-induced reduction of hyperhomocysteinemia in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**: 1899-1905.
59. Pfeiffer C.M., Rogers L.M. and Gregory J.F. (1997). Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 407-413.
 60. Priest D.G., Schmitz J.C. and Bunni M.A. (1999). Accumulation of plasma reduced folates after folic acid administration. *Semin. Oncol.* **26** (Suppl. 6): 38-41.
 61. Prinz-Langenohl R., Brönstrup A., Thorand B., Hages M. and Pietrzik K. (1999). Availability of food folate in humans. *J. Nutr.* **129** (4): 913-916.
 62. Prinz-Langenohl R., Lamers Y., Moser R. and Pietrzik K. (2003). Effect of folic acid preload on the bioequivalence of [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid in healthy volunteers. *J. Inher. Metab. Dis.* **26** (Suppl. 1): 124.
 63. Quéré I., Perneger T.V., Zittoun J., Bellet H., Gris J.-Ch. Daurès J.-P. Schved J.-F., Mercier E., Laroche J.-P. Dazat M., Bounameaux H., Janbon C. and De Moerloose P. (2002). Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* **359**: 747-752.
 64. Rader J.I., Weaver C.M. and Angyal G. (1998). Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chem.* **62** (4): 451-465.
 65. Ratanasthien K., Blair J.A., Leeming R.J., Cooke W.T. and Melikian V. (1977). Serum folates in man. *J. Clin. Path.* **30**: 438-448.
 66. Rogers, L.M., Pfeiffer, C.M., Bailey, L.B. and Gregory, J.F. (1997). A dual-label stable-isotopic protocol is suitable for determination of folate bioavailability: Evaluation of urinary excretion and plasma folate kinetics of intravenous and oral doses of [¹³C₅] and [²H₂] folic acid. *J. Nutr.* **127**: 2321-2327.
 67. Rothenberg S.P. (1999). Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. *Seminars in Hematology* **36**: 65-74.
 68. SCF (1993). Nutrient and energy intakes for the European Community. Reports of the Scientific Committee for Food, thirty-first series.
 69. Scott, J.M. (2001). Methyltetrahydrofolate: the superior alternative to folic acid. In: *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*, Vol. **6** (Kramer, K., Hoppe, P.-P. and Packer, L. eds.), Marcel Dekker, Inc., p. 75-90.
 70. Scott J.M. and Weir D.G. (1981). The methyl folate trap. *Lancet* **15**: 337-340.
 71. Selhub J. (1999). Homocysteine metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* **19**: 217-246.
 72. Selhub J., Gregory J.F. and Glinsmann W. (2001). Nutritional functions and safety of consumption of L-5-methyltetrahydrofolate the naturally occurring predominant form of dietary folate and its vital role in folate physiology. Unpublished review of the scientific literature prepared for Merck KGaA, Darmstadt (Germany).
 73. Seyoum E. and Selhub J. (1993). Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate. *J. Nutr. Biochem.* **4**: 488-494.
 74. Steinberg, S.E., Cambell, C. and Hillman, R.S. (1979). Kinetics of the normal folate enterohepatic cycle. *J. Clin. Invest.* **64**: 83-88.
 75. Steinberg, S.E. (1984). Mechanism of folate homeostasis. *Am. J. Physiol.* **246**: G319-G324.
 76. Thomas P.M., Flanagan V.P. and Pawlosky R.J. (2003). Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid and

- folic acid in citrus juices using stable isotope dilution-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51** (5): 1293-1296.
77. **UK Expert Group on Vitamins and Minerals (2003)**. Safe upper levels for vitamins and minerals. p. 42-50.
 78. **Utesch D. (1999b)**. Calcium-D/L-Mefolinat - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公開)
 79. **Utesch D. (1999c)**. Calcium-D-Mefolinat - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公開)
 80. **Utesch D. (1999d)**. Calcium-L-Mefox - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公開)
 81. **Utesch D. (1999e)**. Calcium-L-MTHPA - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公開)
 82. **Vahteristo L.T., Lehtikainen K.E., Ollilainen V., Koivistoinen P.E. and Varo P. (1998)**. Oven-baking and frozen storage affect folate vitamers retention. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **31**: 329-333.
 83. **Van Lieshout M., West C.E., Muhilal, Permaesih D., Wang Y., Xu X., van Breemen R.B., Creemers A.F.L., Verhoeven M.A. and Lugtenburg J. (2001)**. Bioefficacy of β -carotene dissolved in oil studied in children in Indonesia. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 949-958.
 84. **Venn B.J., Green T.J., Moser R., McKenzie J.E., Skeaff C.M. and Mann J. (2002)**. Increases in blood folate indices are similar in women of childbearing age supplemented with [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid. *J. Nutr.* **132** (11): 3353-3355.
 85. **Venn B.J., Green T.J., Moser R. and Mann J.I. (2003)**. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 658-662.
 86. **Verhaar M.C., Strokes E. and Rabelink T.J. (2002)**. Folate and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22** (1): 6-13.
 87. **Verwei M., Arkbage K., Havenaar R., Van den Berg H., Witthöft C. and Schaafsma G. (2003)**. Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J. Nutr.* **133**: 2377-2383.
 88. **Viberg U., Jägerstad M., Öste R. and Sjöholm I. (1997)**. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen. *Food Chem.* **59** (3): 381-386.
 89. **Vollset St.E., Refsum H., Tverdal A., Nygard O., Nordrehaug J.E., and Ueland P.M. (2001)**. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the hordaland homocysteine study. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 130-136.
 90. **Wald N.J., Law M.R., Morris J.K. and Wald D.S. (2001)**. Quantifying the effect of folic acid. *Lancet* **358**: 2069-2073. Erratum in: *Lancet* 2002, **359**: 630.
 91. **White D.R., Lee H.S. and Krüger R.E. (1991)**. Reversed-phase HPLC/EC determination of folate in citrus juice by direct injection with column switching. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 714-717.
 92. **Williams P.G., Ross H. and Brand Miller C. (1995)**. Ascorbic acid and 5-methyltetrahydrofolate losses in vegetables with cook/chill or cook/hot-hold foodservice systems. *J. Food Sci.* **60**: 541-546.