

(案)

## 添加物評価書

# 5-メチルテトラ ヒドロ葉酸カルシウム

2008年10月

食品安全委員会添加物専門調査会

## 目次

|                                            | 頁  |
|--------------------------------------------|----|
| ○審議の経緯 .....                               | 3  |
| ○食品安全委員会委員名簿 .....                         | 3  |
| ○食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿 .....               | 3  |
| ○要 約 .....                                 | 4  |
| I. 評価対象品目の概要 .....                         | 5  |
| 1. 用途 .....                                | 5  |
| 2. 化学名 .....                               | 5  |
| 3. 分子式 .....                               | 5  |
| 4. 分子量 .....                               | 5  |
| 5. 構造式 .....                               | 5  |
| 6. 性状等 .....                               | 6  |
| 7. 評価要請の経緯 .....                           | 6  |
| 8. 添加物指定の概要 .....                          | 6  |
| II. 安全性に係る知見の概要 .....                      | 7  |
| 1. 体内動態（吸収、分布、代謝、排泄） .....                 | 7  |
| (1) 吸収 .....                               | 7  |
| (2) 代謝及び分布 .....                           | 8  |
| (3) 排泄 .....                               | 9  |
| 2. 毒性 .....                                | 10 |
| (1) 急性毒性 .....                             | 10 |
| (2) 反復投与毒性 .....                           | 10 |
| (3) 発がん性 .....                             | 10 |
| (4) 発生毒性 .....                             | 10 |
| (5) 遺伝毒性 .....                             | 11 |
| 3. ヒトにおける知見 .....                          | 12 |
| (1) 高用量摂取に関する知見 .....                      | 12 |
| (2) 発がんとの関連性 .....                         | 12 |
| (3) 抗原性 .....                              | 13 |
| (4) 遺伝的背景との関連性 .....                       | 13 |
| 4. 一日摂取量の推計等 .....                         | 13 |
| (1) わが国における評価 .....                        | 13 |
| (2) 米国における評価 .....                         | 14 |
| (3) EU における評価 .....                        | 14 |
| III. 国際機関等における評価 .....                     | 15 |
| 1. JECFA における評価 .....                      | 15 |
| 2. ビタミンとミネラルの必要量に関する FAO/WHO 合同専門家会議における評価 |    |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| .....                                   | 15 |
| 3. FDA における評価 .....                     | 15 |
| 4. EU における評価 .....                      | 16 |
| 5. わが国における評価 .....                      | 17 |
| <別紙 1：製造工程に伴う副生成物> .....                | 19 |
| <別紙 2：略称一覧表> .....                      | 21 |
| <別紙 3：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム 安全性試験結果> ..... | 22 |
| <参照> .....                              | 24 |

1  
2  
3 <審議の経緯>

4 2007 年 8 月 2 日 厚生労働大臣から添加物の指定に係る食品健康影響評価につ  
5 いて要請（厚生労働省発食安第 0802002 号）、関係書類の接受  
6 2007 年 8 月 9 日 第 202 回食品安全委員会（要請事項説明）  
7 2008 年 10 月 21 日 第 63 回添加物専門調査会  
8  
9

10 <食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）  
小泉 直子（委員長代理）  
長尾 拓  
野村 一正  
畑江 敬子  
廣瀬 雅雄  
本間 清一

11  
12 <食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

| (2007 年 9 月 30 日まで) | (2007 年 10 月 1 日から) |
|---------------------|---------------------|
| 福島 昭治（座 長）          | 福島 昭治（座 長）          |
| 山添 康（座長代理）          | 山添 康（座長代理）          |
| 石塚 真由美              | 石塚 真由美              |
| 井上 和秀               | 井上 和秀               |
| 今井田 克己              | 今井田 克己              |
| 江馬 眞                | 梅村 隆志               |
| 大野 泰雄               | 江馬 眞                |
| 久保田 紀久枝             | 久保田 紀久枝             |
| 中島 恵美               | 頭金 正博               |
| 西川 秋佳               | 中江 大                |
| 林 眞                 | 中島 恵美               |
| 三森 国敏               | 林 眞                 |
| 吉池 信男               | 三森 国敏               |
|                     | 吉池 信男               |

<参考人>

瀧本 秀美  
森田 明美

## 要 約

強化剤に使用される添加物「5 - メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム」(CAS 番号 : 151533-22-1) について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績は、反復投与毒性、発がん性、発生毒性、遺伝毒性等である。

# I. 評価対象品目の概要

## 1. 用途

強化剤

## 2. 化学名 (参照 添付資料 3、13)

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

一般名：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム<sup>1</sup>

[calcium 5-methyl tetrahydrofolate, L-5-MTHF-Ca]

L-5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム

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

(6*S*)-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

CAS 番号：151533-22-1

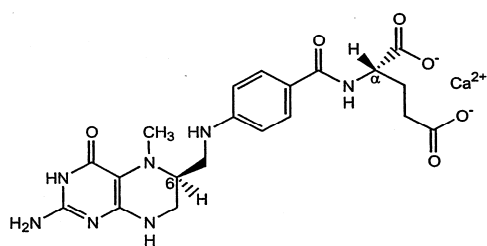
## 3. 分子式 (参照 添付資料 3、13)

C<sub>20</sub>H<sub>23</sub> N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> Ca

## 4. 分子量 (参照 添付資料 3、13)

497.5 (無水物として)

## 5. 構造式 (参照 添付資料 3、13)



本品には様々な不純物が混在し、成分規格 (案) において D-5-MTHF ((6*R*)-ジアステレオ異性体<sup>2</sup>) を 0.1% 以下、その他の葉酸及び関連物質 (不純物) を 2.5% 以下と定められている<sup>3</sup>。(参照 別紙 1)

<sup>1</sup> 以下 L-5-MTHF-Ca と略す。

<sup>2</sup> 生物学的に不活性な、L-5-MTHF-Ca の光学異性体である。(参照 添付資料 3)

<sup>3</sup> 葉酸は狭義にはプテロイル (モノ) グルタミン酸を指し、現在、わが国において食品添加物として用いられているものである。広義には葉酸活性を有する類似構造物の総称として用いられる (参照 追 1)。本評価書では、葉酸の一般的記述において、葉酸そのものを示す場合を除き、葉酸類と表記した。

## 6. 性状等（参照 添付資料 1、3、13）

本品は、白色～淡黄色の結晶性粉末で、臭いはほとんどない。0.5%水溶液の pH は 6.5～7.5 である。水にやや溶けやすく、有機溶媒にはごくわずか、又はほとんど溶けない。アルカリ溶液に溶けやすい。融点は 300℃以上（分解）である。

## 7. 評価要請の経緯

葉酸はホルミル基あるいはメチル基等の 1 炭素単位の炭素移転反応に関与する酵素の補酵素として、プリン、ピリミジンの生合成（DNA 合成）、アミノ酸代謝、タンパク質合成などに関与し、生体の組織細胞の発育及び機能を正常に保つために必要である。わが国では、葉酸が、1957 年に食品添加物として指定され、栄養強化の目的での使用が認められている。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り、日本人の食事摂取基準（2005 年版）において葉酸の推奨量や上限量が定められている。葉酸の欠乏は、細胞分裂の盛んな骨髄細胞等での DNA 合成を阻害し、成熟障害を起こす。葉酸欠乏症の代表例としては、巨赤芽球性貧血（悪性貧血）や白血球減少症が知られており、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症の血液学的徴候と類似する（参照 追 1）。また、葉酸は、胎児における神経管閉鎖障害の発症リスクの低減にも有用であるとされている（参照 添付資料 16）。

L-5-MTHF は食品中に主に存在する還元型の葉酸化合物であり（参照 45）、葉酸の代謝によっても生成される。L-5-MTHF-Ca の有用性及び必要性について要請者は、生物学的有効性<sup>4</sup>が葉酸と同等かより高いと予測されること、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症による血液学的徴候を隠蔽する可能性のないことを挙げている。後者について要請者は、葉酸を摂取すればビタミン B<sub>12</sub> の欠乏があっても血液学的徴候は改善され、ビタミン B<sub>12</sub> の欠乏が見逃されてしまうが、L-5-MTHF-Ca を摂取した場合は、血液学的徴候の改善にビタミン B<sub>12</sub> は必須であることから血液学的徴候が改善することがないため、ビタミン B<sub>12</sub> の欠乏が見逃されて治療の機会を失ったり、神経学的症状の悪化を進行させたりする懸念がないと考えている（参照 84、図 1）。

今回、厚生労働省は、事業者から葉酸の代替物質として L-5-MTHF-Ca の食品添加物指定等に係る要請がなされたことから、指定等の検討を開始するに当たり、食品安全基本法に基づき、食品安全委員会に対し、L-5-MTHF-Ca に係る食品健康影響評価が依頼されたものである。

## 8. 添加物指定の概要

L-5-MTHF-Ca の使用基準及び成分規格について検討した上で、新たに添加物として指定しようとするものである。なお、厚生労働省は、使用基準案を、「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ず、また、プロイ

<sup>4</sup> 摂取した栄養が吸収された後活性型の栄養素に変換される効率として定義される。（参照 83）

ルモノグルタミン酸として一日あたり 1,000 µg を超えて使用してはならない。」  
としている。

なお、本品に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、一日あたり 60 µg（下限値）～200 µg（上限値）の範囲で使用されることとなり、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、一日摂取目安量の上限値<sup>5</sup>は 1,000 µg であり、いずれの場合も使用基準案を超えない。

## II. 安全性に係る知見の概要

### 1. 体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）

L-5-MTHF-Ca は、溶解時あるいは吸収時に容易に L-5-MTHF に解離すると予測されることから、体内動態については、L-5-MTHF-Ca の他、葉酸及び L-5-MTHF のデータを基に、L-5-MTHF-Ca の挙動を検討することとした。

#### （1）吸収（参照 添付資料 1）

葉酸の吸収率は 50～75% であると示唆されている。（参照 77）

#### ①L-5-MTHF-Ca の吸収（参照 添付資料 3）

L-5-MTHF-Ca は、溶解すると L-5-MTHF と  $\text{Ca}^{2+}$  に容易に解離する。その後、L-5-MTHF のまま吸収され、直接血液循環に入る。

健常女性（21 例）を対象とした無作為化二重盲検交差試験において、事前に葉酸（1 mg/日）を 10 日間投与した群（前処置群）、前処置をしない群にそれぞれ等モルの L-5-MTHF（416 µg/日）あるいは葉酸（400 µg/日）を単回経口摂取させ、摂取前及び摂取後 1 時間毎に 8 時間後までの血漿試料を採取し、各群の AUC を比較した。葉酸の前処置をした群では、L-5-MTHF と葉酸の生物学的利用率はほぼ同じであったが、前処置をしなかった群では、L-5-MTHF の生物学的利用率は葉酸より高かった。（参照 62）

妊娠可能年齢の女性（18-49 歳、104 名）に等モルの L-5-MTHF-Ca（113 µg/日）あるいは葉酸（100 µg/日）を含有するサプリメントまたはプラセボを 24 週間投与した。試験期間中、血漿及び赤血球中の葉酸を定期的に測定した。試験終了時の血漿中及び赤血球中の葉酸濃度の上昇は、L-5-MTHF-Ca を摂取した場合と葉酸を摂取した場合で同じ程度であった。なお、この試験で用いた投与量では、血漿中及び赤血球中の葉酸濃度は平衡（飽和）に達しなかった。（参照 84）

#### ②循環系から細胞への L-5-MTHF の取り込み

L-5-MTHF は細胞へ取り込まれ、通常血漿中に見出される主な葉酸類である。

<sup>5</sup> 以下、許容上限摂取量（UL）という。



細胞内への取り込みは還元型葉酸キャリアー及び葉酸受容体としての血漿膜タンパク質を介して行われる。(参照 添付資料 3、11)

## (2) 代謝及び分布 (参照 添付資料 1、図 1)

### ①葉酸類の腸内での代謝

天然に存在する葉酸は植物、動物およびヒトの組織中、食品中に見出され、通常 5~7 個のグルタミン酸残基から成るポリグルタミン酸側鎖を有する。腸粘膜の刷子縁膜にある $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼによってモノグルタミン酸型(プテロイルモノグルタミン酸)に加水分解された後、大部分は小腸基部から葉酸受容体を介して腸粘膜細胞内にとりこまれ、2 段階の還元とメチル化を経て L-5-MTHF となる。(参照 75)

天然由来でないモノグルタミン酸型の葉酸は 1 個のグルタミン酸残基のみを有し、腸粘膜から直接吸収された後、天然由来の葉酸と同様に、腸粘膜細胞内で 2 段階の還元とメチル化を経て L-5-MTHF となる。(参照 75)

### ②腸肝循環

葉酸は上述の経路を経て主に L-5-MTHF へと変換された後に肝臓に運ばれ、血液循環に入るか、あるいは胆汁中に分泌され、一部は腸管での再吸収が行われる(腸肝循環)。(参照 25、66、74、75)

ラットにおいて腸管内あるいは静脈内に投与したモノグルタミン酸型の L-5-MTHF は、初回通過での 10~20%が肝臓に取り込まれる(参照 75)。また、栄養学的に一般的な葉酸の摂取量(1 日あたり 400  $\mu$ g 以下)では、胆汁中に分泌された葉酸類の大部分が再吸収されることが示唆されている(参照 25)。

### ③細胞内での保持及び代謝

細胞にとりこまれた葉酸類はポリグルタミン酸型となって保持される。ポリグルタミン酸側鎖が導入されると、多価の負電荷を帯び、葉酸依存性の酵素に強く結合して代謝がなされる。(参照 14)

細胞内でポリグルタミン型となったテトラヒドロ葉酸化合物(以下 THF と略す)は、5,10-メチレン-THF となり、さらに還元されて L-5-MTHF となる。L-5-MTHF は、ビタミン B<sub>12</sub> 存在下でメチル基をホモシステインに転移し、結果としてメチオニンと THF が生成する(メチオニン合成反応)。THF 等の葉酸類は、炭素の供与体として DNA 合成に関与する。(参照 30、69、70、71)

### ④体内における葉酸類の濃度

体内の葉酸類の約半分が主に肝臓に存在する。(参照 75、77)

体内における葉酸類濃度としては通常、血清中あるいは赤血球中の葉酸類が測定される。血清中の葉酸類は短期における葉酸の摂取状態を示し、通常 5~16 ng/mL (11~36 nmol/L 葉酸活性)である。赤血球中の葉酸類の濃度はより

安定した長期における状態を表し、通常 140 ng/mL (317 nmol/L 葉酸活性) 以下であれば、体内での蓄積量の減少を意味する。なお、体内で検出される葉酸類は、主に L-5-MTHF である。(参照 77)

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、未変化のまま循環血中に出現する量が増加する (参照 3、42、49、60)。15 mg/日の葉酸を透析患者に 12 週間投与した結果では、未変化体は血漿中の葉酸類の 65% を占めていた (参照 19)。

### (3) 排泄

非妊娠女性 (各群 5~6 名) が 1 日あたり葉酸 200 または 300 µg を典型的な食事摂取により 10 週間摂取した場合、葉酸類の尿中排泄は、1 日あたり約 1~5 µg である。(参照 25、26、添付資料 1)

尿中排泄される葉酸類の摂取量に対する割合は、摂取量が 1 日あたり 400 µg あるいはそれより多くなると顕著に増加し (参照 25、26)、腎の再吸収能力を超過していると推察される。(参照 25、添付資料 1)

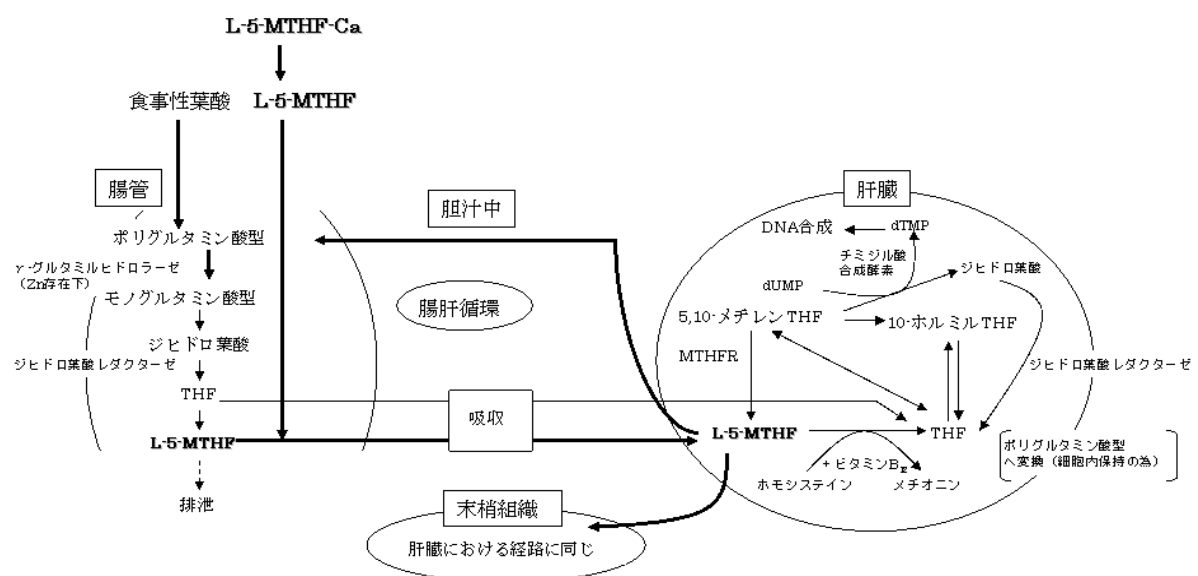


図 1. 葉酸の吸収と腸肝循環及び細胞内代謝 (参照 69、75、Merck Eprova AG 社資料改変<sup>6)</sup>)

## 2. 毒性

L-5-MTHF-Ca の急性毒性、反復投与毒性、発生毒性及び遺伝毒性について以下の報告がある。

### (1) 急性毒性

7～8 週齢の絶食 Hsd Cpb: WU ラット（雌雄各 3 匹）に、L-5-MTHF-Ca（純度 97.0%、2,000 mg/kg 体重/日）を強制経口投与した。投与後 4 時間後から再び給餌し、その後 15 日間観察した後、屠殺、剖検し、肉眼的観察を行った。LD<sub>50</sub> は 2,000 mg/kg 体重以上であった。（参照 33、添付資料 3）

以下の主な不純物及び酸化誘導体（参照 別紙 1）について、試験を行ったところ、LD<sub>50</sub> はいずれも 2,000 mg/kg 体重以上であった。

- 純度 96.2% の D,L-5-MTHF-Ca
  - 純度 97.2% の D-5-MTHF-Ca
  - 純度 97.5% の L-Mefox-Ca（L-5-MTHF の *s*-トリアジン誘導体）
  - 純度 98.6% の L-MTHPA-Ca（L-5-MTHF の加水分解産物）
- （参照 34、35、36、37）

### (2) 反復投与毒性

雌雄の Wistar ラット（各群各 10 匹）に、L-5-MTHF-Ca（0、25、100、400 mg/kg 体重/日）を 1 日 1 回 13 週間強制経口投与した。対照群及び最高用量投与群では別に雌雄各 5 匹を追加し、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。

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、全ての動物が剖検まで生存した。体重、機能観察バッテリー試験結果、自発運動試験結果、摂餌量、血液学的所見、臓器重量、病理組織学的所見に、被験物質投与による影響は認められなかった。最高用量投与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（AST）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）及びクレアチンキナーゼ（CK）の濃度が有意に低下したが、雌では低下しなかった。

著者らは、認められた酵素濃度の低下には用量相関性がないこと、生物学的誤差と考えられたこと、4 週間後には回復し認められなかったことなどから、NOAEL は 400 mg/kg 体重/日であると考えている。（参照 添付資料 17）

### (3) 発がん性

L-5-MTHF-Ca の発がん性に関する試験は行われていない。

### (4) 発生毒性

Wistar ラット（各群各 22～24 匹）の妊娠 5 日から 19 日に、L-5-MTHF-Ca（0、100、300、1,000 mg/kg 体重/日）を強制経口投与し、妊娠 20 日に妊娠ラットを帝王切開して胎児を調べた。1,000 mg/kg 体重/日の母ラットでわずかな飲水量の増加がみられたが、その他、母ラットの一般症状、体重、摂餌量、に被験物質投与による影響はみられなかった。着床数、胚/胎児死亡数及び率、

生存胎児数、胎児体重、胎児の性比、胎児の形態学的所見に投与に起因する変化は認められなかった。(参照 添付資料 18)

## (5) 遺伝毒性

遺伝毒性試験のうち、安全性評価に採用できると考えられる試験を以下にまとめた。

### ①復帰突然変異試験

L-5-MTHF-Ca について、細菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP 2 uvr A pKM101) を用いた復帰突然変異試験 (最高濃度 5,000 µg/plate) では、S9 mix の有無にかかわらず陰性であった。(参照 添付資料 19)

以下の主な不純物及び酸化誘導体 (参照 別紙 1) について復帰突然変異試験を行ったところ、S9 mix の有無にかかわらず、いずれも陰性であった。(参照 78、79、80、81)

- 純度 96.2% の D,L-5-MTHF-Ca
- 純度 97.2% の D-5-MTHF-Ca
- 純度 97.5% の L-Mefox-Ca (L-5-MTHF のピラジノ-*s*-トリアジン誘導体)
- 純度 98.6% の L-MTHPA-Ca (L-5-MTHF の加水分解産物)

### ②遺伝子突然変異試験

L-5-MTHF-Ca (純度 97.2% : 最高濃度 5,000 µg/mL) を用いたマウスリンパ腫チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子突然変異分析が、S9 mix 存在下及び非存在下で行われた。

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。また、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、高い濃度の順番に上から 3 つの濃度 (1,580、2,810 及び 5,000 µg/mL) において細胞毒性が観察された。相対的増殖率 (RTG) がそれぞれ対照の 13% および 4% に低下した上から 2 つの濃度条件下では、突然変異の発生頻度は 2 倍以上に上昇した。S9 mix の存在下及び非存在下での実験で異なる結果が得られた原因について、暴露時間の相違によるものかどうかを明らかにするため、S9 mix の非存在下で暴露時間を 3 時間または 24 時間とし、発現期間を 3 日間に延長して追加試験を行った。

S9 mix の非存在下における最初の試験と追加試験との間で細胞毒性に差は認められなかった。暴露時間が 3 時間の試験では、陰性であった。暴露時間が 24 時間の試験では、最高用量でのみ陽性であったが、RTG は対照の 0.2% であった。(参照 添付資料 20)

### ③不定期 DNA 合成試験

雄の Wistar ラット（陰性対照群及び試験群：各 8 匹、陽性対照群：各 4 匹）にヒドロキシプロピルメチルセルロース（賦形剤対照、0.25%）、2-アセトアミド-フルオレン（2-AAF）（第 1 の陽性対照、75 mg/kg 体重）、ジメチルニトロサミン（DMN）（第 2 の陽性対照、10 mg/kg 体重）並びに L-5-MTHF-Ca（純度 99%、800 mg/kg 体重及び 2,000 mg/kg 体重）を強制経口投与した。陰性対照群及び L-5-MTHF-Ca 投与群では 2～4 時間後に 4 匹を、残る 4 匹を 12～14 時間後に屠殺した。DMN 群（4 匹）及び AAF 群（4 匹）を、それぞれ 2～4 時間後及び 12～14 時間後に屠殺した。L-5-MTHF-Ca を投与群において、ラット肝での不定期 DNA 合成は増大しなかった。（参照 添付資料 21）

### ④小核試験

雄の Wistar ラット（10 匹）に、L-5-MTHF-Ca（最高用量 2,000 mg/kg 体重）を強制経口投与した。陰性対照群、陽性対照（シクロホスファミド）群及び試験群の各 5 匹を 24 時間後に屠殺した。試験群の残りのラットは投与後 48 時間後に屠殺した。試験群の結果は陰性であった。（参照 添付資料 22）

以上より、突然変異試験において高用量で弱い遺伝毒性が認められたが、不定期 DNA 合成試験及び *in vivo* 小核試験において陰性であることから、本物質には生体にとって特段問題となるような遺伝毒性はないものと考えられた。

## 3. ヒトにおける知見

### （1）高用量摂取に関する知見

L-5-MTHF-Ca または D,L-5-MTHF-Ca（15～17 mg/日）を血液透析患者、うつ病あるいは統合失調症の患者に 2 ヶ月間から最長 6 ヶ月間経口投与した複数の試験で、L-5-MTHF-Ca の高い高用量耐性が示唆されている。L-5-MTHF-Ca の安全性評価を目的とした試験ではないが、臨床において有害作用が認められたとの記載はない。（参照 10、21、58、添付資料 3、添付資料 5）

葉酸の 5 mg/日以上以上の摂取で、ビタミン B<sub>12</sub> の欠乏した悪性貧血患者において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。（参照 38、77）

一方で、神経管閉鎖障害の最適な予防（参照 90）や心血管系疾患のリスク因子として知られる血中ホモシステイン濃度の管理（参照 86）のために、高用量の葉酸の摂取を主張する報告もある。

### （2）発がんとの関連性

葉酸には、動物試験の結果から、腸管のがんに対する抑制または促進作用があるといわれている。最近、食品以外から葉酸を 400 µg/日以上長期間摂取したヒトにおける結腸がん、乳がん等の発生リスクの低下または上昇に関する複数の疫学調査結果が報告されている。（参照 追 2）

### (3) 抗原性

L-5-MTHF は、食品中に生じる天然の葉酸類のうちの主な還元型の葉酸化合物であり、また、通常血漿中に見出される主な葉酸化合物である。すなわち、L-メチル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、抗原性を示すことがない。従って、生体は当該物質を生体の成分として認識しており、過敏症が発現する可能性は極めて低いと考えられる。

### (4) 遺伝的背景との関連性

5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）の変異がホモ型である場合、野生型に比べてこの酵素活性が低下し、結果的に血漿中の葉酸類濃度が低下し、心血管疾患の危険因子といわれるホモシステイン濃度の上昇がみられたとの報告がある。また、440 µg/日を超える葉酸を摂取した場合に、チミジル酸合成酵素（TS）遺伝子のエンハンサー領域の繰り返し配列数により、結腸直腸腺腫のリスクが異なることも報告されている。（参照 添付資料 5）

## 4. 一日摂取量の推計等

### (1) わが国における評価

平成 18 年国民健康・栄養調査によれば、葉酸の摂取量は葉酸として、一日あたり男性で 314 µg、女性で 299 µg、平均で 306 µg である。これは、「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」における成人（男女）推奨量である一日あたり 240 µg を男女いずれにおいても上回っている。（参照 添付資料 15）

ただし、同基準では「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（通常の食品以外からの摂取）が望まれる。」としているが（参照 添付資料 16）、上記調査における 20 歳以上の女性の平均摂取量は 315 µg であり（参照 添付資料 15）、妊娠又は出産可能の女性の多くでこの推奨摂取量（400 µg/日）には達していないと考えられる。

なお、この許容摂取上限量における L-5-MTHF-Ca からの  $\text{Ca}^{2+}$  の摂取量は 0.086 mg/成人/日<sup>7</sup> となり、これは「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」に定められた Ca の許容摂取上限量<sup>8</sup> である 2,300 mg/人/日の範囲内である。（参照 添付資料 16）

<sup>7</sup> 葉酸と L-5-MTHF-Ca の換算において、L-5-MTHF-Ca 及び葉酸の分子量はそれぞれ 497.5 及び 441.4 である。したがって、葉酸 1 モル当量を摂取するための必要量は、葉酸 1 に対し、L-5-MTHF-Ca では 1.13 となる。

$\text{L-5-MTHF-Ca } 1.13 \text{ mg} \times (\text{Ca } 38.0 / \text{L-5-MTHF-Ca } 497.5) = \text{Ca } 0.086 \text{ mg}$

<sup>8</sup> 2005 年版日本人の食事摂取基準において、「上限量は十分な研究報告がないため、17 歳以下では定めない。しかし、これは、多量摂取を勧めるものでも、多量摂取の安全性を保障するものでもない。」とされている。

## （２）米国における評価

全米科学アカデミーの米国医学学会（IOM）は 1998 年、天然の葉酸類と食品の栄養強化に使用する葉酸のバイオアベイラビリティに差があることを基に、食事性葉酸当量<sup>9</sup>として摂取量を推定した。（参照 添付資料 1）

米国の成人における 1988 年から 1994 年の調査結果によると、食事由来の葉酸の平均摂取量は約 250 μg/日と報告されている。1998 年に米国で穀類製品への葉酸強化が義務化されてから、平均摂取量は女性で 80～100 μg/日、男性ではそれ以上増加していると予測されている。（参照 38）

IOM の設定した推定平均必要量（EAR）、栄養所要量（RDA）は以下の通りである。RDA は成人で男女ともに 400 μg/日である。また、妊娠可能な女性では 400 μg/日以上以上の摂取が神経管閉鎖障害の予防に推奨されるが、変動係数や代謝研究を考慮して、RDA は 600 μg/日と設定されている。（参照 表 1、38）

表 1. 米国における EAR 及び RDA

| 年齢      | EAR (μg/日 食事性葉酸当量) |     | RDA (μg/日 食事性葉酸当量) |     |
|---------|--------------------|-----|--------------------|-----|
| 1～3 歳   | 120                |     | 150                |     |
| 4～8 歳   | 160                |     | 200                |     |
|         | 男性                 | 女性  | 男性                 | 女性  |
| 9～13 歳  | 250                | 250 | 300                | 300 |
| 14～18 歳 | 330                | 330 | 400                | 400 |
| 19～30 歳 | 320                | 320 | 400                | 400 |
| 31～50 歳 | 320                | 320 | 400                | 400 |
| 51～70 歳 | 320                |     | 400                |     |
| 71 歳以上  | 320                |     | 400                |     |
|         | 妊婦                 | 授乳婦 | 妊婦                 | 授乳婦 |
| 14～18 歳 | 520                | 500 | 600                | 500 |
| 19～30 歳 | 520                | 500 | 600                | 500 |
| 31～50 歳 | 520                | 500 | 600                | 500 |

## （３）EU における評価

EU 諸国において、成人の葉酸の平均摂取量は男性で約 300 μg/日、女性で 250 μg/日である。これは欧州食品安全委員会（SCF）が設定した推奨摂取基準値（成人で 200 μg/日、妊婦で 400 μg/日）とほぼ同じである。一方で、妊娠女性及び妊娠を希望する女性では、400 μg/日以上以上の摂取が神経管閉鎖障害に対する予防効果があると考えられているが、出産可能年齢の女性の 90%以上で、食事由来の葉酸摂取量はこの推奨摂取基準値に達していない。そこで、オランダ及び英国では、受胎前 4 週から受胎後 8 週までの間、毎日 400 μg の葉酸サプリメントを摂取することが推奨されている。英国など欧州の一部の国では穀類製品及びパンに葉酸が強化されており、一食あたり 25～100 μg の葉酸摂取に貢献するとされる。（参

<sup>9</sup> Dietary folate equivalent

照 添付資料 2)

要請者は、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り、また、L-5-MTHF-Ca は葉酸の補充、摂取を目的として、既存の葉酸強化食品あるいは葉酸サプリメントに置き換わるものであり、特に対象となる食品等が増加することもないことから、過剰摂取の問題が生ずることは無いと考えている。

### Ⅲ. 国際機関等における評価

#### 1. JECFA における評価

2005 年の第 65 回 JECFA 会合において、ヒトにおける L-5-MTHF-Ca のバイオアベイラビリティは葉酸と同等であり、他の吸収された天然の葉酸と同様に代謝されると結論した。L-5-MTHF-Ca について急性毒性、13 週間反復投与毒性、胚毒性及び催奇形性並びに遺伝毒性は認められず、また、長期毒性試験は必要ないことを確認した上で、L-5-MTHF-Ca を葉酸の代替品として、乾燥結晶またはマイクロカプセル型でダイエタリーサプリメント、特殊栄養用途食品及び他の食品に意図的に使用することは安全上問題ないと結論した。

なお、葉酸代謝に関わる因子には多数の遺伝的多型があることが知られているが、その意義は不明であることから、これらの役割について理解が進んだ時点で、葉酸類の健康影響をさらに評価すべきとしている。(参照 添付資料 5)

#### 2. ビタミンとミネラルの必要量に関する FAO/WHO 合同専門家会議における評価

成人の葉酸の UL は、ビタミン B<sub>12</sub> の欠乏が隠蔽されないよう、ビタミンとミネラルの必要量に関する FAO/WHO 合同専門家会議 (FAO/WHO consultation on human vitamin and mineral requirements) において 1 mg/日に規定されている。(参照 添付資料 5)

#### 3. FDA における評価

##### (1) GRAS 自己認証

1999 年、L-5-MTHF-Ca は、一般の食品及びダイエタリーサプリメントにおいて葉酸の供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) と自己認証された。(参照 添付資料 1)

##### (2) 新しい食品成分としての届出

1994 年に公布された栄養補助食品健康教育法の規定に基づき、Merck KGaA 社 (ドイツ) は栄養補助食品に用いるための新しい食品成分として L-5-MTHF-Ca の 75 日市販前届出書を FDA に提出した。届出期間の終了日 (2001 年 5 月 27 日) 以降、L-5-MTHF-Ca 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) UL の設定根拠について

悪性貧血患者における血液学的徴候の隠蔽は葉酸 5 mg/日の摂取により高頻度かつ一貫して発生するが、1～5 mg/日の用量における評価に十分なデータはない。FDA の葉酸に関する委員会は 1993 年、葉酸によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の隠蔽作用は葉酸の最も重要な有害作用であると考え、UL を算出している。1～5 mg の用量範囲での潜在的な有害作用は不明確であること、高用量の葉酸摂取により未代謝（酸化型）の葉酸が血液中に現れ、組織がこれまで遭遇したことのない形態のビタミンに暴露されるようになることから、葉酸の UL を 1 mg とした。1996 年の見直しにおいても、この結論は同じであった。（参照 添付資料 2、38）

1998 年、新たな食事摂取基準を評価する米国委員会及び栄養素の上限摂取基準を評価する委員会は、葉酸補給によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の隠蔽作用ではなく、神経学的症状の進行を最も重要な有害作用と考えるべきであると考えた。この委員会は LOAEL を 5 mg/日と設定し、NOAEL の算出が不可能であったことから不確実係数（UF）に 5 を用いて、葉酸の UL を 1 mg/日と設定され、この UL は妊婦及び授乳婦（14 歳～）にも適用される。また、18 歳以下の小児等には別途 UL が設定されている。（参照 添付資料 2、38、表 2）

表 2. IOM による UL

| 年齢      | UL (μg/日 食事性葉酸当量) |
|---------|-------------------|
| 1～3 歳   | 300               |
| 4～8 歳   | 400               |
| 9～13 歳  | 600               |
| 14～18 歳 | 800               |
| 19 歳以上  | 1,000             |

### 4. EU における評価

2000 年、SCF は葉酸の UL を 1 mg/日に設定した。一方、天然の還元型葉酸の大量摂取がビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症に与える影響は証明されておらず、また、葉酸の代替としての合成の還元型葉酸、すなわち 5-MTHF の安全性及び有効性についても更なる研究が必要としている。（参照 添付資料 2）

2004 年、EFSA は、葉酸の供給源としての L-5-MTHF-Ca の安全性に関する評価を行った。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症が隠蔽されないよう、2000 年の SCF における葉酸の評価と同様に、UL を 1 mg/日（葉酸として）と結論した。また、含有する不純物が食品に通常存在する物質か、あるいは急性毒性が低く遺伝毒性のないことが示された物質のいずれかであること、ラットに 400 または 1,000 mg/kg 体重/日の L-5-MTHF-Ca（葉酸の UL の少なくとも 20,000 倍）を投与した亜慢性及び胚毒性／催奇形性試験からは有害作用は認められなかったことを確認している。以上から、L-5-MTHF-Ca の特殊栄養用途食品、サプリメント及び一般食品における葉酸の供給源としての使用は、葉酸と同じ成人での UL 1 mg/日（葉酸として）のもと、安全上問題ないと結論した。（参照 添付資料 3、添付資料 4）

## UL の設定根拠について

2000 年、SCF は合成の葉酸の UL について、高用量の葉酸治療を受けている悪性貧血患者における所見を基に設定が可能であり、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏患者に対する葉酸補給の結果としての神経学的症状の進行リスクを最も重要な有害作用と考えるべきとしている。神経学症状の再発を示したほぼ全ての試験では、5 mg/日以上以上の葉酸が投与されており、1～5 mg/日の投与による影響に関するデータはごく少数である（参照 38）。

米国における評価と同様に、高感受性群から得られた LOAEL として最適な葉酸推定値は 5 mg/日であり、最高 1 mg/日まで悪性貧血患者の血液学的徴候を隠蔽する可能性がないことから、葉酸の UL を 1 mg/日とした。他の集団において高用量の葉酸摂取による有害作用が多く発生することを示すデータはないことから、この UL は妊婦または授乳婦にも適用される。しかしながら、17 歳以下の小児等には別途 UL が設定されている。2004 年、L-5-MTHF-Ca についても成人に対する UL は 1 mg/日（葉酸として）と設定された。（参照 添付資料 2、添付資料 3、表 3）

表 3 EU における UL

| 年齢      | UL (μg) |
|---------|---------|
| 1～3 歳   | 200     |
| 4～6 歳   | 300     |
| 7～10 歳  | 400     |
| 11～14 歳 | 600     |
| 15～17 歳 | 800     |
| 18 歳以上  | 1,000   |

## 5. わが国における評価

食品衛生法に基づく栄養機能食品の規格基準は、「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」として、それぞれ 60 μg/日（下限値）、200 μg/日（上限値）である。したがって、栄養機能食品として葉酸の強化を行った旨の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ていることになる。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 400 μg/日（下限値）、1,000 μg/日（上限値）である。（参照 添付資料 24）

## UL の設定根拠について

「日本人の食事摂取基準（2005 年版）」における、葉酸摂取の上限量の設定根拠は以下のとおりである。（参照 添付資料 16）

葉酸の大量投与（0.35～500 mg/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（参照 38）。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る

ことから、評価に用いられた。一方、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、0.36～5 mg/日の葉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（参照 38）。

以上を踏まえ、NOAEL は 5 mg/日とされた。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、UF を 5 として、成人（18 歳以上）の上限量は、通常の食品以外から摂取される葉酸として 1,000 µg/日とされた。

以下に、各国または機関での UL 等の設定状況をまとめて示す。

表 4 葉酸の UL 等設定状況

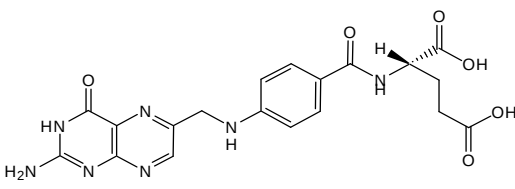
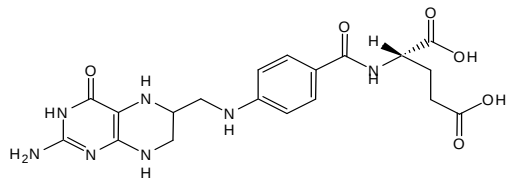
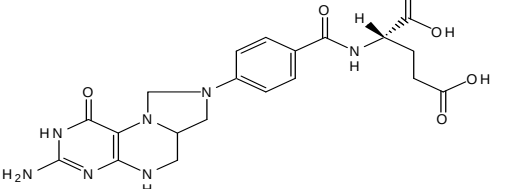
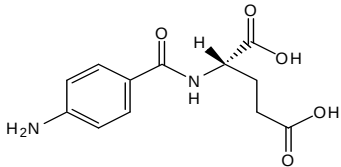
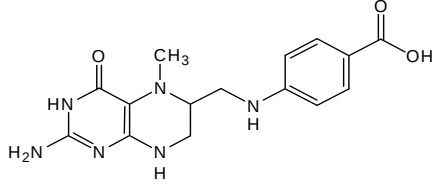
|                              | JECFA<br>(2005 年) | 米国              | EU<br>(2000 年 <sup>10</sup> ) | 日本<br>(2005 年) |
|------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|----------------|
|                              |                   | IOM<br>(1998 年) |                               |                |
| LOAEL<br>(mg/人/日)            | —                 | 5               | 5                             | —              |
| NOAEL<br>(mg/人/日)            | —                 | —               | —                             | 5              |
| UF<br>(mg/人/日)               | —                 | 5               | 5                             | 5              |
| UL <sup>11</sup><br>(mg/人/日) | —                 | 1               | 1                             | 1              |

<sup>10</sup> 2000 年に葉酸の UL が設定された後、2004 年に L-5-MTHF にも同じ値が設定された。

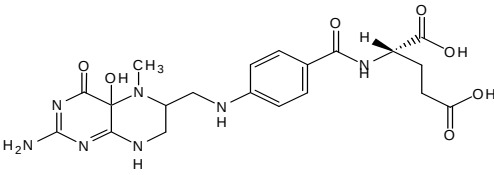
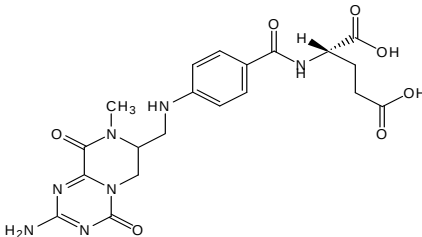
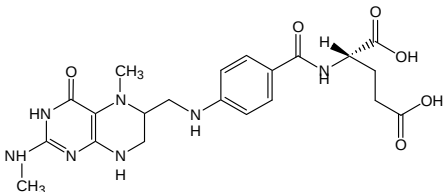
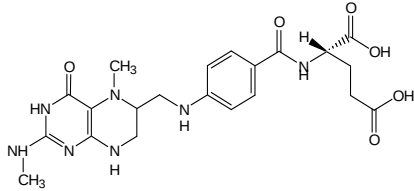
<sup>11</sup> 成人における UL を示す。

1 <別紙 1：製造工程に伴う副生成物>

2

| 化学名                                  | 構造式                                                                                 | 含有率 (%)            | 備考                        |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| <b>A. その他の葉酸化合物</b>                  |                                                                                     |                    |                           |
| 葉酸                                   |   | 0.05 <sup>12</sup> | 食物中に存在<br>(参照 45)         |
| テトラヒドロ葉酸<br>(THF)                    |   | 0.01 <sup>13</sup> | 食物中に存在<br>(参照 添付資料 2)     |
| 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸<br>(5,10-メチレン THF) |  | 0.03 <sup>13</sup> | 食物中に存在<br>(参照 添付資料 2)     |
| <b>B. L-5-MTHF-Ca の分解及び酸化産物</b>      |                                                                                     |                    |                           |
| 4-アミノベンゾイルグルタミン酸                     |  | 0.05 <sup>13</sup> | 食物中に存在<br>(参照 9、23、24、65) |
| 5-メチルテトラヒドロプロテロイン酸                   |  | 0.25 <sup>13</sup> | 食物中に存在<br>(参照 9、23、24、65) |

<sup>12</sup>検出限界は 0.01%である。

|                                            |                                                                                     |                    |                                                             |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| 4 $\alpha$ -ヒドロキシ-5-メチルテトラヒドロ葉酸            |    | 0.12               | 食物中に存在<br>(参照 9、23、24、65)<br>葉酸を経口摂取したラットの尿中からも検出<br>(参照 9) |
| ピラジノ- <i>s</i> -トリアジン誘導体                   |    | 0.13 <sup>13</sup> |                                                             |
| C. その他の不純物                                 |                                                                                     |                    |                                                             |
| ジメチル型テトラヒドロ葉酸                              |  | 0.1 <sup>13</sup>  |                                                             |
| 5-MTHF の(6 <i>R</i> )-ジアステレオ異性体 (D-5-MTHF) |  |                    |                                                             |

- 1 規格案において、A と B 及び C (D-5-MTHF を除く) の含有量として 2.5%以下、
- 2 5-MTHF の (6*R*) -ジアステレオ異性体 (D-5-MTHF) の含有量は 0.1%以下とされ
- 3 ている。

1 <別紙 2：略称一覧表>

2

| 略称          |                       |
|-------------|-----------------------|
| 2-AAF       | 2-アセトアミド-フルオレン        |
| AST         | アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ   |
| CK          | クレアチンキナーゼ             |
| DMN         | ジメチルニトロサミン            |
| dTMP        | チミジン 1 リン酸            |
| dUTP        | 2-デオキシウリジン 3 リン酸      |
| EAR         | 推定平均必要量               |
| IOM         | 米国医学学会                |
| LDH         | 乳酸デヒドロゲナーゼ            |
| L-5-MTHF-Ca | 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム    |
| MTHFR       | 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 |
| RDA         | 栄養所要量                 |
| RTG         | 相対的増殖率                |
| SCF         | 欧州食品安全委員会             |
| THF         | テトラヒドロ葉酸化合物           |
| TK          | マウスリンパ腫チミジンキナーゼ       |
| UF          | 不確実係数                 |
| UL          | 許容上限摂取量               |

3

# 1 <別紙3：5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム 安全性試験結果>

2

| 試験種類   | 動物種                 | 試験期間                       | 投与方法                                                                                             | 動物数/群                                                    | 被験物質                                                     | 投与量                                                                                                                                                                                                                                                 | 試験結果                                                                                                                                                                                                        | 参照No                 |
|--------|---------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 急性毒性   | ラット                 |                            | 強制経口                                                                                             | 雌雄各3                                                     | L-5-MTHF-Ca                                              | 2,000 mg/kg 体重/日                                                                                                                                                                                                                                    | LD <sub>50</sub> は 2,000 mg/kg 体重以上であった。                                                                                                                                                                    | 33、<br>添付資料 3        |
|        | ラット                 |                            | 強制経口                                                                                             | 雌雄各3                                                     | D,L-5-MTHF-Ca<br>D-5-MTHF-Ca<br>L-Mefox-Ca<br>L-MTHPA-Ca | 2,000 mg/kg 体重/日                                                                                                                                                                                                                                    | LD <sub>50</sub> は 2,000 mg/kg 体重以上であった。                                                                                                                                                                    | 34<br>35<br>36<br>37 |
| 反復投与毒性 | ラット                 | 13 週間                      | 強制経口                                                                                             | 雌雄各10                                                    | L-5-MTHF-Ca                                              | 0、25、100、400 mg/kg 体重/日                                                                                                                                                                                                                             | 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、全ての動物が剖検まで生存した。体重、機能観察バッテリー試験結果、自発運動試験結果、摂餌量、血液学的所見、臓器重量、病理組織学的所見に、被験物質投与による影響は認められなかった。最高用量投与群の雄において AST、LDH 及び CK の濃度が有意に低下したが、雌では低下しなかった。<br>〈NOAEL 400 mg/kg 体重/日（要請者による）〉 | 添付資料 17              |
| 発生毒性   | ラット<br>（妊娠期 5-19 日） | 妊娠 5～19 日間<br>（20 日目に帝王切開） | 強制経口                                                                                             | 各群各 22～24 匹                                              | L-5-MTHF-Ca                                              | 0、100、300、1,000 mg/kg 体重/日                                                                                                                                                                                                                          | 1,000 mg/kg 体重/日の母ラットでわずかな飲水量の増加がみられたが、その他、母ラットの一般症状、体重、摂餌量、に被験物質投与による影響はみられなかった。着床数、胚/胎児死亡数及び率、生存胎児数、胎児体重、胎児の性比、胎児の形態学的所見に投与に起因する変化は認められなかった。                                                              | 添付資料 18              |
| 遺伝毒性   | <i>in vitro</i>     | 復帰突然変異試験                   | <i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 及び <i>E. coli</i> WP 2 uvr A pKM101 | L-5-MTHF-Ca                                              | 最高濃度 5,000 µg/plate                                      | S9 mix の有無にかかわらず陰性であった。                                                                                                                                                                                                                             | 添付資料 19                                                                                                                                                                                                     |                      |
|        | <i>in vitro</i>     | 復帰突然変異試験                   | <i>S.typhimurium</i> TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537 及び <i>E. coli</i> WP 2 uvr A pKM101          | D,L-5-MTHF-Ca<br>D-5-MTHF-Ca<br>L-Mefox-Ca<br>L-MTHPA-Ca | 最高濃度 5,000 µg/plate                                      | S9 mix の有無にかかわらず、いずれも陰性であった。                                                                                                                                                                                                                        | 78<br>79<br>80<br>81                                                                                                                                                                                        |                      |
|        | <i>in vitro</i>     | 遺伝子突然変異試験                  | 発現期間 2 日間（3 時間暴露、24 時間暴露）                                                                        | L-5-MTHF-Ca                                              | 最高濃度 5,000 µg/mL                                         | S9 mix の存在下で、暴露時間が 3 時間の試験では、試験した最高濃度まで細胞毒性は生じなかった。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。<br>S9 mix の非存在下で、暴露時間が 24 時間の試験では、高い濃度の順番に上から 3 つの濃度（1,580、2,810 及び 5,000 µg/mL）において細胞毒性が観察された。RTG がそれぞれ対照の 13% および 4% に低下した上から 2 つの濃度条件下では、突然変異の発生頻度は 2 倍以上に上昇した。 | 添付資料 20                                                                                                                                                                                                     |                      |

| 試験種類      | 動物種             | 試験期間           | 投与方法                          | 動物数/群                            | 被験物質                      | 投与量                  | 試験結果                                                                                  | 参照No                   |
|-----------|-----------------|----------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 遺伝毒性(つづき) | <i>in vitro</i> | 遺伝子突然変異試験      | 発現期間 3 日間<br>(3 時間暴露、24 時間暴露) |                                  | L-5-MTHF・Ca               | 最高濃度 5,000 µg/mL     | S9 mix の非存在下で、暴露時間が 3 時間の試験では、陰性であった。暴露時間が 24 時間の試験では、最高用量でのみ陽性で、RTG は対照の 0.2%であった。   | 添付資料 20                |
|           | ラット             | 不定期 DNA 合成試験   | 強制経口                          | 陰性対照群及び試験群：各 8、陽性対照群：各 4         | L-5-MTHF・Ca               | 800 、 2,000 mg/kg 体重 | ラット肝での不定期 DNA 合成は増大しなかった。                                                             | 添付資料 21                |
|           | ラット             | 小核試験           | 強制経口                          | 雄 10                             | L-5-MTHF・Ca               | 最高用量 2,000 mg/kg 体重  | 陰性であった。                                                                               | 添付資料 22                |
| ヒトにおける知見  | ヒト              | 2 ヶ月間から最長 6 ヶ月 | 経口                            | 血液透析患者、うつ病あるいは統合失調症の患者           | L-5-MTHF・Ca、D,L-5-MTHF・Ca | 15～17 mg/日           | L-5-MTHF・Ca の高い高用量耐性が示唆されている。L-5-MTHF・Ca の安全性評価を目的とした試験ではないが、臨床において有害作用が認められたとの記載はない。 | 10、21、58、添付資料 3、添付資料 5 |
|           | ヒト              |                |                               | ビタミン B <sub>12</sub> の欠乏した悪性貧血患者 | 葉酸                        | 5 mg/日以上             | 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。                                                          | 38、77                  |
|           | ヒト              |                |                               |                                  | 葉酸                        | 400 µg/日以上           | 葉酸を長期間摂取したヒトにおける結腸がん、乳がん等の発生リスクの低下または上昇に関する複数の疫学調査結果が報告されている。                         | 追 2                    |
|           | ヒト              |                |                               | MTHFR の変異がホモ型のヒト                 | 葉酸                        |                      | 葉酸類濃度が低下し、ホモシステイン濃度の上昇がみられたとの報告がある。                                                   | 添付資料 5                 |



1 <参照>

2 ○ 添付資料

3 [添付資料 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  
4 ける L-5-メチルテトラヒドロ葉酸の使用について

5 [添付資料 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

6 [添付資料 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  
7 接触物質科学パネル（EFSA）の見解：L-メチル葉酸カルシウム

8 [添付資料 4] 改定 Directive 2001/15/EC (2006/34/EC) および改定 Directive  
9 2002/46/EC (2006/37/EC)

10 [添付資料 5] 第 65 回 FAO/WHO 食品添加物専門家会議（JECFA）の概要および  
11 結論

12 [添付資料 6] 原料および製造工程で用いられた化学物質の規格

13 [添付資料 7] 製造工程の管理

14 [添付資料 8] ICP-MS について

15 [添付資料 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

16 [添付資料 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

17 [添付資料 11] 食品中の食品添加物分析法解説書（葉酸）

18 [添付資料 12] 食品添加物規格「葉酸」

19 [添付資料 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  
20 ムの成分規格

21 [添付資料 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  
22 における安定性

23 [添付資料 15] 平成 18 年国民栄養調査結果の概要

24 [添付資料 16] 日本人の食事摂取基準（2005 年版）（葉酸）

25 [添付資料 17] Calcium-L-Mefolate (L-MTHF): 13 Week Oral Toxicity Study in  
26 Wistar Rats (Hamann, et al., 2001)

27 [添付資料 18] Metafolin: Prenatal developmental toxicity study after  
28 administration to rats (Schubert & Jacobs, 2003)

29 [添付資料 19] Calcium-L-Mefolate: Bacterial Mutagenicity Assay, Salmonella  
30 typhimurium and Escherichia coli (Utesch, 1999a)（非公表）

31 [添付資料 20] Calcium-L-Mefolate: In vitro mammalian cell gene mutation test  
32 (L5178/TK<sup>+/+</sup>) (Utesch, 2000a)（非公表）

33 [添付資料 21] Calcium-L-Mefolate: Measurement of unscheduled DNA  
34 synthesis in rat liver using an *in vivo* / *in vitro* procedure  
35 (Howe, 2002)

36 [添付資料 22] Calcium-L-Mefolate: Micronucleus test in male rats after  
37 administration (Utesch, 2000b)（非公表）

38 [添付資料 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  
39 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  
40 年 12 月 28 日児母第 72 号・健医地生発第 78 号）

41 [添付資料 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  
42 品の表示

○ 参考文献

- 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 B<sub>12</sub> 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.*

- 1 Haematologica 82: 211-219.
- 2 16 Day B.P.F. and Gregory J.F. (1983). Thermal stability of folic acid and  
3 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems. J. Food Sci. 48:  
4 581-599.
- 5 17 Duell P.B. and Malinow M.R. (1997). Homocysteine: an important risk factor  
6 for atherosclerosis vascular disease. Current Opinion in Lipidology 8: 28-34.
- 7 18 Finglas, P.M. (2000). Folate: from food to functionality and optimal health  
8 (Final Report)
- 9 19 Ghandour H., Bagley P.J., Shemin D., Hsu N., Jacques P.F., Dworkin L.,  
10 Bostom A.G. and Selhub J. (2002). Distribution of plasma folate in  
11 hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid.  
12 Kidney Internat. 62: 2246-2249.
- 13 20 GNC/BASF (1998). 75-Day premarket notification for new dietary  
14 ingredients.
- 15 21 Godfrey P.S.A., Toone B.K., Carney M.W.P., Flynn T.G., Bottiglieri T., Laundry  
16 M., Chanarin I. and Reynolds E.H. (1990). Enhancement of recovery from  
17 psychiatric illness by methylfolate. Lancet 336: 392-395.
- 18 22 Gregory J.F., Sartain D.B. and Day B.P.F. (1984). Fluorometric determination  
19 of folacin in biological materials using high performance liquid  
20 chromatography. J.Nutr. 114: 341-353.
- 21 23 Gregory J.F. (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research:  
22 Analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and  
23 bioavailability of dietary folates. Advances in Food and Nutrition Research  
24 33: 1-101.
- 25 24 Gregory J.F. (1996). Vitamins. Food Chemistry, 3<sup>rd</sup> ed. (O.R. Fennema. ed.), M.  
26 Dekker, p. 531-532, 590-599, 610-616.
- 27 25 Gregory, J.F., Williamson, J., Liao, J-F., Bailey, L.B. & Toth, J.P.(1998b).  
28 Kinetic model of folate metabolism in nonpregnant women consuming [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]  
29 folic acid: Isotopic labeling of urinary folate and the catabolite  
30 para-acetamidobenzoylglutamate indicates slow, intake-dependent, turnover  
31 of folate pools. J. Nutr. 128: 1896-1906.
- 32 26 Gregory, J.F., Williamson, J., Bailey, L.B. & Toth, J.P.(1998a). Urinary  
33 excretion of [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] folate following a single oral dose of [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] folic acid is a  
34 functional index of folate nutritional status. J. Nutr. 128: 1907-1912.
- 35 27 Groehn V. and Moser R. (1999). Synthesis of optically pure diastereoisomers  
36 of reduced folates. Pteridines 10 (3): 95-100.
- 37 28 Gutstein S., Bernstein L.H., Levy L. and Wagner G. (1973). Failure of  
38 response to N<sup>5</sup>-methyltetrahydrofolate in combined folate and vitamin B<sub>12</sub>  
39 deficiency. Evidence in support of the "folate trap" hypothesis. Digest. Dis. 18  
40 (2): 142-146.
- 41 29 Hart D.J., Finglas P.M., Wolfe C.A., Mellon F., Wright A.J.A. and Southon S.  
42 (2002). Determination of 5-methyltetra-hydrofolate (<sup>13</sup>C-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). Folates 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). Antoxidation 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-Langenhohl 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. Dauzat 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 [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>] and [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] 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 noemal 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). (非公表)
- 79 Utesch D. (1999c). Calcium-D-Mefolinat - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公表)
- 80 Utesch D. (1999d). Calcium-L-Mefox - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公表)
- 81 Utesch D. (1999e). Calcium-L-MTHPA - Bacterial mutagenicity assay, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Unpublished study report for Eprova AG, Schaffhausen (Switzerland). (非公表)
- 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  $\beta$ -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., Stroes 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.

- 1 88 Viberg U., Jägerstad M., Öste R. and Sjöholm I. (1997). Thermal processing of  
2 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen.  
3 Food Chem. 59 (3): 381-386.
- 4 89 Vollset St.E., Refsum H., Tverdal A., Nygard O., Nordrehaug J.E., and  
5 Ueland P.M. (2001). Plasma total homocysteine and cardiovascular and  
6 noncardiovascular mortality: the hordaland homocysteine study. Am. J. Clin.  
7 Nutr. 74: 130-136.
- 8 90 Wald N.J., Law M.R., Morris J.K. and Wald D.S. (2001). Quantifying the  
9 effect of folic acid. Lancet 358: 2069-2073. Erratum in: Lancet 2002, 359: 630.
- 10 91 White D.R., Lee H.S. and Krüger R.E. (1991). Reversed-phase HPLC/EC  
11 determination of folate in citrus juice by direct injection with column  
12 switching. J. Agric. Food Chem. 39: 714-717.
- 13 92 Williams P.G., Ross H. and Brand Miller C. (1995). Ascorbic acid and  
14 5-methyltetrahydrofolate losses in vegetables with cook/chill or cook/hot-hold  
15 foodservice systems. J. Food Sci. 60: 541-546
- 16 追 1 相川直樹, 青木継稔, 青木幸昌, 明石巧, 秋澤忠男, 秋澤より子, 他. 医学大事  
17 典. 第 18 版.南山堂. (2004) : 1774,2129
- 18 追 2 A David Smith, Young-In Kim and Helga Refsum.Is folic acid good for  
19 everyone ? Am J Clin Nutr (2008) 87: 517-33