

葉酸欠乏がマウスの骨量に及ぼす影響

榎原周平, 大串美沙, 渡邊敏明

(兵庫県立大学環境人間学部*)

Effect of Folate Deficiency on Bone Mass in Mice

Shuhei EBARA, Misa OGUSHI and Toshiaki WATANABE

School of Human Science and Environment, University of Hyogo

Summary

Folate is a water soluble B-group vitamin, which is an essential nutrient for human health. It has been reported that hyperhomocysteinemia, which folate deficiency is one of the main causes, is an independent risk factor for osteoporotic fractures. This study was conducted to examine the influence of folate deficiency on bone mass and bone mineral contents in mice. Four-week-old male ICR mice were fed a control diet based on AIN93G or a folate deficient diet for 10 weeks. The plasma and erythrocyte levels of folate in the deficient mice were significantly lower than those in the control mice. The concentration of plasma homocysteine in the deficient mice was higher but not significantly different from controls. In the deficient mice, we observed a significant decrease in the bone mass, bone mineral content and bone length of the right femur even though the body weight and major tissue weights were not significantly different between the two groups. These results suggest that folate deficiency influences the process of bone formation.

葉酸は水溶性B群ビタミンの一種であり、核酸合成やアミノ酸代謝に関与している必須の栄養素である。葉酸が欠乏すると巨赤芽球性貧血や胎児においては神経管閉鎖障害を発症する^{1,2)}。そのため妊娠前後においては摂取が勧奨されているビタミンである。また、葉酸の摂取不足と、心血管疾患や癌の発症と関連があることも報告されている^{3,4)}。

ホモシステインはメチオニン代謝の中間代謝物の一つである。このホモシステインの代謝には、水溶性ビタミンである葉酸、ビタミンB₁₂、ビタミンB₆が関与している。メチオニンシンターゼはビタミンB₁₂を補酵素とする酵素で、5-メチルテトラヒドロ葉酸のメチル基をホモシステインに転移しメチオニンを合成する。ビタミンB₆はホモシステインからシステインへの代謝に補酵素として関与している。これらの水溶性ビタミンが欠乏すると、血漿中ホモシステインが増加する。これまでの研究で、血中ホモシステインの増加が脳心血管疾患、認知機能障害と関連があることが報告されている^{5,6)}。

骨粗鬆症は栄養学的問題の一つであり、骨折を伴い個人の生活の質に大きなダメージを与える。この原因には、加齢、閉経、低運動量などが挙げられるが、近年、フラミンガム研究やアムステルダム研究といった大規模研究によって、血中ホモシステイン濃度の上昇が、骨折リスクを高める独立した危険因子であることが報告されている^{7,8)}。本

研究では、マウスを用いて、葉酸欠乏が血中ホモシステイン値、骨量、骨ミネラル含量に及ぼす影響について検討したので報告する。

実験方法

1. 実験動物

実験動物には3週齢のICR系雄性マウス(日本クレア(株))を用いた。1週間の予備飼育後、対照群(n=7)と欠乏群(n=7)の2群に分け、実験に用いた。マウスの飼育は室温22±1℃、12時間の明暗サイクルの環境下で行った。葉酸欠乏飼料として葉酸を含まないAIN93G粉末(オリエンタル酵母工業(株))を用いた。欠乏群には葉酸欠乏飼料を、対照群には飼料1kg当たりFolic acid(和光純薬工業)を2mg含む対照飼料を与えた。水は蒸留水を自由に摂取させた。糞食を防ぐため、ステンレス網の中敷のあるプラスチックケージで飼育した。

10週間各飼料で飼育した後、エーテル麻酔下で開腹し下大動脈より採血した。肝臓、腎臓、脾臓、精巣、心臓、肺、大脳、小脳、右腓腹筋、右大腿骨を摘出し重量を測定した。採血した血液はEDTA処理済みチューブに移し、遠心分離を行い血漿を得た。また血液の一部はヘマトクリット毛細管を用いてヘマトクリットを測定した。なお、

*所在地：姫路市新在家本町1-1-12 (〒670-0092)

血液と血漿の一部には9倍量の1%アスコルビン酸を添加し葉酸測定に供した。

なお、動物実験は「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示第6号,一部改正平成14年5月28日)に従って行った。

2. 分析

葉酸は *Lactobacillus rhamnosus* (NBRC 3425) を用いた微生物学定量法により測定した。血漿中のホモシステイン濃度は HPLC 法で測定した⁹⁾。

右大腿骨は周囲の軟部組織を除去した後、新鮮骨重量を測定した。その後、100℃で24時間乾燥し、乾燥骨重量を測定した。この乾燥骨を磁性のルツボに移し、電気炉(550℃)で48時間灰化し、灰化骨重量を測定した。なお、灰化骨重量を乾燥骨重量で除した値を骨密度とした。灰化した大腿骨を6N塩酸で溶解し、カルシウムはOCPC法、リンはモリブデンブルー法により測定した。

3. 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差により示した。対照群と葉酸欠乏群との比較には、Student's t-testを行い、 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意な差があると判断した。

結果と考察

飼育期間中における体重の変化を測定したところ、各群の体重の推移に違いは見られなかった (Fig. 1)。各群の血中葉酸レベルを測定したところ、血漿中葉酸は対照群 (53.8 ± 10.1 ng/mL) に比べ欠乏群 (8.5 ± 2.2 ng/mL) で有意に低値を示した。また、赤血球中葉酸も欠乏群で約半分であり有意に低かった (Fig. 2)。血漿中のホモシステインについては、欠乏群で高かったが有意な差はなかった (Fig. 3)。したがって、本研究で作成した葉酸欠乏マウスは比較的緩やかな欠乏状態にあると考えられた。

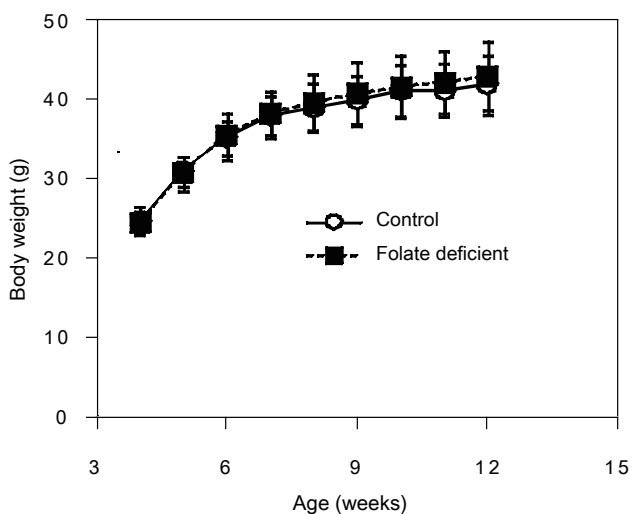


Fig. 1 Body weight change of folate deficient mice. Results are presented as the means \pm SD (n=7).

各群における臓器重量を測定したところ、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、心臓、肺、右腓腹筋、大脳、小脳の重量において、各群間で違いは見られなかった。ところが、右大腿骨の新鮮重量は欠乏群で有意に低値を示した (Fig. 4)。解剖時における体重は、対照群 416 ± 43 g、欠乏群 439 ± 48 g で有意差はなく、数値で言えば欠乏群の方が高値である。それにも関わらず、右大腿骨の重量が欠乏群の方が有意に低値であったため、より詳細に骨量と骨組成について検討を進めた。

葉酸欠乏マウスにおける骨量と骨組成を測定したところ、新鮮骨重量と同様に、乾燥重量、灰化重量も欠乏群で有意に低値であった (Table 1)。しかし、骨密度に違いは見られなかった。骨中のCa含量について調べたところ欠乏群で有意に低値を示したが、灰化重量当たりのCa含量につ

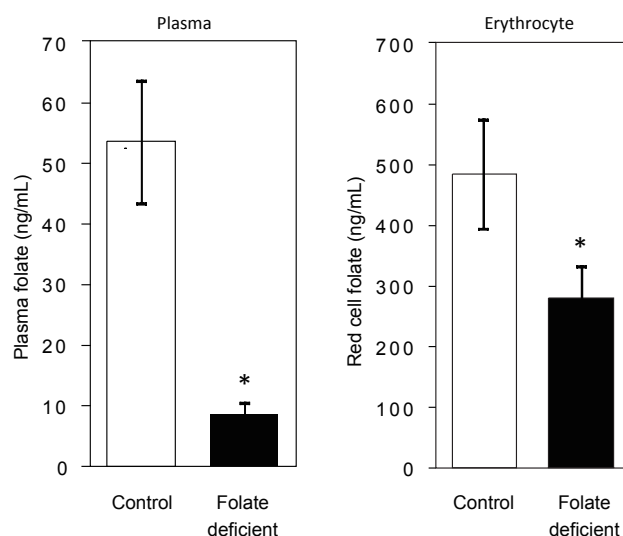


Fig. 2 Plasma and erythrocyte folate in the folate deficient mice. Results are presented as the means \pm SD (n=7). * $p < 0.05$ -statistically significant differences in comparison with control.

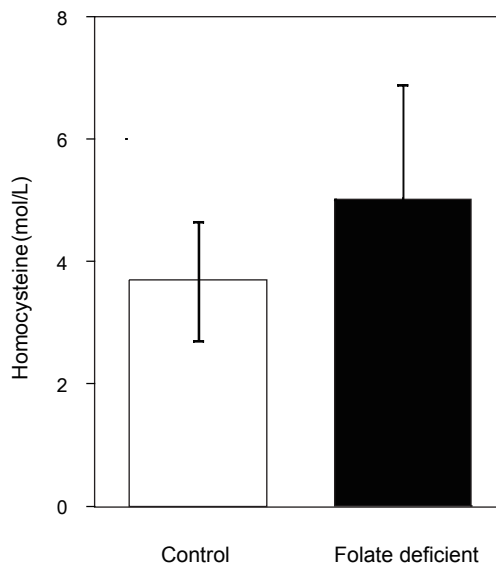


Fig. 3 Plasma homocysteine concentration in the folate deficient mice. Results are presented as the means \pm SD (n=7).

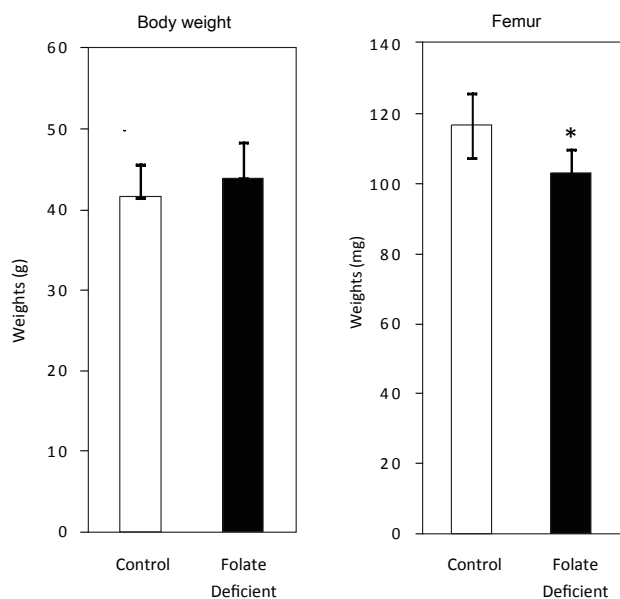


Fig. 4 Body weight and femoral bone mass of experimental mice. Results are presented as the means \pm SD (n=7). * $p < 0.05$ -statistically significant differences in comparison with control.

いては各群に違いは見られなかった。また、P含量についても同様の結果であった。骨長は欠乏群の方が短く、有意差が認められた。したがって、本実験では4週齢のマウスを10週間欠乏飼料で飼育したが、葉酸の欠乏によって、骨形成に影響していると考えられた。葉酸は一炭素単位代謝系を構成し、ヌクレオチドの合成に関与し、細胞の増殖に重要である。したがって、骨芽細胞への分化・増殖に影響するか、もしくは骨芽細胞と破骨細胞のバランスが崩れるため骨の低形成を引き起こしたと考えられる。

葉酸と骨折リスクとの関係について、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) のC677T遺伝子多型から研究されている。MTHFRは5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸をメチル葉酸へ還元する酵素である。閉経後女性においてTT型のヒトにおいては、葉酸代謝がうまく機能せず、血中ホモシステインが上昇し、骨折リスクも高いこと

が報告されている¹⁰⁾。ホモシステインがコラーゲンの架橋構造の形成に異常をもたらす、骨質の劣化を引き起こすと報告されている^{11,12)}。今回の研究において骨の強度については測定していないが、検討する必要があると考えられる。

これまでの報告で、葉酸とビタミンB₁₂を12週間欠乏させたラットにおいて、血漿中ホモシステインは増加しているが、骨代謝マーカーであるオステオカルシン、I型コラーゲン架橋C-テロペプチドに影響はなかったという報告がある¹³⁾。一方、メチオニン食によって高ホモシステイン血症となったラットにおいて、ヒドロキシプロリン、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドが増加し、オステオカルシンが低下したという報告もある¹⁴⁾。今後これらの点についても検討が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Lindenbaum J, Allen RH (1995) Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. in Folate in health and disease, ed. by Bailey LB, Marcel Dekker, New York: pp. 43-74.
- 2) Butterworth CE Jr., Bendich A (1996) Folic acid and the prevention of birth defects. Annu Rev Nutr 16: 73-97.
- 3) Choi SW, Mason JB (2002) Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. J Nutr 132: 2413S-2418S.
- 4) Bailey LB, Rampersaud GC, Kauwell GP (2003) Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. J Nutr 133: 1961S-1968S.
- 5) Maron BA, Loscalzo J (2009) The treatment of hyperhomocysteinemia. Annu Rev Med 60: 39-54.
- 6) McCully KS (2007) Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. Am J Clin Nutr 86: 1563S-1568S.

Table 1 Effect of folate deficiency on bone mass, bone mineral and bone length

		Control	Folate deficient
Body weight	(g)	41.6 \pm 4.3	43.9 \pm 4.8
Femur			
Fresh	(mg)	116.9 \pm 10.0	103.2 \pm 7.3 *
Dry	(mg)	70.6 \pm 7.3	61.1 \pm 6.1 *
Ash	(mg)	46.2 \pm 4.6	39.7 \pm 3.9 *
Bone density	(%)	65.5 \pm 1.8	65.0 \pm 1.4
	(ash wt/dry wt)		
Ca	(mg)	17.0 \pm 1.8	14.3 \pm 1.3 **
	(mg/g ash wt)	368.5 \pm 4.8	362.1 \pm 15.3
P	(mg)	8.5 \pm 0.8	7.2 \pm 0.7 **
	(mg/g ash wt)	184.0 \pm 2.0	181.5 \pm 6.5
Bone length	(mm)	17.1 \pm 0.6	16.4 \pm 0.3 *

Results are presented as the means \pm SD (n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ -statistically significant differences in comparison with control.

- 7) Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, Van der Klift M, De Jonge R, Lindemans J, De Groot LC, Hofman A, Witteman JC, Van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG (2004) Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 350: 2033-2041.
- 8) McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 350: 2042-2049.
- 9) Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S (1991) Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr* 565: 441-446.
- 10) Shiraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao-Koshizuka M, Inoue S (2008) The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab* 26: 595-602.
- 11) Saito M, Marumo K (2010) Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 21: 195-214.
- 12) Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka T (2006) Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int* 17: 986-995.
- 13) Herrmann M, Wildemann B, Wagner A, Wolny M, Schorr H, Taban-Shomal O, Umanskaya N, Ross S, Garcia P, Hubner U, Herrmann W (2009) Experimental folate and vitamin B12 deficiency does not alter bone quality in rats. *J Bone Miner Res* 24: 589-596.
- 14) Ozdem S, Samanci S, Tasatargil A, Yildiz A, Sadan G, Donmez L, Herrmann M (2007) Experimental hyperhomocysteinemia disturbs bone metabolism in rats. *Scand J Clin Lab Invest* 67: 748-756.