

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05926

研究課題名（和文）変異菌探索および特殊発酵により作製したMK-7低減化納豆の機能性評価と臨床試験

研究課題名（英文）Functional evaluation and clinical study of natto with reduced MK-7 produced by mutagenesis and special fermentation

研究代表者

平松 祐司（HIRAMATSU, Yuji）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30302417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：納豆は納豆菌が産生する多量のビタミンK（MK-7）を含有するため、ワルファリン内服患者では摂食は禁じられている。しかし納豆摂食を望む患者の声は強く、当グループが開発を進めてきた納豆のビタミンK低減化技術に基づき、ワルファリン内服患者が食べられる『低ビタミンK納豆』の食品機能評価およびワルファリン内服患者による臨床試験を実施した。MK-7低生産菌と独自製法によりMK-7含有量を従来比20%程度まで低減し、食品の機能性・官能性試験を実施した。その後健康者およびワルファリン内服患者による多段階臨床試験を行い、摂食前後でPT-INRと血中MK-7濃度の有意な変化がないことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

納豆というほぼ日本固有の伝統食品が研究開発対象であるため、東アジアを含む国外での同様の研究履歴は見当たらない。国内では、ワルファリンを取り扱う製薬企業がかつて大手納豆製造販売業者と共同して納豆のビタミンK低減化を企図した形跡があるが、特許取得には至っておらず、また開発技術の詳細も公表されていない。本研究課題は発想、方法論ともオリジナリティに富み、食品工学・栄養科学・臨床医学の叡智を集めて食卓への納豆復活を望む患者の声に応えたものである。ビタミンK低減化納豆の製品化は医療現場の固定観念や常識を覆すのみならず、患者およびその家族の日常食への浸透は一定の経済波及効果をもたらすものと推定される。

研究成果の概要（英文）：Since natto contains a large amount of vitamin K (MK-7) produced by the bacillus natto, consumption of natto is prohibited for patients taking warfarin. However, there are strong requests from patients who want to eat natto, and based on the natto vitamin K reduction technology that our group has been developing, we conducted a food function evaluation of "low vitamin K natto" and clinical trials with warfarin-treated patients. The functionality and sensory properties of the food were tested. Then, a multi-stage clinical study was conducted with healthy subjects and patients taking warfarin, and it was confirmed that there were no significant changes in PT-INR and blood MK-7 concentration before and after the ingestion of the food.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：納豆 ビタミンK ワルファリン MK-7 PT-INR 臨床試験 発酵 官能性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環器系診療において、人工弁置換術後・慢性心房細動等の患者は重篤な血栓症を発症しやすく、多くの患者が抗凝固薬ワルファリンを半永久的に内服する。ワルファリンは、ビタミン K に拮抗して肝臓でのビタミン K 依存性凝固因子 II, VII, IX, X の合成を阻害し、血液検査上プロトロンビン時間を延長する。全国で 200 万人以上と推定されるワルファリン内服患者はビタミン K 含有量の多い食品を避けるよう指導されるが、納豆は納豆菌が産出する水溶性ビタミン K₂ (menaquinone-7; MK-7) を特に多量に含み、納豆菌は腸内でも MK-7 を産生するとされているため、ワルファリン内服時には納豆摂取は固く禁じられている。しかしながら、納豆を食べていと望む患者の声は根強く、栄養上優れた伝統食品という観点からも、ワルファリン内服患者、特に生活習慣病患者や成長期の小児に何とか安全な納豆を提供できないかとの『問い』に基づき、本研究グループは基礎研究を開始した。

平成 23 年の研究開始当初は“MK-7 をまったく含有しない納豆の開発”を企図したが、納豆菌による MK-7 産生を完全遮断することや、発酵後の納豆から MK-7 を特異的に除去することは困難を極めた。そこで、納豆から粘性物質を抽出して MK-7 を紫外線分解し、これを粉末化した後に蒸煮した大豆と和えて“納豆風味 MK-7 フリー大豆食品”を作成するよう方向転換した。紫外線照射に加えてフリーズドライ加工する方式も試みたが、いずれの方式によっても食味や曳糸性などの食品性能が通常納豆と比べて著しく劣り、納豆代替食品として評価に耐えるレベルではなかった。ところが最近、上記と並行して行ってきた MK-7 低産生菌の網羅的探索と短時間発酵技術開発の成果により、MK-7 産生を通常の納豆の 23%にまで低く抑える加工技術を獲得するに至った。本課題では、この MK-7 低減化技術の信頼性・再現性を担保すべく、試作納豆の機能性・官能性を綿密に評価し、『低ビタミン K 納豆』の市販化を見据えたワルファリン内服患者による多段階臨床試験を実施する。

2. 研究の目的

従来ワルファリン内服開始と同時に納豆摂取をあきらめてきたが、本研究グループは初めて、「ビタミン K₂ (MK-7) 含有量の少ない納豆を作ろう」という逆転の発想に転じ、ワルファリンと納豆(医療と食文化)との共存を企図する独創的食品開発を目的として定めた。当初発酵済納豆の MK-7 低減化を目論んで紫外線による納豆菌殺滅など数々の技法にチャレンジし、8 年余りの試行錯誤の末、ようやく MK-7 低産生株の獲得にたどり着いた。市販納豆製造用の納豆菌である TTCC904-2 株(受託番号 NITE P-01705)を親株とし、これに紫外線を照射して多数の突然変異菌を誘導した。その後計 823 株の変異菌に対してスクリーニング作業を繰り返し行い、従来の納豆菌に比して約 44%の MK-7 産生となる菌株の選抜に成功した。同菌の MK-7 低減率や発酵納豆品質を評価し、*Bacillus subtilis* TTCC2051 株として確立した。この TTCC2051 株は、公的寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに 2018 年 2 月に寄託されている(受託番号 NITE P-02647)。TTCC2051 株による MK-7 産生をさらに低減することを目的に、発酵時間を従来の 2/3 (12 時間)に短縮して MK-7 産生量を最終的に通常菌の 23%に抑える納豆の短時間発酵方法を確立した。さらに、短時間発酵納豆に納豆らしい系引き(主成分: ポリグルタミン酸)を付与する為に、発酵補助剤としてグルタミン酸を 0.1 質量%以上 5 質量%以下で煮豆に添加し、納豆らしい系引きと風味とを獲得した。この製法については、『新たな納豆の製造方法』として特許出願を準備中である。

TTCC2051 株による短時間発酵で作製した納豆中の MK-7 を市販の 30g ミニパックに換算すると、1 食あたりの MK-7 摂取量は約 82 μ g で、プロコリーやほうれん草の 1 食分と同等かそれ以下となる。また、納豆菌は腸内でも MK-7 を産生し続けるという通説の真偽を検証したところ、納豆菌(孢子菌液)のみを 8 週間摂取しても、通常納豆を食べた群(n=5)のような血中 MK-7 濃度(ng/mL)の上昇はなかった。すなわち、通説に反して納豆菌は腸内では MK-7 を産生せず、MK-7 含有量の少ない納豆ならば、緑黄色野菜と同列に患者の日常の食事に組み入れることが可能と結論付けられた。そこで本課題では、上記 MK-7 低減化技術の信頼性・再現性を検証すべく、複数のロットの試作納豆について、冷蔵・冷凍保存中の MK-7 含有量の変化や食味、曳糸性などの機能性・官能性を綿密に評価する。その上で、『低ビタミン K 納豆』の機能性食品としての市販化を見据えた健常ボランティアおよびワルファリン内服患者による多段階臨床試験を実施する。

3. 研究の方法

MK-7 低産生菌と独自製法により MK-7 含有量を従来比 23%まで低減し得たが、開発する食品の最終スペックとして、既存納豆と遜色のない食味を有し、曳糸性が十分保持され、賞味期間を通じて MK-7 含有量が緑黄色野菜並みであることが必要となる。そこで順次被験食品の機能性・官能性試験を実施する。

《MK-7 低減化納豆の機能性・官能性試験》(研究分担者北村の食品工学研究室にて実施)

レオメーター・粘度計による曳糸性・粘度試験；市販納豆の賞味期限は通常冷蔵 10 日間であり、被験納豆の製造直後と冷蔵・冷凍保存各々10 日後、20 日後の糸引き長と粘度（単位 mPa・S）を計測し、市販納豆と遜色がないか比較評価する。

保存期間中の MK-7 含有量変化の分析；冷蔵および冷凍保存期間中の MK-7 低減の安定性を検証すべく、製造直後と冷蔵・冷凍保存各々10 日後、20 日後での納豆中の MK-7 含有量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分析する。

ボランティアによる食品官能性試験；健常ボランティア 20 名（男女各 10 名）による官能評価を実施する（におい・風味・糸引き・甘味・苦み・総合評価について、各項目を 7 段階で評価する。市販納豆をコントロール＝段階 4 として）。

《健常者およびワルファリン内服患者による MK-7 低減化納豆摂食多段階臨床試験》

（研究代表者平松が主導し、分担者加藤、長谷川とともに実施）

健常ボランティアによる MK-7 低減化納豆摂食後の血中 MK-7 濃度変化の確認後、

30 名のワルファリン内服患者による安全確認臨床試験を実施する

低減化納豆の MK-7 含有量は、30g で約 82 μ g、20g で約 55 μ g、10g で約 27 μ g であり、緑黄色野菜 1 食分と同等かそれ以下で、ワルファリン内服患者に許容される一日のビタミン K 摂取量制限内である。毎夕食時 10g を連続 14 日間摂食、3 週間以上の wash out を挟んで 20g を連続 14 日間摂食し、これを 1 クールとする。連続摂食前後で PT-INR と血中 MK-7 の有意な変化がないことを確認の後、第 2 クール（30g - wash out - 40g）へと進む。先行ボランティア試験は同様のプロトコールで血中 MK-7 濃度を測定する（倫理審査承認済）。

4．研究成果

納豆は納豆菌が産生する多量のビタミン K（MK-7）を含有するため、ワルファリン内服患者では一般に摂食は禁じられている。しかし納豆摂食を望む患者の声は強く、当グループが独自に開発を進めてきた納豆のビタミン K 低減化技術に基づき、ワルファリン内服患者が食べられる『低ビタミン K 納豆』の食品機能評価およびワルファリン内服患者による臨床試験を実施した。MK-7 低生産菌と独自製法により MK-7 含有量を従来比 20% 程度まで低減し、食品の機能性・官能性試験を実施した。その後健常者およびワルファリン内服患者による多段階臨床試験を行い、摂食前後で PT-INR と血中 MK-7 濃度の有意な変化がなく、ワルファリン内服患者でも安全に摂食可能な納豆である可能性を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Tomomi, Taya Yuki, Nishikawa Takanobu, Kitamura Yutaka, Kato Hideyuki, Mathis Bryan J., Hiramatsu Yuji	4. 巻 24
2. 論文標題 First Clinical Trial of a Newly Developed, Low Menaquinone-7, Fermented Soybean Natto in Warfarin-Dependent Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Food	6. 最初と最後の頁 860 ~ 865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/jmf.2021.0036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 雄一 (HASEGAWA Yuichi) (00251059)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	加藤 秀之 (KATO Hideyuki) (00813643)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究分担者	北村 豊 (KITAMURA Yutaka) (20246672)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------