

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650473

研究課題名（和文）ワーファリン内服患者のためのビタミンKオフ納豆風味食品の開発と臨床効果検定

研究課題名（英文）Development of MK-7 free fermented soy-bean-like food

研究代表者

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30302417

研究成果の概要（和文）：「ビタミンKを含まない納豆風味食品」の開発試験を実施した。発酵納豆から粘性物質を溶出し、この水溶液に紫外線照射を加えてビタミンKの分解および納豆菌の殺滅を図った。これを粉末化したものを別途蒸煮した大豆に還元し、納豆風味の煮大豆を得た。1) 納豆粘性物質中のビタミンKの分解特性の解明、2) 納豆粘性物質中の納豆菌の熱死滅特性の解明、3) 納豆粘性物質の乾燥特性の解明のための評価を実施し、紫外線照射や加熱操作の適用性の向上、粘性物質の保存性や加工性の向上、および高い次元での納豆風味の再現を目指した。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop MK-7 free fermented soy-bean-like food for the patients who are taking warfarin for anticoagulation therapy. UV was used to reduce MK-7 (vitamin K2) levels and decrease Natto-fungus in the viscous liquid obtained from fermented soy-bean. We evaluated the function of the MK-7 free fermented soy-bean-like food focusing on 1) efficiency of UV for MK-7 reduction, 2) temperature dependent Natto-fungus action, and 3) function of the dried viscous liquid. The developed food was completely MK-7 free and had good taste nearly like true natto.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：特殊栄養食品、納豆

1. 研究開始当初の背景

循環器系臨床において、人工弁置換術後・冠動脈疾患・不整脈等の患者は、致命的血栓予防のために抗凝固薬ワーファリンを半永久的に内服する。ワーファリンは、ビタミンKに拮抗して肝臓でのビタミンK依存凝固因子II, VII, IX, Xの合成を阻害する。人工弁患者は全国に数十万人存在し、生活習慣病である冠動脈疾患は増加の一途にあり、近い将来ワーファリン内服者数は百万人規模に到達し得る。ワーファリン内服時はビタミンK含

有量の多い食品を避けるが、納豆は納豆菌が産出するビタミンK2 (menaquinone-7; MK-7)の含有量が際立ち、また菌は腸内でもMK-7を産生するため、ワーファリン内服時の納豆摂食は一律に禁じられている。しかしながら、納豆禁食を惜しむ患者の声は強く、身近で優れた伝統栄養食品という観点からも、ワーファリン内服患者、特に生活習慣病患者や成長期の小児に納豆を禁ずることを医療者は永年憂いてきた。

そこで代表者らは、本学食品バイオマス工

学研究室と共同で、“MK-7を含有しない納豆の開発”という初期構想を掲げた。しかしながら、納豆菌によるMK-7産出を発酵温度や時間等により制御することや、発酵後の固形納豆からMK-7を除去することは困難であるとわかり、本研究のゴールを、「MK-7を含まない含有量の極めて低い納豆風味食品」の開発と臨床効果検定と定めた。

2. 研究の目的

(1) ビタミン K オフ納豆風味大豆食品の開発；開発する食品のコンセプトは、①納豆と同じ食味・食感を有する、②曳糸性を保持する、③ビタミン K2 (MK-7) 含有量がゼロ（フリー）または極めて低い（オフ）、の3点である。本研究では納豆自体の改質にこだわらず、納豆の粘性物質を利用して納豆風味を保持し、これに紫外線照射と熱処理を加えてビタミン K および納豆菌を除去した新たな食品の加工を目指す。新たな加工技術により以下の特性が発揮されることを期待する。

1. 粘性物質を水溶液とすることにより、紫外線照射や加熱操作の適用性が向上する
2. K オフとした粘性物質を粉末化することにより、粘性物質の保存性や加工性が向上する
3. 納豆由来の粘性物質を利用することにより、納豆の風味を再現できる

上記1 - 3の特性に関する定性的・定量的評価を行いながら、新たな加工技術を確立する。(2) ボランティアおよびワーファリン内服患者による納豆風味食品性能試験；筑波大学倫理委員会の承認と被験者の同意を得て、成人ボランティアに新開発食品を1週間連続摂取してもらい、経時的に血中MK-7濃度を測定する。有意な血中濃度変化がないことを確認した後、ワーファリン内服患者による臨床試験を行う。ワーファリン効力の指標であるPT-INR値の安定している患者に当該食品を1週間連続摂取してもらい、経時的に血中MK-7濃度とPT-INR値を測定、両指標に有意な変動がないことを確認する。納豆に代わる食品としての官能試験も実施する。

3. 研究の方法

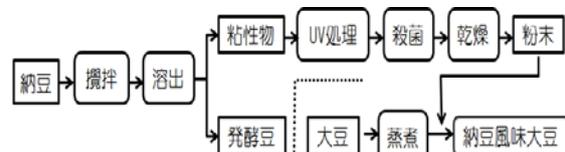
(1) ビタミン K オフ納豆風味食品の開発

ビタミン K (K2, menaquinone-7) を含有しない納豆を加工するためには、発酵過程での納豆菌によるビタミン K の産出を抑制する

か、あるいは発酵済み納豆中に生成されたビタミン K を分解・除去する二つの方式が考えられる。しかしながら、従来の納豆菌によるビタミン K の産出を、発酵温度や時間などの制御により抑制することは困難であることがわかった。またビタミン K は紫外線照射により分解されることが知られる[、紫外線は透過力が小さいので固形食品である発酵済み納豆への紫外線照射の効用は十分には期待できない。一方、納豆菌は摂食後の腸管内においてもビタミン K を産出し続けるため、これを防ぐためには納豆を喫食する前に納豆菌を殺滅することが必要である。ところが納豆菌は芽胞を形成するため、その殺菌には120℃以上の高温加熱が必要とされ、納豆の食味低下が懸念される。

このように上記二つの方式による納豆のビタミン K フリー化には克服し難い課題が多い。そこで本研究は発酵プロセスや発酵済み納豆の改質にこだわらず、納豆から取り出した粘性物質水溶液を利用して納豆風味を保持し、これに紫外線と熱処理を加えてビタミン K および納豆菌を除去した斬新な大豆食品の加工を目指す。

提案する加工フローを下図に示す。市販の納豆を攪拌して糸ひき状態としたものに浄水を加えて水洗することにより、納豆の粘性物質を溶出する。粘性物質水溶液に紫外線照射および加熱操作を施すことにより、含有されるビタミン K の分解および納豆菌の殺滅を図る。ビタミン K および納豆菌を除去した粘性物質水溶液を噴霧乾燥法により粉末化したものを別途蒸煮した非発酵の大豆に還元し、納豆風味の煮大豆を得る。



この新たな加工において期待される技術特性は以下の3点である。

- 1) 粘性物質を水溶液にすることにより、紫外線照射や加熱操作の適用性が向上する
- 2) 粉末化することにより、納豆粘性物質の保存性や加工性が向上する
- 3) 納豆由来の粘性物質を利用することにより、納豆の風味を再現できる

本加工プロセスの確立のために以下の三つの小課題を設定し、ビタミン K オフ納豆風味食品開発のための基礎資料を得る。

① 納豆粘性物質中のビタミン K の分解特性解明

市販納豆を攪拌・浄水溶出して得られる納豆粘性物質の水溶液を作成し、紫外線照射によるビタミン K の分解特性を明らかにする。粘性物質の濃度（水希釈率）や紫外線照射条件（紫外線照度、透過光路長、照射時間、温度など）がビタミン K の分解率に与える影響を明らかにする。紫外線照射は、紫外ランプ、照射セルより照射装置を構築して行う。ビタミン K の測定は HPLC による水溶性ビタミン K2 (MK-7) の定量により行う。

② 納豆粘性物質中の納豆菌の熱死滅特性の解明

市販納豆を攪拌・浄水溶出して得られる納豆粘性物質の水溶液を作成し、加熱による納豆菌の殺菌特性を明らかにする。粘性物質の濃度（水希釈率）や加熱条件（温度、時間など）が納豆菌の死滅率に与える影響を明らかにする。加熱はオートクレーブにより行う。納豆菌の計測は、供試液を用いた平板培養におけるコロニー計数法により行う

③ 納豆粘性物の乾燥特性の解明

市販納豆を攪拌・浄水溶出して得られる納豆粘性物質の水溶液を作成し、噴霧乾燥法による粉末化特性を明らかにする。粘性物の濃度（水希釈率、賦形剤添加量）や噴霧乾燥条件（噴霧圧、噴霧流量、乾燥温度など）が粉末の物性（水分、粒度、復元性）に与える影響を明らかにする。噴霧乾燥は回転円盤ノズル方式の噴霧乾燥機（既有）により行う。また粉末物性について、水分はろ乾法により、粒度は篩分け法により、復元性は水還元した粉末の曳糸性を引っ張り試験法により、それぞれ測定する。

これら①-③の基礎資料をもとに加工プロセスの最適化を図り、さらに蒸煮大豆への味付けや調味用たれの調整を施し、食味・食感を高い次元で再現した納豆風味食品を完成する。

(2) ボランティアおよびワーファリン内服患者による納豆風味食品性能試験

筑波大学倫理委員会の承認と被験者、患者の同意を得て実施する。検証前 1 ヶ月間抗凝固薬を含めた内服をせず、納豆禁食とした健康成人ボランティア 30 名に当該食品を 1 回

50g、1 日 2 回、7 日間連続で摂食してもらう。この間特定の野菜等ビタミン K 含有量の多い食品は摂取しない。摂食終了翌日まで毎朝血中 MK-7 濃度を測定する。血中濃度変化がないことを確認後、ワーファリン内服患者による試験に移行する。ワーファリン効力の指標・PT-INR（プロトロンビン時間 International Normalized Ratio）値が 2.0 前後に安定している患者 30 名に当該食品を 1 回 50g、1 日 2 回、1 週間連続摂食してもらい、摂食終了翌日まで毎朝血中 MK-7 濃度と PT-INR 値を測定する。途中 PT-INR に有意な変動があれば中止する。納豆代用品としての官能試験も実施する。

4. 研究成果

発酵納豆から曳糸性の粘性物質を浄水に溶出して粘質液を作成し、非加熱殺菌法でありビタミン K 分解作用が証明されている紫外線照射を用いて納豆菌の殺菌と MK-7 分解を同時に試みた。U 字型紫外線殺菌ランプを用い、液深 1mm の粘質液に対して照度・時間を変えながら紫外線を照射した。得られた試料を 37°C で 18 時間培養後、コロニー計数法により生残曲線を描き、殺菌に必要な照射量を求めた。照射後の液を 60°C で 20 時間乾燥させて粉末とし、この粘質液粉末の還元液の糸引き長をレオメーターにより計測した。また、粘質液粉末を添加した蒸煮大豆食品について、匂い、風味、糸引き、硬さ、苦み、甘味、総合評価の 7 点において市販の発酵納豆と比較した。

芽胞の存在により、紫外線照射開始から 500 秒までは粘質液中の菌数減少は緩徐であったが、600 秒以降は 10^{-8} まで急速に減少した。照射総量は 32.8 mJ/cm^2 で、照射前 $236 \mu\text{g}/100\text{g}$ であった MK-7 含有量は照射後 0 となった。加熱殺菌を試みた研究結果と比較して、粘質液粉末還元液の全ての濃度において本研究では糸引き長が長く保持された。全ての官能評価項目は市販の納豆に劣ったが、加熱殺菌した粉末と比べると糸引きと香りの評価が高かった。紫外線照射によって納豆菌を殺菌しビタミン K をオフとしながら、糸引き性能を含む食品特性を保持した納豆風味大豆食品を作成し得た。今後は風味等の改良を行いつつ、再びワーファリン内服患者およびボランティアによる性能試験を実施する予定である。

本研究、「ビタミン K オフの納豆の開発」は過去にチャレンジを見ない斬新なものである。従来の納豆菌によるビタミン K の産出を制御するのは著しく困難であるために、本研究のゴールは、「ビタミン K オフの納豆風味食品の開発と臨床効果検定」、すなわち発酵納豆と非発酵大豆の機能を融合した新しいコンセプトの食品開発および評価と定められた。克服すべき課題は多く、期待される斬新な食品加工特性を具現するためには、1) 納豆粘性物質中のビタミン K の分解特性の解明、2) 納豆粘性物質中の納豆菌の熱死滅特性の解明、3) 納豆粘性物質の乾燥特性の解明を果たし、最適な加工を施すための基礎技術を確立しなければならなかった。独創的な発想であるが故に抛りどころとなる理論やデータは限られたが、食品工学技術によってこの課題を克服し、日本の伝統的食文化を科学の力で支えるという姿勢を示すことは重要であった。

もちろん人工弁置換術後などのワーファリンを内服している患者数十万人の全てが納豆にこだわるわけではないであろうし、製品の市場規模のみを勘案すれば本研究の価値は不透明である。しかしながら本研究の成功は、医療現場に定着している「ワーファリンには納豆禁食」という固定観念を覆し、患者の食生活により高い自由度をもたらすことになる。日本の食文化を象徴する伝統食品のひとつである納豆を患者やその家族の元に返すことは、将来に渡って文化的なあるいは経済的な波及効果をもたらすものと推察される。日本人の食生活・食文化を科学の力で支え、医療と食文化の共存において妥協をしないという姿勢を示すことは、今後こうした多面的栄養科学研究が発展する上でも重要なメッセージとなるであろう。納豆の産地・茨城県にある大学が地元の食文化に関わるプロジェクトを打ち出すことにも意義があるものと感じている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) 北村 豊, 平松祐司, 斉藤有希. ビタミン K オフ納豆風味大豆加工食品の開発. *New Food Industry* 2013; 55: 21-28. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 平松祐司, 堀米仁志, 北村 豊. ビタミン K オフ納豆風味大豆食品の試作. 第76回茨城心臓血管研究会 2013年3月2日、つくば国際会議場、つくば市
- (2) 平松祐司, 北村 豊, 田中麻理, 堀米仁志, 榊原 謙. ワーファリン内服患者のためのビタミン K オフ納豆風味大豆食品の開発研究—第一報. 第43回日本心臓血管外科学会学術総会 2013年2月25日、ホテルグランパシフィック台場、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30302417

(2) 研究分担者

北村 豊 (KITAMURA YUTAKA)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：20246672
長谷川 雄一 (HASEGAWA YUICHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：00251059
堀米 仁志 (HORIGOME HITOSHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：50241823