

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350062

研究課題名(和文) 授乳婦のビタミンK高含有である納豆摂取が母乳中ビタミンK濃度へ与える影響

研究課題名(英文) The effect of Natto-eating for the vitamin K concentration in the breast milk

研究代表者

本間 和宏 (Kazuhiro, Homma)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00190273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、納豆などビタミンK高含有である食品を摂取した授乳婦の母乳を介する乳児におけるビタミンK摂取量の増加させるために、人乳中のビタミンK濃度の測定法としてhigh-performance liquid chromatography (HPLC)法を検討した。HPLC法により測定した母乳中のビタミンK濃度は、MK-4が 2.3 ± 1.0 ng/mL、PKが 5.8 ± 1.8 ng/mLであった。本研究の測定値は先行研究と同程度であった。以上より、HPLC法は母乳中のビタミンK、MK-4やPK濃度の測定法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the usefulness of the high-performance liquid chromatography method as the measurement of vitamin K in human milk for the purpose of increasing vitamin K concentration in human milk of lactating woman ate vitamin K rich food, Natto. As vitamin K concentration in human milk, Menaquinone-4 (MK-4) was 1.9 ± 1.0 ng/mL and Phylloquinone (PK) was 2.8 ± 1.0 ng/mL. These results agree with the previous reports. This study showed that the HPLC method was useful as a measurement of the vitamin K in breast milk.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：母乳 ビタミンK 乳児

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は、脂溶性ビタミンで、ビタミン K 群として Vitamin K1~K7 の 7 種類がある。自然界ではビタミン K1 (フィロキノン:PK) とビタミン K2 (メナキノン:MK-n、n はプレニル残基の数) の 2 形態が存在し、それ以外は科学的に合成されたものである。PK は主として、植物の葉緑体で産生されるので、緑色野菜中に多量に含有されている。バター、植物油、豆類 (大豆、きな粉、みそなど)、海草類 (あまのり、ひじき、わかめなど)、魚介類 (さば、あわび、さざえなど) は、少量の PK を含む。MK-n は細菌により合成され、特に納豆菌 (*Bacillus Natto*) は MK-7 を多量に生成するため納豆のビタミン K 含量は高い。人体での合成はなく人は食事で摂取する。

ビタミン K が血液凝固カスケードにおいて必須物質であることは良く知られている。ビタミン K は、ビタミン K 依存性カルボキシラーゼの補酵素として血液凝固因子の II (プロトロンビン)、VII、IX、X、プロテイン C と S の合成を触媒する。ビタミン K 不足による出血傾向を示す疾患としては生後 1 週間以内に消化管からの出血による吐血、下血が起こる新生児メレナが知られる。消化管疾患でもビタミン K 吸収不足が生じることもある。またビタミン K は骨塩基の基質の形成に必須であるカルボキシラーゼの補酵素としても重要で、その欠乏は骨の欠損あるいは骨粗鬆症を誘発することが知られている。ビタミン K はビタミン K 依存性エポキシドレダクターゼとビタミン K キノンレダクターゼの両酵素活性を阻害し、ビタミン K の肝における再利用を止め、ヒドロキノン型ビタミン K の生成を阻害する。血液凝固因子 (プロトロンビン、 、 、 プロテイン C と S) はビタミン K 依存性カルボキシラーゼの存在下で前駆体分子 (ヒドロキノン型ビタミン K) のアミノ末端側のグルタミン酸 (Glu) 残基が - カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基に変換されて生成される。プロトロンビン、 、 、 因子は、Gla 残基を持つことにより Ca^{2+} と結合ができ、血液中で凝血作用を発現する。

一方で、乳児では、ビタミン K 欠乏による出血症をきたすことがある。そのため、ビタミン K シロップ製剤の経口投与や筋肉注射などがビタミン K 欠乏性出血症の予防法として行われ、ビタミン K 欠乏性出血症の発症を予防しているのが現状である。しかし、稀ではなるものの、これらの予防法による壊死性腸炎や筋肉拘縮なども報告されていることから、これらの予防法とは異なる乳児にとって負担の少ないビタミン K 投与法の開発が必要と考えられる。

ビタミン K を多く含む食品としてはホウレンソウ、ケール、ブロッコリー、シソ、アシタバ、クレソン、春菊、小松菜、ニラなどが代表的である。納豆もビタミン K 高含量食

品であるが前述の野菜と異なり、大豆自体のビタミン K 含量は低いが発酵させる納豆菌が大量のビタミン K を生成する。

納豆には抗酸化作用がある報告がある上に、大豆イソフラボンの健康食品としての有用性が認識されたため FDA は 1 日で 25g の大豆蛋白の摂取を推薦している。納豆はかなりの日本人にとって習慣的食品となっており、嗜好性も高く、大豆の適切な供給源である。さらに、米国とヨーロッパでも東洋の食品店では広く入手可能である。これらの作用はビタミン K とは独立した効果であり、大豆イソフラボンの効果が期待できる。

納豆については表面の粘質物がビタミン K を高濃度に含むことに加え、食された納豆菌が摂取後数日間小腸でビタミン K を合成し続ける成績がある。しかし納豆菌の腸内生存の状態は腸内細菌叢と排便の状態に大きく左右されると考えられ、納豆経口摂取後の血漿ビタミン K 濃度は個々の摂取者間でも腸の状態の影響を受け納豆摂取による血中ビタミン K 値は安定しないと思われる。

しかしながら、納豆などのビタミン K 高含有である食品を授乳婦がすることで母乳中にビタミン K が移行し、乳児のビタミン K 摂取量の増加につながれば、現在行われているビタミン K 高含有のシロップ投与や筋肉注射など侵襲性の高い予防法ではなく、侵襲性の低い予防法を確立することができる。

2. 研究の目的

本研究では、納豆などビタミン K 高含有な食品を摂取した授乳婦の母乳を介して乳児におけるビタミン K 摂取量の増加を図ることを目的として、人乳中のビタミン K 濃度を HPLC 法により測定した。

3. 研究の方法

研究の趣旨を説明し、賛同を得られた授乳婦から母乳の提供を受けた。これらの母乳を試料とし、試料は各項目の測定まで - 80 にて冷凍保存した。

母乳中のビタミン K 濃度をするため、母乳中のビタミン K の抽出は下記の通り行った。均質化した試料 0.1g(W) を要領 50ml 褐色遠心管にとり、メタノール適量を加えて振とう (200 回/分、10 分間) した。遠心分離 (2,500 回転/分、5 分間) した後に、メタノール層 6ml を要領 50ml 褐色遠心管に分取し、水 1ml、n-ヘキサン 8ml を加えて振とう (200 回/分、5 分間) する。遠心分離 (2,500 回転/分 5 分間) して n-ヘキサン層 5ml を容量 10ml 褐色遠心管に分取し、n-ヘキサンを減圧留去した。人乳中のビタミン K 精製については、n-ヘキサン留去後の残留物に、n-ヘキサン 2ml を加えて溶解し、Sep-pak シリカカートリッジに通した。さらに容器を n-ヘキサン 1ml で洗浄し、洗液を Sep-pak シリカカートリッジに注いだのち、溶出液を捨て、さらに n-ヘキサン 10ml で洗浄した。次にジエチルエーテル-n-

ヘキサン混液(4:96V/V)5mlで溶出し、この溶出液を容量10ml共栓付褐色遠心管に採取し、ジエチルエーテル-n-ヘキサン混液を留去する。残留物にエタノール200 μ Lを加えて溶かし、測定用試験溶液とした。

高速液体クロマトグラフィー法による測定条件としては、分離カラム(内径4.6mm、長さ250mm TSKgel ODS-120T)、プレカラム(内径4.6mm、長さ50mm TSKgel ODS-120T)、還元カラム(内径4.0mm、長さ15mm RC10)、移動相(エタノール-メタノール混液(5:95V/V))、移動相流量:1.0ml/分、プレカラム洗浄液:エタノール-メタノール混液(1:1V/V)、プレカラム洗浄液流量:1.0ml/分、検出器:励起波長320nm、蛍光波長430nm、移動相切り替え時間:5分間 移動相カラムコンディショニング、5分後 検液注入 カラムスイッチング(プレカラムを系から外す)、25分間 プレカラム洗浄(プレカラム洗浄液を逆方向から流す)とした。

4. 研究成果

メタノール-エタノール混合液を移動相とするHPLC法を用いて、母乳中のビタミンK濃度の解析法を検討した。

移動相はエタノール:メタノール=5:95が望ましく、この条件では絶対検量線法でMK-4、MK-7、PKのそれぞれで直線性を有する検量線を得た。

母乳中のビタミンK濃度は、MK-4が 1.9 ± 1.0 ng/mL、PKが 2.8 ± 1.0 ng/mLであった。MK-4とPKの合計値をビタミンK濃度としていた先行研究と比較すると本研究の測定結果は同程度であった。

本研究では、納豆摂取が授乳婦の母乳中のビタミンK濃度に与える影響を検討するには至らなかったが、HPLC法が母乳中のビタミンKであるMK-4、PKの測定法として有用であることを明らかにした。母乳中のビタミンK濃度の測定法を確立したことは、食品中のビタミンKが授乳婦の体内から母乳に移行するメカニズムを解明する一助になると考えられた。さらに、現在の乳児ビタミンK欠乏性出血症の予防法を、乳児にとって侵襲性のあるビタミンK含有製剤の筋肉注射や経口投与などから、乳児にとって侵襲性のない納豆などビタミンK高含有な食品の摂取と母乳哺育へと変更する可能性を明らかにしたことは意義があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

M Yamaguchi, N Wakana, E Tanaka, K Homma.; Eating disorders in Japan: A Comparison with the USA. Journal of Agriculture Science, Tokyo University of Agriculture, 2015, 60, 16-176, 査読あり

若菜宣明、裏木喜久江、一場博幸、田中越郎、櫻村修生、本間和宏; 群馬県片品村の宿泊施設で提供される食事の栄養学的検討、日本健康医学会雑誌、2015、24(2)、171-177、査読あり

K Homma, N Wakana, H Ushijima, E Tanaka.; Immune factors in breast milk --Immunoglobulin and apoptosis of human milk cells--, the journal of the Japanese society for breastfeeding research, 2013, 7(1), 42-54, 査読有り

K Homma, Y Wada, M Enomoto, S Obi, N Wakana, E Tanaka.; Zinc deficiency in end-stage hepatocellular carcinoma patients treated with chemotherapy. Journal of Agriculture Science, Tokyo University of Agriculture, 2013, 58, 194-198, 査読有り

〔学会発表〕(計9件)

若菜宣明、本間和宏、田中越郎; 泌乳経過による人乳中のレプチン濃度とグレリン濃度の変動. 第24回日本健康医学会総会、2014年11月24日、ホテル日航東京(東京)

若菜宣明、本間和宏、山村節子、田中越郎; 人乳中のレプチン・グレリン濃度と総たんぱく質濃度との関連性. 第29回日本母乳哺育学会・学術集会、2014年10月11日、横浜市教育会館(神奈川)

若菜宣明、杉野翔子、青木加奈子、裏木喜久江、本間和宏、山村節子、田中越郎; 日本人における母乳中のレプチン濃度とグレリン濃度の検討. 第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月30日、酪農学園大学(北海道)

本間和宏、若菜宣明、浦勇春佳、中山真衣、裏木喜久江、山村節子、田中越郎; 母乳中のポリフェノール組成. 第68回日本栄養・食糧学会、2014年6月1日、酪農学園大学(北海道)

N Wakana, K Todoroki, K Homma, T Shizuma, E Tanaka, N Fukuyama. ; Preoperative branched-chain amino acids administration improved prognosis after hepatectomy in the elderly rats with diabetes mellitus. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2014年3月16日、Kagoshima University(鹿児島)

若菜宣明、裏木喜久江、本間和宏、田中越郎、福山直人; 老齢糖尿病ラットの肝切除術後肝再生に対する術前分岐鎖アミノ酸投与の有用性. 第29回日本静脈経腸栄養学会学

術集会、2014年2月27日、ヨコハマコンチ
ネンタルホテル(神奈川県)

若菜宣明、裏木喜久江、本間和宏、田中越
郎、福山直人；老齡糖尿病ラットの肝切除術
後肝再生に対する術前 BCAA 投与の有用性。
第23回日本健康医学会総会、2013年11月9
日、東京農業大学(東京)

本間和宏、若菜宣明、裏木喜久江、穂坂賢、
安藤達彦、田中越郎；ジブチ共和国の乾燥・
半乾燥地域における生活用水のフッ素濃度
及び農民の健康調査。第23回日本健康医学
会総会、2013年11月9日、東京農業大学(東
京)

N Wakana, K Todoroki, K Homma, T Shizuma,
E Tanaka, N Fukuyama.; Effect of
preoperative branched-chain amino acids
administration on liver regeneration in
the elderly hepatectomized rats with
diabetes mellitus. The 8th Asia Pacific
Conference on Clinical Nutrition. 2013年
6月9日, The Tokyo Bay Maihama Hotel Club
Resort(千葉)

[図書](計 1 件)

田中越郎、本間和宏、若菜宣明、光生館、
最新臨床栄養学(井上修二他)、第7章葉
と栄養・食事の相互作用(pp.93-100)、2015、
総ページ418

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

本間 和宏 (Homma Kazuhiro)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：00190273

(2)研究分担者

田中越郎 (TANAKA Etsurou)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：80211366

若菜宣明 (WAKANA Noriaki)
東京農業大学・応用生物科学部・助教
研究者番号：30508221

(3)連携研究者

()

研究者番号：