

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 5 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12736

研究課題名(和文)MK-7低産生菌、短時間発酵と紫外線加工によるビタミンK低減化納豆開発と性能試験

研究課題名(英文)Development and evaluation of MK-7 free fermented soy-bean using short-term incubation and ultraviolet radiation

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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループが数年に渡って数百種類の納豆菌サンプルの中から行ってきたMK-7低産生菌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31%にまで抑える発酵生産技術が獲得できた。本課題では、MK-7低減化技術を用いて納豆を作製し、これをひき割り化した後に紫外線照射によるMK-7分解とフリーズドライ加工を加え、さらなるMK-7低減化を図った。製造直後と2週間冷蔵・冷凍保存後のMK-7含有量、食味や曳糸性(引張試験で定量化)などの性能評価の後、摂食ボランティアの血液学的評価を実施しながら臨床試験へと進み、血中MK-7濃度の上昇は有意ではなく臨床応用可能な納豆との評価を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における地道なMK-7低産生菌探索作業と独自の短時間発酵技術により、ようやくワーファリン内服患者へのMK-7低減化納豆の解禁が現実味を帯びてきた。食品工学と医学の協調によって得られた成果を臨床研究に橋渡しし、ワーファリン内服患者に早期に成果を還元したい。本研究の成功は、医療現場の固定観念を覆すのみならず、将来に渡って地味ながら文化的・経済的波及効果をもたらすものと考えられる。日本の食文化をサイエンスとの協調で守り、医療と食文化の共存において妥協をしないという重要なメッセージを発信することのできる、納豆特産地・茨城発の多面的保健食品科学研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop MK-7 reduced fermented soy-bean for the patients who are taking oral warfarin administration for anticoagulation therapy. Newly developed short-term incubation method and UV radiation were used to reduce MK-7 (vitamin K2) levels contained in fermented soy-bean. We evaluated the function of the MK-7 reduced fermented soy-bean focusing on 1) reproducibility of MK-7 reduction technology, 2) efficiency of MK-7 reduction method using UV and short-term incubation, and 3) evaluation of freeze-dry method to maintain reduced MK-7 levels. The developed MK-7 reduced food had good function and quality for further clinical evaluation.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：納豆 ビタミンK ワーファリン 紫外線 短時間発酵

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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・心房細動等の患者は重篤な血栓症を発症しやすく、多くの患者は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。全国で 100 万人以上と推定されるワー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栄養指導されるが、納豆は納豆菌が産出する水溶性ビタミン K<sub>2</sub> (menaquinone-7; MK-7) を多量に含み、納豆菌は腸内でも MK-7 を産生すると古くから信じられているため、ワーファリン内服時には納豆摂取は一般に禁じられている。しかしながら、納豆を食べたいと望む患者の声は根強く、栄養価に優れた伝統食品という視点からも、ワーファリン内服患者、特に生活習慣病患者や小児に何とか納豆を提供したいという思いで本研究グループは MK-7 低含有納豆開発についての研究を開始した。

### 2. 研究の目的

国内で人工弁置換術後や心房細動などの心疾患患者 100 万人以上が内服する抗凝固薬ワーファリンは、ビタミン K に拮抗してビタミン K 依存凝固因子の肝での合成を阻害する。一方、納豆は納豆菌が産出する多量のビタミン K を含むため、ワーファリン内服患者では納豆摂取は一般に禁じられる。しかしながら、納豆を食べたいと望む患者の声は強く、ワーファリンの作用に干渉しない納豆が市販されれば患者にとって朗報である。本研究では、全国 100 万人以上のワーファリン内服患者が安心して食べられる保健機能食品、『ビタミン K 低減化納豆』の開発を企図し、性能試験を経て臨床応用を目指した。食品嗜好や食文化を守るにとどまらず、食品工学、食生活学と臨床医学を融合させて患者の quality of life 向上に寄与する、臨床・食品工学共同研究である。

### 3. 研究の方法

食品工学と臨床医学とが共同し、『ビタミン K 低減化納豆』の開発と臨床試験を実施した。MK-7 低産生菌探索と短時間発酵技術により通常の 31% まで MK-7 産生を抑えた納豆を土台に、これを照射効率の良い形態（ひき割り納豆）にして紫外線照射した納豆、それをさらにフリーズドライ加工することにより保存中の MK-7 産生抑制を図った納豆を試作した。3 種類の試作品について、製造直後と冷蔵あるいは冷凍で 2 週間（通常の賞味期限）保存した後の MK-7 含有量を分析した。また、これらの納豆を 8 週間に渡って連日摂取した際のボランティアの血中 MK-7 濃度を測定した。一定の MK-7 低減化が達成されたので、緑黄色野菜との同時食を避けるなど安全な摂取方法を検討した上で、倫理委員会の承認を受けてワーファリン内服患者による臨床試験を開始した。並行して、試作品の食味、曳糸性に関する定性的・定量的評価を実施した。

研究開始当初のコンセプトのようにビタミン K (MK-7) ゼロの納豆を加工するためには、発酵過程での MK-7 の産出を抑制するか、発酵済み納豆中に生成された MK-7 を分解・除去する二方式が考えられた。しかしながら、納豆菌による MK-7 産出の多寡を制御することは困難で、固形食品である発酵納豆への紫外線照射の効用も十分ではなかった。また、納豆菌は芽胞を形成するため、その殺菌を 120℃ 以上の高温加熱で試みたところ納豆の食味低下が著しかった。

このように当初の方式による納豆のビタミン K ゼロ化には克服し難い課題が多く、次善の策として、納豆から粘性物質のみ抽出して 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合わせて“納豆風味 MK-7 フリー大豆食品”を作成する方向に目標転換していた。ところが最近、数年に渡って数百種類の納豆菌サンプルの中から行ってきた MK-7 低産生菌探索と短時間発酵技術開発（発酵後半に MK-7 産生が高まるため）の成果により、MK-7 産生を通常の納豆の 31% にまで抑える発酵生産技術が獲得できた。また、納豆菌は腸内では芽胞化して MK-7 を産生しない可能性が示唆され、MK-7 低含有納豆ならば緑黄色野菜と同列にワーファリン内服患者の日常食に組み入れることが可能と考えた。そこで本課題では、必ずしもビタミン K<sub>2</sub> のゼロ化にはこだわらず、MK-7 低減化技術を用いて納豆を作製し、これをひき割り化した後に紫外線照射による MK-7 分解とフリーズドライ加工を加え、さらなる MK-7 低減化を図った。複数の納豆加工方法の組み合わせについて、製造直後と 2 週間冷蔵・冷凍保存後の MK-7 含有量、食味や曳糸性（引張試験で定量化）などの性能評価の後、摂取ボランティアの血液学的評価を実施して臨床試験へと進んだ。本研究グループが独自に開発した紫外線照射装置の改良と効率的な照射法の確立も研究の重要な柱であった。

ヒトによる性能評価は筑波大学医学医療系および附属病院臨床研究倫理委員会の承認と被験者の同意を得て実施した。ボランティア 10 名ずつに当該食品（低減化納豆、低減化ひき割り、フリーズドライのいずれか）を 1 回 50g、1 日 1 回夕食時、14 日間連続で摂取してもらった。この間緑黄色野菜等ビタミン K 含有量の比較的多い食品については、日常的な範囲内では制限しなかった。食事内容は詳細に記録した。摂取終了翌日まで 3 日おきに早朝空腹時に採血し、血中 MK-7 濃度を測定する（HPLC）。血中濃度に極端な上昇がないことを確認後、ワーファリン内服患者による臨床試験に移行した。ワーファリン効力の指標である PT-INR（プロトロンビン時間 International Normalized Ratio）値が 1.5-2.0 前後に安定している患者 10 名ずつに当該食品 3 タイプのいずれかを 1 回 10g、1 日 1 回夕食時、7 日間連続摂取してもらい、摂取終了翌日に血中 MK-7 濃度と PT-INR 値を測定した。途中 PT-INR に変動があれば中止した。食味に関する官能試験も並行して実施した。

#### 4. 研究成果

本研究グループが数年に渡って数百種類以上の納豆菌サンプルの中から行ってきた MK-7 低産生菌探索と短時間特殊発酵技術開発の成果により、MK-7 産生を通常の納豆の 31%にまで抑える発酵生産技術が獲得できたことは大きな一歩であった。本課題では、独自開発した MK-7 低減化技術を用いて納豆を試作し、これをひき割り化した後に紫外線照射による MK-7 分解とフリーズドライ加工を加え、さらなる MK-7 低減化を図った。製造直後と 2 週間冷蔵・冷凍保存後の MK-7 含有量、食味や曳糸性(引張試験で定量化)などの性能評価の後、摂食ボランティアによる血液学的評価を実施しながら低用量の 1 週間連日摂食による臨床試験へと進み、臨床試験の初期段階として血中 MK-7 濃度の上昇は有意ではなく臨床応用可能な納豆との評価を得た。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名:長谷川雄一

ローマ字氏名:Hasegawa Yuichi

所属研究機関名:筑波大学

部局名:医学医療系

職名:准教授

研究者番号(8桁):00251059

研究分担者氏名:北村 豊

ローマ字氏名:Kitamura Yutaka

所属研究機関名:筑波大学

部局名:生命環境系

職名:教授

研究者番号(8桁): 20246672

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。