

博士学位論文

ビタミン K の栄養状態に及ぼす  
食事因子の影響

2017 年 2 月

名古屋学芸大学大学院

栄養科学研究科

半澤 史聡

# 目次

---

第1章 緒論.....	1
第2章 ビタミン E 摂取によるビタミン K 濃度の低下 .....	6
2-1 目的.....	6
2-2 実験材料と方法.....	7
2-3 結果.....	9
2-4 考察.....	20
第3章 ゴマ摂取によるビタミン K 濃度の上昇.....	22
3-1 目的.....	22
3-2 実験材料と方法.....	25
3-3 結果.....	27
3-4 考察.....	34
第4章 総合討論.....	37
第5章 要約.....	40
引用文献 .....	41
謝辞.....	47

## 略語

ANOVA	analysis of variance / 分散分析
CD36	cluster of differentiation 36
CEHC	2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman / 2-(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン
$\gamma$ -CEHC	2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman / 2,7,8-トリメチル-2-(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン
CM	chylomicron / キロミクロン
CMR	chylomicron remnant / キロミクロンレムナント
CYP	cytochrome P450 / シトクローム P450
GGCX	$\gamma$ -glutamyl carboxylase / $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ
Gla	$\gamma$ -carboxylglutamic acid / $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸
Glu	glutamic acid / グルタミン酸
HDL	high density lipoprotein / 高密度リポタンパク質
HPLC	high-performance liquid chromatography / 高速液体クロマトグラフィー
LDL	low density lipoprotein / 低密度リポタンパク質
MD	menadione / メナジオン
MK	menaquinone / メナキノン
NPC1L1	Niemann-pick C1-like 1 / ニーマンピック C1 様タンパク質 1
PIVKA-II	protein induced by vitamin K absence or antagonist II
PK	phylloquinone / フィロキノン
PMC	2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol / 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール
SR-B1	scavenger receptor class B member 1 / スカベンジャー受容体クラス B メンバー1
SXR	steroid and xenobiotic receptor / ステロイド X 受容体
SXRE	SXR responsive element / ステロイド X 受容体応答配列
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substance / チオバルビツール酸反応性物質
TG	triacylglycerol / トリアシルグリセロール

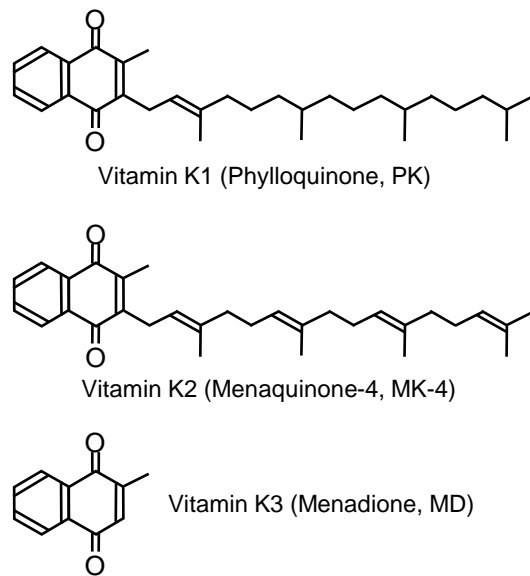
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸
$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -tocopherol transfer protein / $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質
UBIAD1	UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 / UbiA プレニルトランスフェラーゼドメイン含有タンパク質 1
ucOC	undercarboxylated osteocalcin / 低カルボキシル化オステオカルシン
VKDP	vitamin K dependent protein / ビタミン K 依存性タンパク質
VKORC	vitamin K epoxider reductase / ビタミン K エポキシド還元酵素
VLDL	very low density lipoprotein / 超低密度リポタンパク質

# 第 1 章 緒論

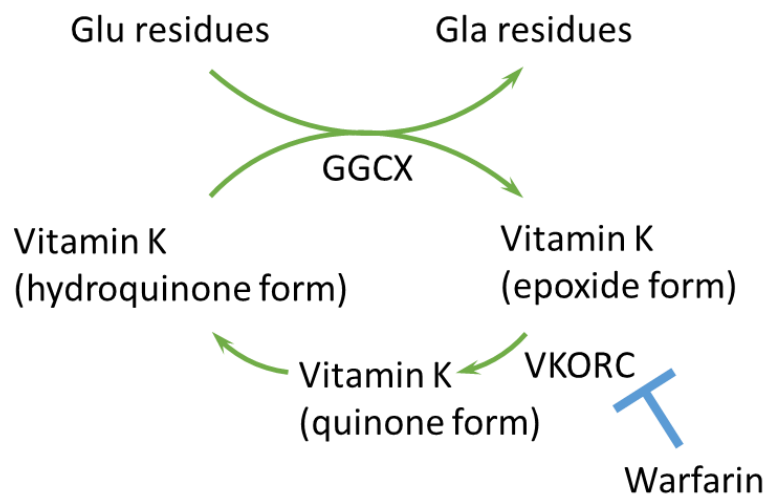
ビタミン K は脂溶性ビタミンに分類される栄養素であり、天然に存在するビタミン K は、ナフトキノン骨格にフィチル基を側鎖にもつ K1 (フィロキノン、PK) と、プレニル基を側鎖に持つ K2 (メナキノン、MK) に分類される。MK は、さらに側鎖の長さによって分類され、代表的な MK である MK-4 は、側鎖に二重結合を 4 つ持っている (Fig. 1)。

ビタミン K は、ビタミン K 依存性タンパク質 (VKDP) の翻訳後修飾に際して、そのグルタミン酸 (Glu) 残基を $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基に変換する反応 (Gla 化) に必須の補因子である。この反応を触媒する酵素をビタミン K 依存性カルボキシラーゼ (GGCX) といい、この酵素は還元型 (hydroquinone form) のビタミン K を用いて、VKDP のグルタミン残基をカルボキシ化して Gla 化する (日本ビタミン学会, 2000)。この際、還元型ビタミン K はエポキシド型 (epoxide form) となる。エポキシド型のビタミン K は、ビタミン K エポキシド還元酵素 (VKORC) により酸化型ビタミン K となった後、還元型ビタミン K に戻される (Fig. 2)。この一連の反応をビタミン K サイクルと呼び、ビタミン K は、生体内で効率よく利用されている (Suttie ら, 1980)。

血液凝固因子であるプロトロンビン、第 VII、第 IX、第 X 因子はビタミン K 依存性タンパクであることが知られており、ビタミン K が欠乏すると血液凝固不全が引き起こされ、新生児メレナや乳児の頭蓋内出血が引き起こされる (Puckett と Offringa, 2000)。これらは予後が不良のため、我が国では予防のために、新生児期と一か月後健診の際、新生児にビタミン K として MK-4 が投与されている (白幡ら, 2012)。また、血栓塞栓症の予防・治療薬として用いられているワルファリンは、VKORC を阻害することによって、ビタミン K サイクルを抑制する (Fig. 2)。ビタミン K の過剰摂取はワルファリンの効果を減弱させるため、ワルファリンの服用患者は、ほうれん草や納豆などのビタミン K を豊富に含む食品を多量に摂取することを禁じられている (エーザイ株式会社, 2016)。また、血液凝固因子の他に、骨芽細胞で作られ、骨形成のマーカーとなるオステオカルシンもビタミン K 依存性タンパク質として知られており、ビタミン K は、正常な骨代謝の維持に重要である。高齢者を対象としたコホート研究において、ビタミン K 摂取量と骨折との間に負の相関がある (Shiraki ら, 2000、Geleijnse ら, 2004)。骨粗鬆症モデル動物である卵巣切除 (Akiyama ら, 1999)、坐骨神経切除 (Iwamoto ら, 2003) および高脂肪食摂取動物 (Kim ら, 2013) を用いた実験によって、ビタミン K の摂取が、骨密度低下を抑制することが報告されている。他にも、ビタミン K は、精巣におけるテストステロン産生 (Shirakawa ら, 2006)、脳における電子伝達系の維持 (Vos ら, 2012)、動脈石灰化抑制作用 (Azuma ら, 2009) など、様々な働きが注目されている。このようなことから、ビタミン K の適切な栄養状態の維持は、栄養学における重要課題の一つである。



**Figure 1** Structures of vitamin K homologues.



**Figure 2** Vitamin K cycle

Gla,  $\gamma$ -carboxyglutamic acid; Glu, glutamic acid; GGCX,  $\gamma$ -glutamyl carboxylase; VKORC, Vitamin K epoxide reductase

私たちが食事から摂取するビタミン K の大部分は PK である (Kamao ら, 2007) 。 PK は、血中で特異的な輸送体を持っていないため、臓器間輸送をリポタンパク質代謝に依存している (Lamon-Fava ら, 1998) 。 摂取した PK は、コレステロール輸送体であるニーマンピック C1 様タンパク質 1 (NPC1L1) (Takada ら, 2015) 、スカベンジャー受容体クラス B タイプ 1 (SR-B1) および cluster of differentiation 36 (CD36) などの小腸に発現するコレステロール輸送体を介して吸収されると考えられている (Goncalves ら, 2014) 。 小腸で吸収された PK のほとんどは、トリアシルグリセロール (TG) を豊富に含むキロミクロンによって肝臓へ運ばれ、さらに VLDL および LDL を介して肝外組織へと運搬される。肝外組織に運搬された PK は、側鎖の外れたメナジオン (MD) となり、変換酵素である UbiA プレニルトランスフェラーゼドメイン含有タンパク質 1 (UBIAD1) によって、MK-4 へ変換される (Okano ら, 2008、Nakagawa ら, 2010) 。 また、最近になり、摂取した PK は小腸で MD に変換され、リンパ管を介して各組織に運搬される経路が報告された (Hirota ら, 2013) (Fig. 3) 。

また、ビタミン E 水酸化酵素として知られる CYP4F2 が、PK および MK-4 の水酸化活性も示すことが報告され (McDonald ら, 2009、Edson ら, 2013) 、ビタミン E と同様にビタミン K も、肝臓で CYP 依存性代謝経路によって異化されることが示唆された (Fig. 4) 。 肝臓で水酸化を受けた PK は、その後の  $\beta$  酸化の繰り返しによって側鎖が短くなった代謝産物に代謝されて、尿中に排泄される (Shearer と Barkhan, 1973) 。 この PK 代謝産物の尿中排泄量が、PK 摂取量を反映することも報告されている (Harrington ら, 2007) 。 ビタミン K 代謝産物として、MD が尿中に排泄されることも確認されている (Thijssen ら, 2006) 。

ビタミン K 代謝を変動させる因子として、ワルファリンのような薬物との関連は知られているが、他のビタミンや食品成分などの食事因子による影響については、明らかになっていない。我々は栄養素を食事から摂取する際、常に一つの栄養成分を単体で摂取することではなく、他の栄養素や食品成分などの食事因子と同時に摂取している。そのため、ビタミン K の適切な栄養状態を維持するためには、摂取した食事因子が他の栄養素の代謝に影響を与え、相互作用を示し、栄養学的機能が上昇もしくは低下する可能性について考慮する必要がある。本研究では、同時に摂取する食事因子がビタミン K 代謝を変動させ、体内のビタミン K 濃度が大きく変動すれば、ビタミン K の機能が影響を受ける可能性を考慮し、食事因子によってビタミン K の代謝が変動するかどうか明らかにすることを目的とした。

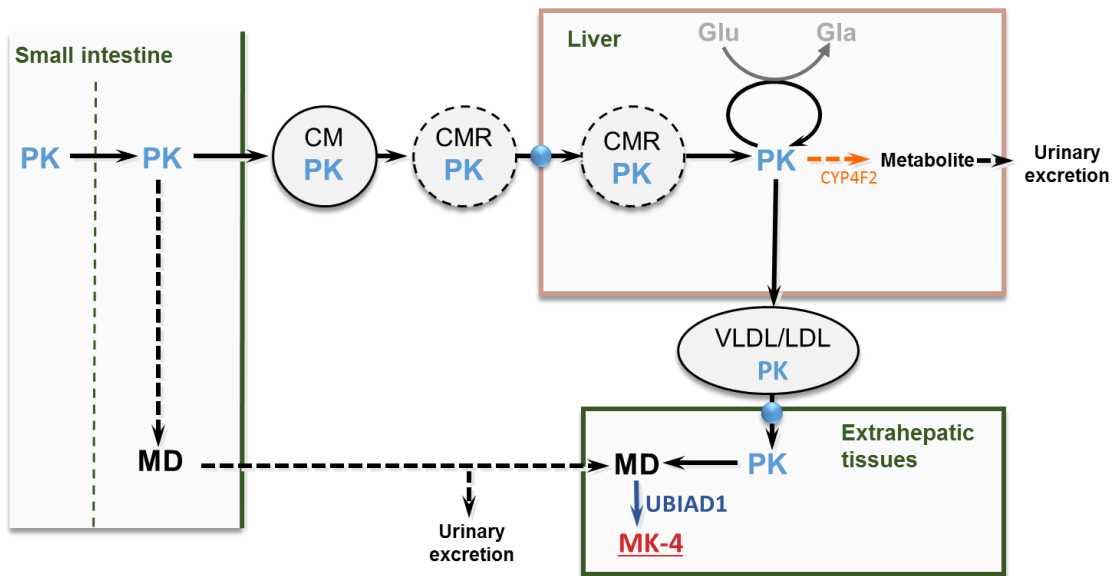
ビタミン E は、ビタミン K と同じ脂溶性ビタミンで、構造も類似している。また、ビタミン E とビタミン K は、リポタンパク質による臓器間輸送や、異化酵素が共通している。そのため、代謝の過程で互いに影響を及ぼす可能性がある。古くから知られているビタミン E 過剰摂取による血液凝固能の低下や骨密度低下などのビタミン K 欠乏様症状 (Horwit, 1976、Traber, 2008) の原因は、ビタミン E によって体内ビタミン K 濃度が変動するた

めではないかとの仮説を立てた。そこで、第 2 章では体内ビタミン K 濃度に対するビタミン E 摂取の影響を明らかにすることを目的とした。

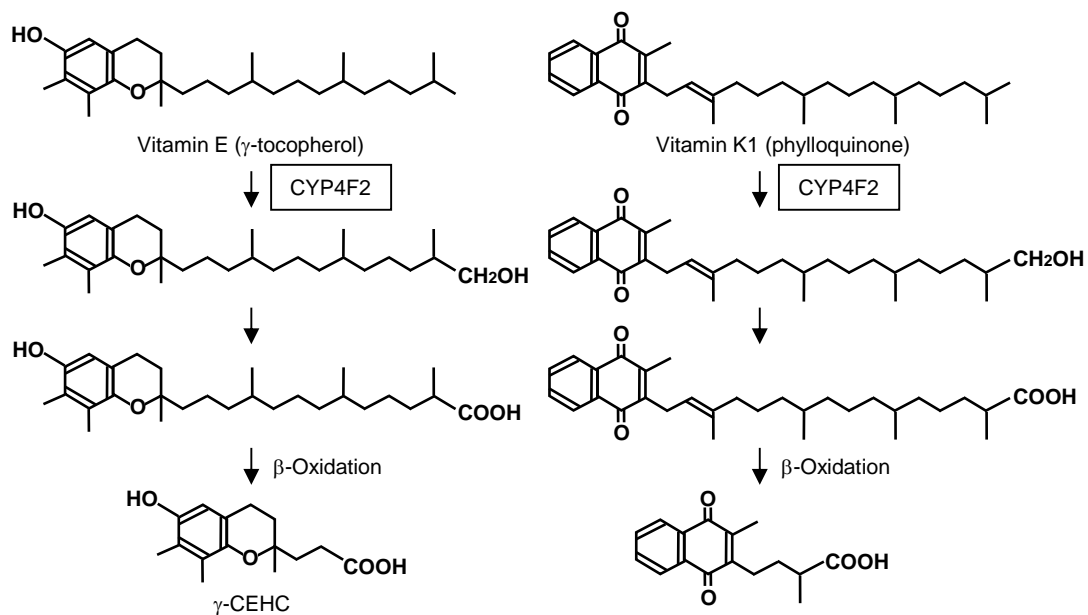
また、これまでに当研究室では、ゴマに含まれるセサミンが、ビタミン E 異化酵素である CYP4F を阻害することにより、体内のビタミン E 濃度を上昇させることを見出している (Ikeda ら, 2002)。ビタミン K はビタミン E と同一の酵素である CYP4F2 によって異化されるため、セサミンは、ビタミン E だけでなくビタミン K の異化も阻害し、体内のビタミン K 濃度に影響を及ぼす可能性がある。そこで、第 3 章ではビタミン K 濃度に及ぼすゴマ摂取の影響を明らかにすることを目的とした。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章で得られた結果から想定された、食品因子によるビタミン K 代謝の変動について総合的に考察した。





**Figure 3** Metabolic pathway of vitamin K. CM, chylomicron; CMR, chylomicron remnant; CYP4F2, cytochrome P450 4F2; Gla,  $\gamma$ -carboxyglutamic acid; Glu, glutamic acid; LDL, low density lipoprotein; MD, menadione; MK-4, menaquinone-4; PK, phylloquinone; UBIAD1, UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1; VLDL, very low density lipoprotein.



**Figure 4** Cytochrome P450-dependent metabolic pathway of vitamin E and K. CYP, cytochrome P450;  $\gamma$ -CEHC, 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman

## 第2章 ビタミンE摂取によるビタミンK 濃度の低下

### 2-1 目的

ビタミンKは、血液凝固反応に必須の栄養素である。同じ脂溶性ビタミンであるビタミンEを過剰摂取すると、ビタミンK欠乏性出血を引き起こす可能性が指摘されており、ビタミンKとビタミンEの相互作用が推測されている(Horwitt, 1976、Traber, 2008)。ニワトリ(Marchら, 1973、Frankら, 1997)やラット(Wheldon, 1983、Abdoら, 1986)において、 $\alpha$ -トコフェロールの過剰摂取により、血液凝固の指標であるプロトロンビン時間を延長したことが報告されている。Helsonらは、ヒトにおいて、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量が増えることによって、プロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間が延長することを見出している(Helsonら, 1984)。さらにBoothらは、ヒトにおいて、 $\alpha$ -トコフェロールの投与がビタミンK欠乏の指標となる低カルボキシル化プロトロンビン生成物のProtein induced by vitamin K absence or antagonists (PIVKA-II)の濃度を上昇させることを報告している(Boothら, 2004)。また、ビタミンKは正常な骨代謝の維持においても重要な役割を果たしている。 $\alpha$ -トコフェロールの過剰摂取は破骨細胞を活性化することによって、マウスやラットの骨量を低下させることが近年報告されている(Fujitaら, 2012)。ビタミンE摂取による血液凝固能および骨量の低下は、ビタミンEがビタミンKの生理活性を低下させたことによるものではないかと考えられる。

ビタミンK代謝とビタミンE代謝には、多くの共通点がある(Traber, 2008)。消化管上皮に存在するコレステロール輸送体のNPC1L1、SR-BIおよびCD36は、ビタミンE及びPKの輸送に関わることが報告されている(Takadaら, 2015、Goncalvesら, 2014)。また、ビタミンEとビタミンKは脂溶性ビタミンであり、血中に特異的な結合タンパク質や輸送担体を持たないため、臓器間輸送をリポタンパク質に依存している。ビタミンEとPKはTGを豊富に含むキロミクロンとVLDLによって輸送され(Lamon-Favaら, 1998、Erkkiläら, 2004)、小腸で吸収された食事由来のビタミンEとPKの多くは、肝臓を介したリポタンパク質輸送機能によって、各組織へ運搬される(Shearerら, 2012、KaydenとTraber, 1993)。

また、ビタミンE水酸化酵素であるCYP4F2(SontagとParker, 2002)が、PK(McDonaldら, 2009)とMK-4(Edsonら, 2013)の水酸化活性も示すことが報告されている。ビタミンEとビタミンKは主に肝臓でフィチル鎖やプレニル鎖が $\omega$ 水酸化され、その後の $\beta$ 酸化によって側鎖の短い代謝産物となり、抱合体として主に尿中に排泄される(Fig. 4)(Schultzら, 1995、Swansonら, 1999、Lodgeら, 2001)。フィチル鎖が短くなった

PKの代謝産物がグルクロン酸抱合体としてヒト尿中に存在することや (Shearer と Barkman, 1973)、このPK代謝産物の尿中排泄量がPK摂取量を反映することが明らかになっている (Harrington ら, 2007)。このように、ビタミンEとKは、臓器間の運搬および異化の過程を含む代謝経路がよく似ていることから、ビタミンEとビタミンKとの間には代謝上の相互作用があることが推察された。

これまでに、ビタミンE摂取による体内ビタミンK濃度への影響を検討した試験がいくつか報告されている。 $\alpha$ -トコフェロールを摂取させたラットにおいて、腎臓・精巣・脳のPK、もしくはMK-4濃度の低下が認められた (Tovar ら, 2006)。また、ラットの皮下に $\alpha$ -トコフェロールを毎日投与したところ、1週間後の組織のMK-4濃度の低下が認められた (Farley ら, 2012)。しかし、これらは一部の組織のビタミンK濃度を検討した結果の報告である。先に述べた通り、ビタミンKは、肝臓をはじめ、骨などの様々な組織で重要な働きをする栄養素である。第2章では、全身の各組織でのビタミンK代謝の変動を明らかにする必要があると考え、ラットにビタミンKとビタミンEを摂取させた際の、全身の各組織での体内ビタミンK濃度に対するビタミンE摂取の影響を明らかにすることを目的とした。

## 2-2 実験材料と方法

### 実験材料と実験動物

PKおよびMK-4は、シグマアルドリッチジャパンから購入した。ビタミンK定量の内部標準として用いたMK-3はエーザイ株式会社から、また天然型トコフェロールである *RRR*- $\alpha$ -トコフェロールおよび *RRR*- $\gamma$ -トコフェロールはエーザイフード・ケミカル株式会社から、供与されたものを用いた。

Wistar系雄性ラットを日本エスエルシーから購入し、12時間の明暗サイクル (明期8~20時、暗期20~8時)、温度24°C、湿度55%の飼育室内で個別飼育した。飼育期間中は、水および飼料を自由摂取とした。本実験は、名古屋学芸大学動物実験委員会の事前の審査により承認され、「名古屋学芸大学動物実験指針」を遵守して行った。

### 実験1：ビタミンK濃度に及ぼす $\alpha$ -および $\gamma$ -トコフェロール摂取の影響

4週齢のラットを3群に分け、ビタミンE無添加飼料 (F群, n=7)、*RRR*- $\alpha$ -トコフェロール添加飼料 (100 mg/kg 飼料) (A群, n=7)、または *RRR*- $\gamma$ -トコフェロー

ル添加飼料（100 mg/kg 飼料）（G 群, n = 7）を、それぞれ 4 週間摂取させた。飼料組成は AIN93 精製飼料に準拠した。飼料 1 kg 当たりの添加量（g）は Table 1 の通りである。調製した飼料は遮光状態で -30°C で冷凍保存し、調製後 1 週間以内に使用した。ラットには飼料を自由摂取させ、断頭により屠殺した。肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳を採取して -30°C で保存した後、ビタミン K および E の定量に供した。

### 実験 2・3： $\alpha$ -トコフェロール摂取量の違いがビタミン K 濃度に及ぼす影響

実験 2 では、4 週齢のラットを 4 群に分け、ビタミン K として PK を添加（0.75 mg/kg 飼料）し、ビタミン E として *RRR*- $\alpha$ -トコフェロールを 0、10、50 または 500 mg/kg（F、T10、T50 および T100 群）添加した飼料を、それぞれ 6 週間摂取させた。基本飼料の組成と、飼料調製およびその取り扱い方法は、Table 1 に記載した通りである。ラットには飼料を自由摂取させ、断頭により屠殺した。血清、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳を採取し、-30°C で保存した後、ビタミン K および E の定量に供した。

実験 3 では、4 週齢のラットを 4 群（n = 7/群）に分け、ビタミン K として MK-4 を添加（0.75 mg/kg 飼料）し、ビタミン E として *RRR*- $\alpha$ -トコフェロールを 0、10、50 または 500 mg/kg（F、T10、T50 および T100 群）添加した飼料を、それぞれ 6 週間摂取させた。基本飼料の組成と、飼料調製およびその取り扱い方法は、Table 1 に記載した通りである。ラットには飼料を自由摂取させ、断頭により屠殺した。血清、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳を採取し、-30°C で保存した後、ビタミン K および E の定量に供した。

### 実験 4： $\alpha$ -トコフェロールの経口投与がビタミン K 濃度に及ぼす影響

4 週齢のラットにビタミン K と E の無添加飼料（Table 1）を 4 週間摂取させることによって、体内のビタミン K と E を欠乏させた。その後、ラットを 6 群に分けた。3 群（n = 6/群）には、PK 0.2 mg と、*RRR*- $\alpha$ -トコフェロール 0、1 または 10 mg（P0、P1 および P10 群）を添加したエマルジョン 1 mL を、ゾンデを用いて経口投与した。残りの 3 群（n = 7/群）には、MK-4 を 0.2 mg と、*RRR*- $\alpha$ -トコフェロール 0、1 または 10 mg（M0、M1 および M10 群）添加したエマルジョン 1 mL を、ゾンデを用いて経口投与した。すべてのエマルジョンにはタウロコール酸ナトリウム 200 mg、トリオレイン 200 mg、アルブミン 50 mg および水を加え、経口投与の直前に調製した（Table 2）。ラットにはエマルジョンの経口投与の前まで飼料を自由摂取させ、経口投与後は絶食とした。経口投与から 6 時間後にラットを断頭により屠殺し、血清、肝臓、腎臓、副腎、肺、心臓、精巣および脳を採取した。これらの試料は -30°C で保存した後、ビタミン K および E の定量に供した。

### ビタミン E 濃度の測定

血清と臓器のビタミン E 濃度の測定は、Ueda と Igarashi の方法に従った（Ueda と Igarashi, 1987）。生体試料中のビタミン E は、ヘキサン抽出後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により測定した。内部標準には、2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノー

ル (PMC) を用いた。分析に使用した機器は、蛍光検出器 (島津 RF-10AKL、励起波長 298 nm、蛍光波長 325 nm) 付き HPLC 装置 (島津 LC-10AD) であり、分析カラムには Wakosil 5SIL (4.6 × 250 nm、和光純薬) を使用した。溶離液にはヘキサン : 1,4-ジオキサン : 2-プロパノール=494 : 5 : 1 を用い、流速は 1.2 mL/分とした。

### ビタミン K 濃度の測定

血清と臓器の PK および MK-4 濃度の測定は、Yamamoto らの方法に従った (Yamamoto ら, 1997)。生体試料中のビタミン K は、ヘキサン抽出後、HPLC 法により測定した。内部標準には、MK-3 を用いた。分析機器は、蛍光検出器 (島津 RF-10AKL、励起波長 320 nm、蛍光波長 430 nm) 付き HPLC 装置 (島津 LC-10AD) であり、プレカラムと分析カラムには Luna 5 μm C18 (50×4.6 mm、Phenomenex) および Luna 5 μm C18 (2) (250×4.6 mm、Phenomenex) を用い、還元カラム (資生堂 RC-10)、カラムオープン (島津 CTO-20A) を使用した。溶離液にはエタノール : メタノール=5 : 95 を用い、流速は 1.0 mL/分とした。

### 統計処理

結果の値は、平均値±標準誤差で表した。結果の検定は、一元配置分散分析と Tukey's post hoc test で解析した。分散が統計的に等しくない場合については、一元配置分散分析の前に結果を対数変換した。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。全てのデータは、GraphPad Prism 6 for Windows を用いて解析した。

## 2-3 結果

### 実験 1 : ビタミン K 濃度に及ぼす $\alpha$ -および $\gamma$ -トコフェロール摂取の影響

実験 1 では、ビタミン K 濃度に対する  $\alpha$ -トコフェロールと  $\gamma$ -トコフェロールの低下効果を検討した。私たちが食事から摂取しているビタミン K のほとんどは PK であるため (Kamao ら, 2007) 本実験では飼料中のビタミン K として PK を用いた。飼育期間終了後の体重、肝臓重量および飼料摂取量には、群間に差が見られなかった (Table 3)。肝臓、腎臓、心臓および脳の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、A 群が他の群と比較して有意に高値を示し、これらの組織の  $\gamma$ -トコフェロール濃度は、G 群が他の群と比較して有意に高値を示した。

すべての飼料の PK 含量が等しいにも関わらず、F 群と比較して A 群の腎臓、心臓および筋肉の PK 濃度と腎臓の MK-4 濃度は低下し、脳の PK 濃度は低下する傾向を示した ( $P = 0.063$ ) (Table 3)。一方、G 群の肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳の PK 濃度と MK-4 濃度は、F 群と同程度であった。以上の結果から、ラット肝外組織の PK 濃度は、

ビタミン E として  $\alpha$ -トコフェロールを摂取させた際には低下するが、 $\gamma$ -トコフェロールを摂取させた際には変わらないことが明らかになった。

## 実験 2: $\alpha$ -トコフェロール摂取量の違いがフィロキノン摂取時のビタミン K 濃度に及ぼす影響

実験 1 では、 $\alpha$ -トコフェロール摂取によって PK および MK-4 濃度が低下したが、 $\gamma$ -トコフェロール摂取による低下は見られなかった。実験 2 では、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量の違いが PK 摂取ラットのビタミン K 濃度に及ぼす影響を調べた。体重、肝臓重量および飼料摂取量には、群間に差は見られなかった (Table 4)。血清の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、T50 群および T500 群で同程度であったが、肝臓と腎臓の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量が多いほど上昇していた。

血清の PK 濃度はすべての群に差は見られず、肝臓中の PK 濃度は、F 群に比べて T500 群で上昇した (Fig. 5)。これに対して、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳の PK 濃度は、F 群に比べて、T10 群では差がなかったが、T50 群では有意に低下した。肺、心臓、筋肉、精巣および脳の PK 濃度は、T50 群に比べて、T500 群でさらに低下した。

PK 摂取ラットの血清および肝臓の MK-4 濃度は、F 群に比べて、T500 群で上昇した (Fig. 6)。これに対して、腎臓、精巣および脳の MK-4 濃度は、F 群に比べて、T50 群と T500 群で低下した。 $\alpha$ -トコフェロール摂取による PK 濃度の低下と比べると、MK-4 濃度の低下は緩やかであった。

## 実験 3: $\alpha$ -トコフェロール摂取量の違いがメナキノンを 4 摂取時のビタミン K 濃度に及ぼす影響

食事からの MK-4 摂取量は、ビタミン K の総摂取量のわずか 7.3%に過ぎないが (Kamao ら, 2007)、わが国では、MK-4 は薬剤として用いられている。MK-4 は、新生児や乳児のビタミン K 欠乏性出血予防のために投与されているほか、骨粗鬆症治療薬のメナテトレノンとして服用されている。実験 3 では、MK-4 摂取ラットの MK-4 濃度に及ぼす  $\alpha$ -トコフェロール摂取の影響を調べた。体重、肝臓重量および飼料摂取量に、群間差は見られなかった (Table 5)。実験 2 の結果と同様に、血清の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、T50 群および T500 群で同程度であったが、肝臓と腎臓の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量が増えるにつれて上昇した。

肝臓の MK-4 濃度は、F 群および T10 群と比べて、T50 群および T500 群で上昇した (Fig. 7)。しかし、血清、腎臓、肺、心臓、筋肉、精巣および脳の MK-4 濃度は、すべての群で同程度であった。以上の結果から、MK-4 摂取時、 $\alpha$ -トコフェロールは体内の MK-4 濃度にほとんど影響を与えないことが明らかになった。

#### 実験 4： $\alpha$ -トコフェロールの経口投与がビタミン K 濃度に及ぼす影響

実験 2、3 の結果から、 $\alpha$ -トコフェロール摂取は、PK 摂取ラットの肝外組織の PK 濃度を明らかに低下させるが、MK-4 摂取ラットの肝外組織の MK-4 濃度には影響しないことが明らかになった。これらの飼料摂取の実験における組織のビタミン K 濃度は、組織への取り込みや排泄などを含めた動的平衡状態の結果である。そこで、実験 4 では、ビタミン K・E 欠乏ラットに、PK または MK-4 と、 $\alpha$ -トコフェロールを経口投与した。6 時間後の肝臓の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は、P0、P1、P10、M0、M1 および M10 群で、それぞれ  $9 \pm 0.5$ 、 $22 \pm 1$ 、 $131 \pm 17$ 、 $9 \pm 1$ 、 $26 \pm 3$  および  $161 \pm 15$  nmol/g であった。P0、P1 および P10 群の血清および肝臓の PK 濃度は、群間に差は見られなかったが、腎臓、副腎、肺、精巣および脳のパック濃度は、P0 群に比べて P10 群で低下した (Fig. 8)。

血清および組織の MK-4 濃度は、P0、P1 および P10 群の間で差は見られず、M0、M1 および M10 群の間にも差は見られなかった (Fig. 9)。

**Table 1** Composition of experimental diets<sup>1</sup>

	Expt. 1			Expt. 2				Expt. 3				
	F	A	G	0	10	50	500	0	10	50	500	
	g/kg diet											
Casein	200	200	200.0	200	200	200	200	200	200	200	200	
L-Cystine	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
$\alpha$ -Starch	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	530	
Sucrose	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Cellulose powder	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
Mineral mixture <sup>2</sup>	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	
Vitamin mixture <sup>3</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Choline bitartrate	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Stripped corn oil <sup>4</sup>	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	
	mg/kg diet											
Phylloquinone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	—	—	—	—	
Menaquinone-4	—	—	—	—	—	—	—	0.75	0.75	0.75	0.75	
<i>RRR</i> $\alpha$ -Tocopherol	—	100	—	0	10	50	500	0	10	50	500	
<i>RRR</i> $\gamma$ -Tocopherol	—	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	

<sup>1</sup> F, vitamin E-free diet; A,  $\alpha$ -tocopherol containing diet; G,  $\gamma$ -tocopherol containing diet; 0;  $\alpha$ -tocopherol-free diet; 10,  $\alpha$ -tocopherol containing 10 mg/kg diet;  $\alpha$ -tocopherol containing 50 mg/kg diet;  $\alpha$ -tocopherol containing 500 mg/kg diet;

<sup>2</sup> AIN93-MX

<sup>3</sup> AIN93-VX

<sup>4</sup> Stripped corn oil contained neither vitamin E nor K,



**Table 2** Composition of test emulsion for expt. 4<sup>1</sup>

	Expt. 4					
	P0	P1	P10	M0	M1	M10
	mg/ml/rat					
Sodium taurocholate	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Triolein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Albumin	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Phylloquinone	0.2	0.2	0.2	—	—	—
Menaquinone-4	—	—	—	0.2	0.2	0.2
<i>RRR</i> $\alpha$ -Tocopherol	0	1.0	10.0	0	1.0	10.0

<sup>1</sup> P0, PK without  $\alpha$ -tocopherol; P1, PK with 1 mg  $\alpha$ -tocopherol; P10, PK with 10 mg  $\alpha$ -tocopherol; M0, MK-4 without  $\alpha$ -tocopherol; M1, MK-4 with 1mg  $\alpha$ -tocopherol; MK-4 with 10 mg  $\alpha$ -tocopherol mg/kg diet;  $\alpha$ -tocopherol containing 500 mg/kg diet.

**Table 3** Body and liver weights, food intake, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol, PK and MK-4 concentrations in rats fed a vitamin E-free diet or a diet containing either  $\alpha$ - or  $\gamma$ -tocopherol for 4 weeks (F, A, and G, respectively; Expt. 1)

	F	A	G
Initial body weight (g)	77±1	77±1	77±2
Final body weight (g)	189±2	188±7	179±6
Food intake (g/4 weeks)	340±7	334±10	329±11
Relative liver weight (g/kg body weight)	28.2±0.5	29.2±0.8	30.4±0.7
$\alpha$ -Tocopherol (nmol/g)			
Liver	6.7±0.5 <sup>c</sup>	73.9±10.7 <sup>a</sup>	11.8±0.7 <sup>b</sup>
Kidney	6.3±0.2 <sup>c</sup>	39.4±1.3 <sup>a</sup>	10.4±0.3 <sup>b</sup>
Heart	8.6±1.6 <sup>b</sup>	51.3±11.7 <sup>a</sup>	13.6±2.5 <sup>b</sup>
Brain	23.6±0.6 <sup>c</sup>	40.5±0.5 <sup>a</sup>	26.6±0.9 <sup>b</sup>
$\gamma$ -Tocopherol (nmol/g)			
Liver	nd	nd	33.3±3.6
Kidney	1.17±0.21 <sup>b</sup>	0.87±0.06 <sup>b</sup>	9.97±0.61 <sup>a</sup>
Heart	0.6±0.2 <sup>b</sup>	0.6±0.3 <sup>b</sup>	12.0±2.3 <sup>a</sup>
Brain	0.15±0.04 <sup>b</sup>	0.13±0.06 <sup>b</sup>	2.23±0.21 <sup>a</sup>
PK (pmol/g)			
Liver	43.3±3.1	41.5±2.7	34.1±3.0
Kidney	10.5±0.5 <sup>a</sup>	7.6±0.1 <sup>b</sup>	9.2±0.6 <sup>ab</sup>
Lung	17.6±1.0	14.5±1.4	14.7±1.0
Heart	45.5±4.3 <sup>a</sup>	28.3±3.5 <sup>b</sup>	34.0±3.9 <sup>ab</sup>
Muscle	7.61±0.75 <sup>a</sup>	4.58±0.79 <sup>b</sup>	6.28±0.61 <sup>ab</sup>
Testis	3.88±0.63	3.25±0.54	3.40±0.57
Brain	2.68±0.40	1.54±0.15 <sup>#</sup>	2.46±0.39
MK-4 (pmol/g)			
Liver	6.54±1.62	4.40±0.98	3.83±0.53
Kidney	32.0±1.0 <sup>a</sup>	25.1±0.5 <sup>b</sup>	35.6±2.1 <sup>a</sup>
Lung	22.5±2.7	19.3±2.2	22.8±2.3
Heart	20.5±2.2	15.0±1.6 <sup>b</sup>	21.0±1.2 <sup>a</sup>
Muscle	10.2±0.7 <sup>ab</sup>	7.8±0.9 <sup>b</sup>	11.0±0.6 <sup>a</sup>
Testis	76.1±13.0	56.0±9.8	80.4±11.1
Brain	44.5±6.1	34.2±2.9	48.3

Values are means ±SEM; n = 7; labeled means in a row without a common letter differ significantly,  $P < 0.05$ ; <sup>#</sup>PK concentrations in brain tended lower ( $P = 0.063$ ) in A than in F group; and nd, < 0.1 nmol/g.

**Table 4** Body and liver weights, food intake, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol concentrations in rats fed a diet containing PK with 0, 10, 50, or 500 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg for 6 weeks (Expt. 2)

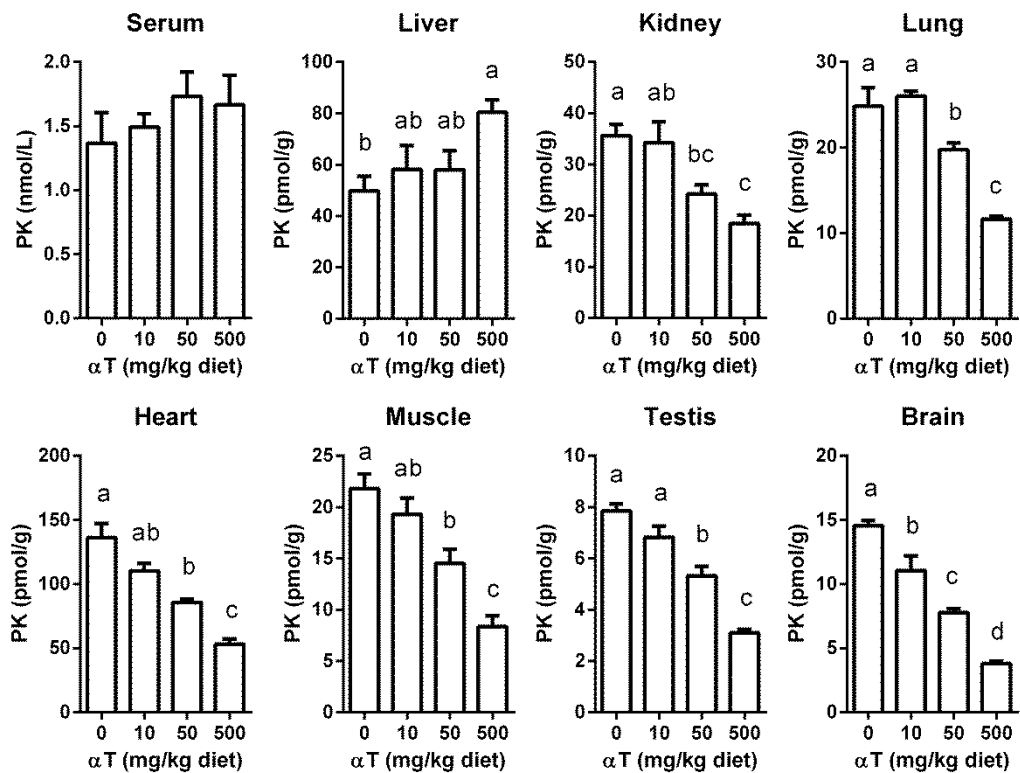
	$\alpha$ -Tocopherol in diet (mg/kg diet)			
	0	10	50	500
Initial body weight (g)	111 $\pm$ 2	112 $\pm$ 2	112 $\pm$ 2	111 $\pm$ 2
Final body weight (g)	284 $\pm$ 4	290 $\pm$ 4	288 $\pm$ 3	291 $\pm$ 5
Food intake (g/6 weeks)	718 $\pm$ 15	708 $\pm$ 14	713 $\pm$ 12	698 $\pm$ 15
Relative liver weight (g/kg body weight)	25.6 $\pm$ 0.4	25.6 $\pm$ 0.2	26.7 $\pm$ 0.3	26.3 $\pm$ 0.5
$\alpha$ -Tocopherol				
Serum ( $\mu$ mol/L)	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	7.2 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	26.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	29.5 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
Liver (nmol/g)	3 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	18 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	97 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	185 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
Kidney (nmol/g)	3.0 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	11.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	38.6 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	48.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>

Values are means  $\pm$ SEM; n = 6; and labeled means in a row without a common letter differ significantly,  $P < 0.05$ .

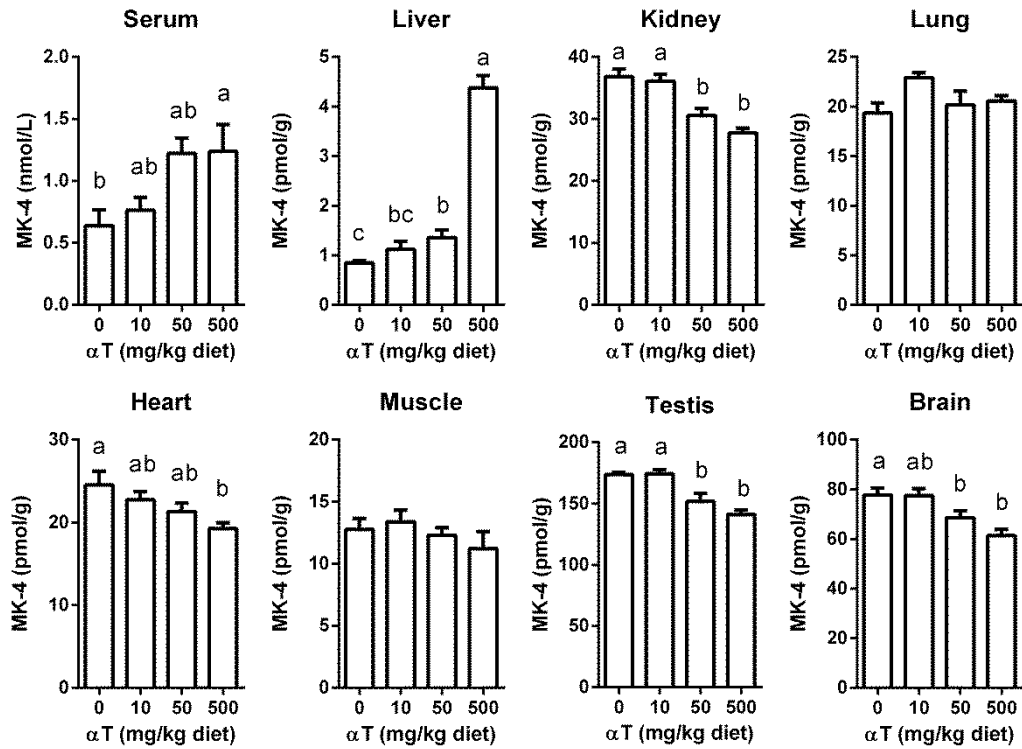
**Table 5** Body and liver weights, food intake, and  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol concentrations in rats fed a diet containing MK-4 with 0, 10, 50, or 500 mg  $\alpha$ -tocopherol/kg for 6 weeks (Expt. 3)

	$\alpha$ -Tocopherol in diet (mg/kg diet)			
	0	10	50	500
Initial body weight (g)	121 $\pm$ 3	121 $\pm$ 3	121 $\pm$ 3	121 $\pm$ 2
Final body weight (g)	270 $\pm$ 7	274 $\pm$ 5	271 $\pm$ 7	256 $\pm$ 3
Food intake (g/6 weeks)	599 $\pm$ 17	596 $\pm$ 15	582 $\pm$ 21	572 $\pm$ 7
Relative liver weight (g/kg body weight)	25.9 $\pm$ 0.4	26.0 $\pm$ 0.2	25.4 $\pm$ 0.4	25.2 $\pm$ 0.5
$\alpha$ -Tocopherol				
Serum ( $\mu$ mol/L)	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	5.7 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	19.2 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	17.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
Liver (nmol/g)	4 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	69 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	131 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
Kidney (nmol/g)	3.5 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	10.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	33.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	42.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>

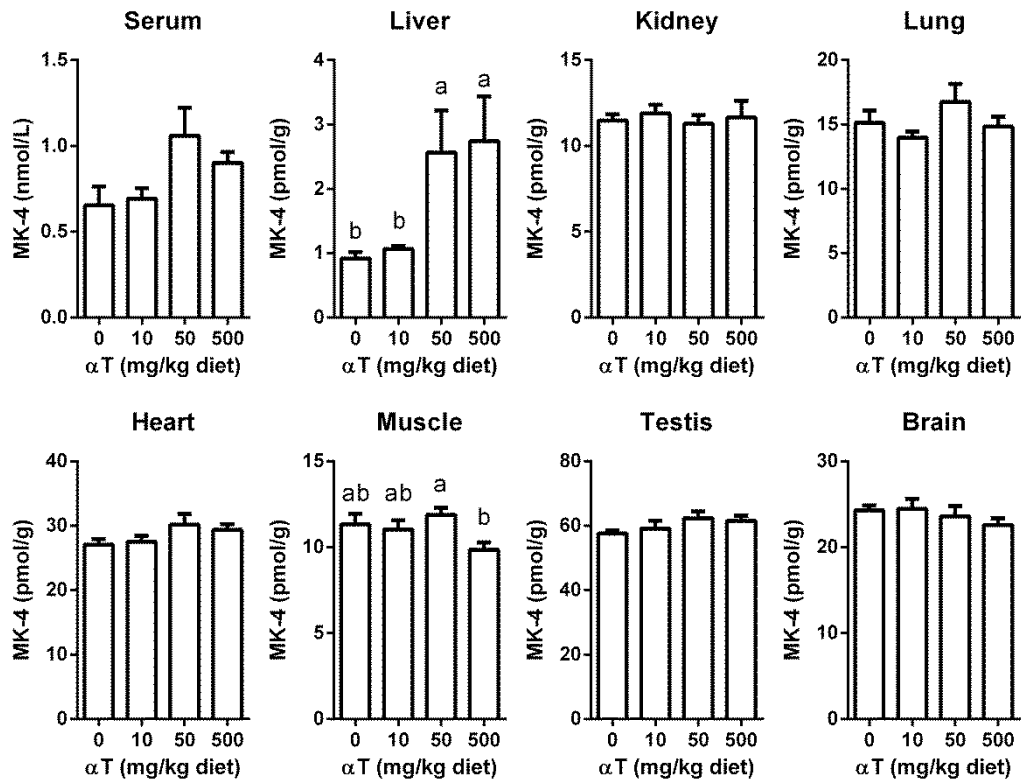
Values are means  $\pm$ SEM; n = 7; and labeled means in a row without a common letter differ significantly,  $P < 0.05$ .



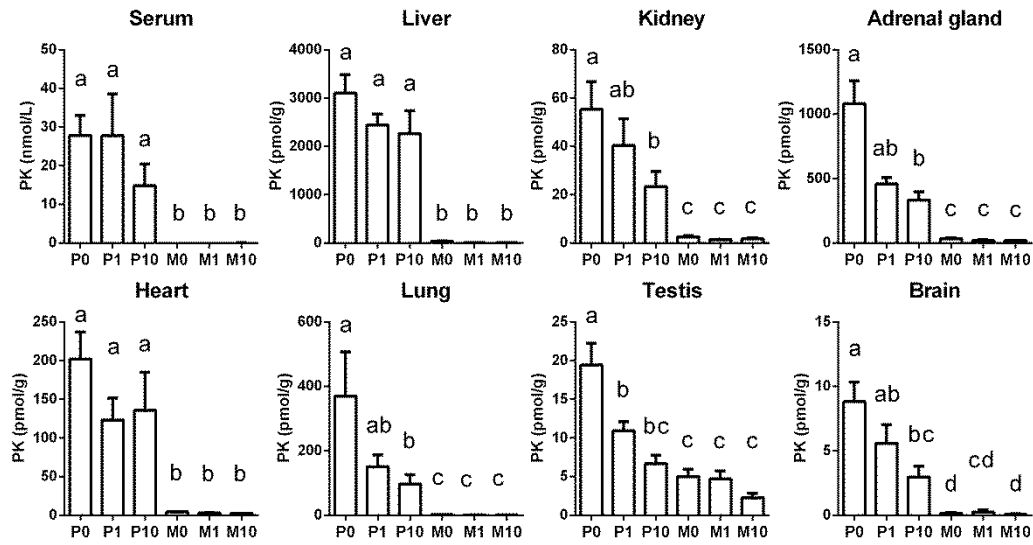
**Figure 5** PK concentrations in serum, liver, kidney, lung, heart, muscle, muscle and brain of rats fed diet containing PK at 0, 10, 50, or 500 mg  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ T)/kg for 6 weeks (Expt. 2). Values are means + SEM; n = 6; and labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



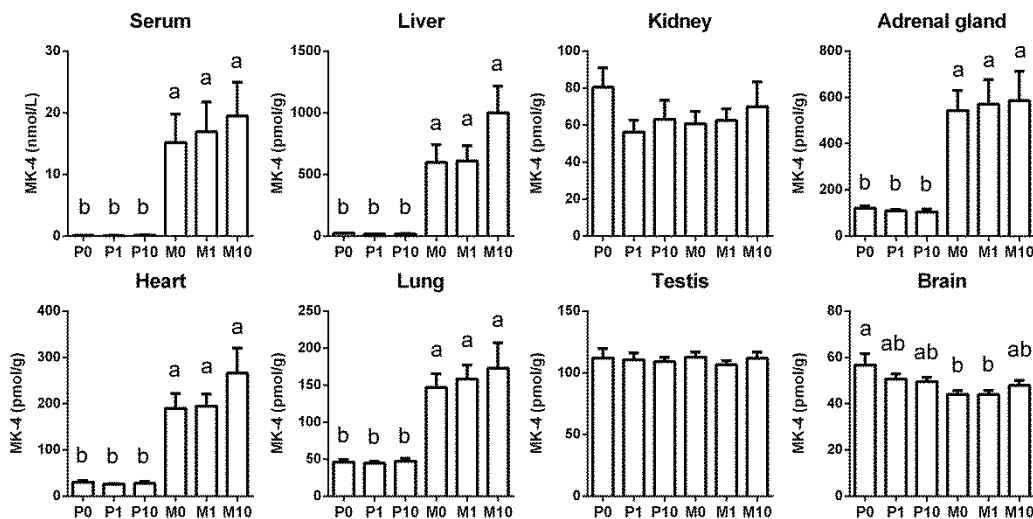
**Figure 6** MK-4 concentrations in serum, liver, kidney, lung, heart, muscle, muscle and brain of rats fed diet containing PK at 0, 10, 50, or 500 mg  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ T)/kg for 6 weeks (Expt. 2). Values are means + SEM; n = 6; and labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



**Figure 7** MK-4 concentrations in serum, liver, kidney, lung, heart, muscle, muscle and brain of rats fed diet containing MK-4 at 0, 10, 50, or 500 mg  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ T)/kg for 6 weeks (Expt. 3). Values are means + SEM; n = 6; and labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



**Figure 8** PK concentrations in serum liver, kidney, adrenal gland, heart, lung, testis and brain of rats at 6h after vitamin K oral administration with or without  $\alpha$ -tocopherol (Expt.4). Rats administered 0.2 mg PK without  $\alpha$ -tocopherol (P0), with 1 or 10 mg  $\alpha$ -tocopherol (P1 and P10, respectively), or 0.2 mg MK-4 without  $\alpha$ -tocopherol (M0), with 1 or 10 mg  $\alpha$ -tocopherol (M1 and M10, respectively). Values are means + SEM; n = 6 (P0, P1, and P10) or 7 (M0, M1, and M10); and labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .



**Figure 9** MK-4 co concentrations in serum liver, kidney, adrenal gland, heart, lung, testis and brain of rats at 6h after vitamin K oral administration with or without  $\alpha$ -tocopherol (Expt. 4). Rats administered 0.2 mg PK without  $\alpha$ -tocopherol (P0), with 1 or 10 mg  $\alpha$ -tocopherol (P1 and P10, respectively), or 0.2 mg MK-4 without  $\alpha$ -tocopherol (M0), with 1 or 10 mg  $\alpha$ -tocopherol (M1 and M10, respectively). Values are means + SEM; n = 6 (P0, P1, and P10) or 7 (M0, M1, and M10); and labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

## 2-4 考察

現在までに、ビタミン E の過剰摂取が、血液凝固能および骨密度を低下させることが報告されている (March ら, 1973、Frank ら, 1997、Wheldon, 1983、Abdo ら, 1986、Fujita ら, 2012)。これらの症状は、ビタミン K の欠乏時に見られる症状と似ていることから、ビタミン E がビタミン K の機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、ビタミン E 摂取がビタミン K 濃度を低下させるのではないかと考え、ラットを用いて、体内ビタミン K 濃度に及ぼすビタミン E 摂取の影響を調べた。

実験 1、2 および 3 で用いた飼料の PK と MK-4 添加量は、AIN93 飼料に従い 0.75 mg/kg 飼料とした (Reeves ら, 1993)。また、AIN93 飼料におけるビタミン E 添加量は 75 IU/kg 飼料であり、これは *RRR*- $\alpha$ -トコフェロール 50 mg/kg 飼料に相当する。したがって、実験 1 の *RRR*- $\alpha$ -トコフェロールおよび *RRR*- $\gamma$ -トコフェロールの飼料添加量 (100 mg/kg 飼料) は、AIN93 飼料の 2 倍量である。同様に、実験 2 および 3 で用いた  $\alpha$ -トコフェロール制限飼料、通常飼料、過剰飼料 ( $\alpha$ -トコフェロールをそれぞれ 10、50、100 mg/kg 飼料) の  $\alpha$ -トコフェロール添加量は、AIN93 飼料のそれぞれ 5 分の 1 量、同量、10 倍量である。ラットは、ビタミン混合由来 (PK 0.75 mg/kg 飼料) およびタンパク質源であるカゼイン由来 (PK 0.16 mg/kg 飼料) の PK を合計 0.91 mg/kg 飼料 含む飼料を、1 日当たり 20 g 程度摂取するため、1 日の PK 摂取量は約 0.02 mg となる。したがって、実験 4 の PK と MK-4 の経口投与量 (0.2 mg/ラット) は、1 日の PK 摂取量の約 10 倍である。また、実験 2 と 3 で、飼料への  $\alpha$ -トコフェロール添加量は、通常飼料で 50 mg/kg、過剰飼料で 500 mg/kg であり、ラットが一日当たり 20 g の餌を摂取した場合、通常飼料で 1 mg/日、過剰飼料で 10 mg/1 mg/日の  $\alpha$ -トコフェロールを摂取することになる。実験 4 で用いた経口試験液の  $\alpha$ -トコフェロール 1 および 10 mg は、実験 2、3 で通常飼料群と過剰飼料群が 1 日で摂取した  $\alpha$ -トコフェロール量と同じである。ビタミン E は、抗酸化能が一般にも広く知られていることから、サプリメントとして利用されている。実際に、アメリカ人の 10% が日常的にビタミン E を 276 mg/日摂取しており (Ford ら, 2005)、この量は、米国科学アカデミー医学研究所定める推奨量 (RDA) 15 mg/日を大きく超えている。本研究で用いたビタミン E 過剰群は、標準量の 10 倍量であるため、ヒトでも摂取することがあり得る量である。

実験 1 の結果から、ビタミン E 摂取によって、ラット体内ビタミン K 濃度は低下し、さらに、 $\alpha$ -トコフェロールは、 $\gamma$ -トコフェロールよりも PK 濃度の低下効果が大きいことが示された (Table 3)。 $\alpha$ -トコフェロールと  $\gamma$ -トコフェロールの飼料添加量は同じであったにもかかわらず、 $\alpha$ -トコフェロール摂取時の体内  $\alpha$ -トコフェロール濃度の方が、 $\gamma$ -トコフェロール摂取時の体内  $\gamma$ -トコフェロール濃度よりも高かった (Table 3)。この  $\alpha$ -トコフェロールと  $\gamma$ -トコフェロールの体内濃度の差の原因として、ビタミン E を血中に放出するのに必要な  $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質 ( $\alpha$ -TTP) との親和性の違い



と (Hosomi ら, 1997)、異化の律速段階である CYP4F による水酸化反応の受けやすさの違いが考えられた (Sontag ら, 2007)。

実験 2、3 の結果から、 $\alpha$ -トコフェロール摂取が PK 摂取時の肝臓の PK 濃度、MK-4 摂取時の肝臓の MK-4 濃度を上昇させることを見出した (Fig. 5~7)。つまり、 $\alpha$ -トコフェロールの摂取によって、ビタミン K として PK と MK-4 のいずれを摂取させたラットでも、肝臓のビタミン K 濃度が上昇することが明らかになった。目的にも述べたように、ビタミン E とビタミン K は、肝臓で CYP4F 依存的に代謝される。 $\alpha$ -トコフェロールは、PK の水酸化反応における  $V_{max}$  をわずかに低下させるが、 $K_m$  値には影響を与えないこと (Farley ら, 2014)、ラットのビタミン K 代謝物の尿中排泄量は、 $\alpha$ -トコフェロールの皮下注射の有無によって変化しないことが報告されている (Farley ら, 2012)。これらの結果を考慮すると、 $\alpha$ -トコフェロールとビタミン K を同時摂取した際に、肝臓において、ビタミン E はビタミン K の異化に影響を及ぼさないとと思われる。ビタミン K 依存性血液凝固因子は、肝臓で合成されて血流に放出されて機能している。私たちは、 $\alpha$ -トコフェロール過剰摂取によって肝臓のビタミン K 濃度の低下が起こり、それがビタミン K 依存性血液凝固因子の生成不全を引き起こすという仮説を立てたが、本研究の結果はその仮説とは逆であった。そのため、 $\alpha$ -トコフェロール過剰摂取による体内ビタミン K レベルの変動は、ビタミン K 欠乏性出血の直接的な原因ではないと推測された。

実験 2 において、一定量の PK と、異なる量の  $\alpha$ -トコフェロールを添加した飼料をラットに 6 週間摂取させた結果、 $\alpha$ -トコフェロール摂取量の増加によって、肝臓や血清の PK 濃度は低下しなかったにも関わらず、肝外組織の PK 濃度は低下した (Fig. 5)。PK 摂取時の MK-4 濃度は緩やかに低下した (Fig. 6)。これは、PK と  $\alpha$ -トコフェロールの飼料添加量や飼育期間が異なる条件で行った試験 (Tovar ら, 2006) と方向性は同じであった。また、一定量の PK と異なる量のビタミン E を含む試験飼料を強制的に経口投与し、6 時間後の PK 濃度を測定した。その結果、肝臓の PK 濃度は低下しなかったが、肝外組織の PK 濃度が低下した (Fig.8)。この時の肝外組織の MK-4 濃度は変わらなかったため (Fig. 9)、 $\alpha$ -トコフェロールは、PK の肝外組織における PK の MK-4 への変換に影響を与えないと考えられた。以上の結果から、 $\alpha$ -トコフェロールが PK 摂取後の肝臓から肝外組織への移行を阻害することによって、肝外組織のビタミン K 濃度を低下させるのではないかと推測された。

## 第3章 ゴマ摂取によるビタミンK濃度の上昇

### 3-1 目的

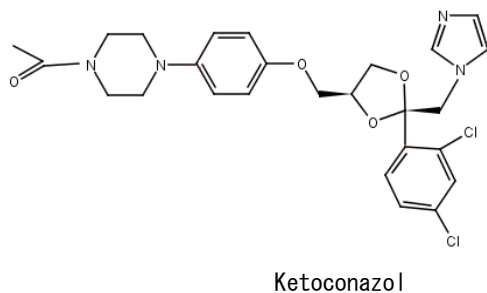
第2章でも詳しく述べたとおり、ビタミンEの代謝とビタミンKの代謝は多くの共通点がある。小腸から吸収したビタミンEやビタミンKのほとんどは、TGを豊富に含むキロミクロンに会合してリンパに放出され、肝臓に運搬される(TraberとSies, 1996、Abeら, 2007、TraberとArai, 1999)。一方、過剰なビタミンEやビタミンKは、肝臓で $\omega$ 水酸化、 $\beta$ 酸化によって代謝産物に分解されて体外に排泄される(Fig. 3)(ShearerとBarkhan, 1973、Schultzら, 1995、Swansonら, 1999、Lodgeら, 2001)。ビタミンE水酸化酵素として知られるCYP4F2は、PKおよびMK-4の水酸化活性も示し(McDonaldら, 2009、Edsonら, 2013)、ビタミンEと同様にビタミンKも、肝臓でCYP依存性代謝経路によって異化される(Fig. 4)。

ゴマには、セサミン、セサミノール、セサモリンなどの特徴的なリグナン類(ゴマリグナン)が含まれている。ゴマにはゴマリグナンが、約1%含まれている。ゴマリグナンの中でもセサミン(Fig. 11)はゴマに最も多く含まれている。リグナンは、*p*-ヒドロキシフェニルプロパンの酸化的カップリングによって生成される低分子化合物であり(Fig. 12)、多くの植物に微量成分として含まれている。ゴマリグナンは、健康に対してさまざまな有益性を持つことが知られている。中でもセサミンには、脂質代謝改善作用(Sirato-Yasumotoら, 2001)をはじめ、多価不飽和脂肪酸の $\Delta$ 5-不飽和化酵素の阻害作用(Shimizuら, 1991)、エイコサノイドの産生抑制作用(Guら, 1995)、ラットにおけるビタミンC合成調節作用などがあることが報告されている(Ikedaら, 2007)。

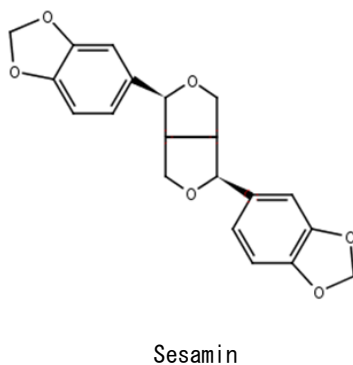
また、セサミンは、ヒト肝臓のミクロソームにおけるトコフェロールの水酸化を阻害し(SontagとParker, 2002)、セサミンとケトコナゾール(KCZ)は、ヒト肺胞上皮細胞であるA549細胞において $\delta$ -トコトリエノールの異化を濃度依存的に阻害した(Youら, 2005)。さらにMcDonaldらは、ヒト肝臓ミクロソームを用いて、セサミンとKCZがCYP4FによるPKの $\omega$ 水酸化を阻害することを報告している(McDonaldら, 2008)。

Yamashitaらは、ゴマリグナンがラットの体内のビタミンE濃度を上昇させることを報告した(Yamashitaら, 1992、Yamashitaら, 1995)。ゴマやゴマリグナンの摂取によって、ラットの血漿および組織の $\alpha$ -および $\gamma$ -トコフェロール濃度が著しく上昇し、さらに過酸化脂質の生成の指標であるチオバルビツール酸反応生成物(TBARS)が減少した。この時、トコフェロール代謝産物であるカルボキシエチルヒドロキシクロマン(CEHC)の尿中排泄量が減少したことから、ゴマリグナンが、ビタミンE異化酵素であるCYP4Fを阻害することによって、体内のビタミンE濃度を上昇させることが示唆された(Ikedaら, 2002)。ビタミンKはビタミンEと同一の酵素であるCYP4F2によって異化される

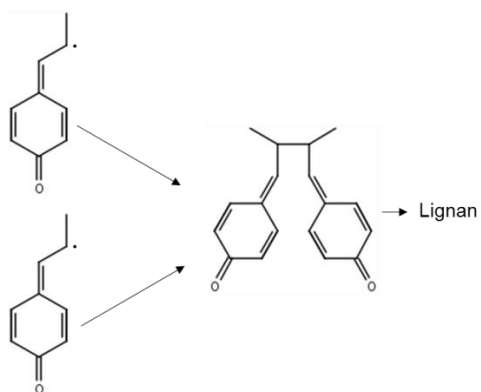
ため、セサミンは、ビタミン E だけでなくビタミン K の異化も阻害し、体内のビタミン K 濃度に影響を及ぼす可能性がある。本章では、ゴマリグナンによる CYP4F の阻害が、体内 PK 濃度を上昇させるのではないかとの仮説を立て、ビタミン K 濃度に及ぼすゴマ摂取の影響を検討した。実験 1 ではラットにセサミンを 7 日間摂取させ、セサミンが体内のビタミン K 濃度に影響を及ぼすかどうかを検討した。実験 2 ではヒトが実際に食生活で摂取しているゴマを 3 日間摂取させた。さらに実験 3 では、普段の食生活で日常的にゴマを摂取することを想定し、ゴマを 40 日間摂取させた際の、ラットの体内ビタミン K 濃度を調べた。



**Figure 10** Structure of ketoconazol



**Figure 11** Structure of sesamin



**Figure 12** Pathway of lignan synthesis

## 3-2 実験材料と方法

### 実験材料と実験動物

PK、MK-4、CYP 阻害剤であるケトコナゾール、および CEHC 定量の内部標準として用いた Trolox (6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸) は、シグマアルドリッチジャパンから購入した。ビタミン K 定量の内部標準として用いた MK-3 と、γ-トコフェロール代謝産物である 2,7,8-トリメチル-2(2'-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン (γ-CEHC) は、エーザイ株式会社から供与された。RRR-γ-トコフェロールは、エーザイフード・ケミカル株式会社から供与された。また、飼料に添加したセサミンと煎りゴマは、竹本油脂株式会社と株式会社真誠からそれぞれ供与された。セサミンはゴマから抽出したものであり、セサミンとエピセサミンをほぼ同量含むものである。白ゴマは、炒って細かく粉砕したものを飼料に添加した。ゴマに含まれるタンパク質量、脂質量、ビタミン E 量は、ケルダール法、ソックスレー法、および HPLC 法によってそれぞれ定量した。ビタミン K は、ゴマにはほとんど含まれていなかった。

Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシーから購入した。12 時間の明暗サイクル (明期 8~20 時、暗期 20~8 時)、温度 24°C、湿度 55% の飼育室内で個別飼育した。飼育期間中は、水および飼料を自由摂取させた。本実験は、名古屋学芸大学動物実験委員会の事前の審査によって承認され、「名古屋学芸大学動物実験指針」を遵守して行った。

### 実験 1 : ビタミン K 濃度に及ぼすセサミン摂取の影響

8 週齢のラットを 3 群に分け、基本飼料 (C 群, n = 4)、セサミン添加飼料 (2 g/kg 飼料) (S 群, n = 6)、またはケトコナゾール添加飼料 (1 g/kg 飼料) (KCZ 群, n = 6) を、それぞれ 7 日間摂取させた。なお、試験飼料組成は Table 6 に示した。尿は、最終日の 24 時間採取し、窒素置換後 -80°C で保存した後、CEHC 定量に用いた。ラットは断頭により屠殺し、血清および肝臓を採取した。試料は -30°C で保存し、ビタミン K および E の定量に供した。

### 実験 2 : ビタミン K 濃度に及ぼす短期間のゴマ摂取の影響

3 週齢のラットにビタミン K・E 無添加飼料を 4 週間摂取させることによって、体内のビタミン K と E を欠乏させた。その後、ラットを 5 群に分けた。ビタミン K・E 無添加飼料 (F 群, n = 7)、基本飼料 (C 群, n = 7)、1、5、または 10% ゴマ添加飼料 (S1、S5、および S10 群, n = 7) を、それぞれ 3 日間摂取させた。飼料組成は Table 6 に示した。ゴマにはタンパク質、脂質、および γ-トコフェロールが含まれているため、ゴマ添加飼料のカゼイン、ストリップドコーン油および γ-トコフェロールの添加量を減らし、C 群、S1 群、S5 群および S10 群の飼料中のそれぞれの含有量を等しくした。C 群、S1 群、S5 群および S10 群の飼料中の γ-トコフェロール含量は、60 mg/kg であった (Table 6)。尿は 2 日目

に 10 時間採取し、窒素置換後 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した後、CEHC 定量に用いた。ラットには飼料と水を自由摂取させ、断頭により屠殺した。血清、肝臓および腎臓を採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存し、ビタミン K および E の定量に用いた。

### 実験 3 : ビタミン K 濃度に及ぼす長期間のゴマ摂取の影響

4 週齢のラットに、ビタミン E 無添加飼料 (EF 群,  $n = 5$ )、基本飼料 (C 群,  $n = 5$ )、20% ゴマ添加飼料 (S20 群,  $n = 6$ ) または *RRR*- $\gamma$ -トコフェロール添加飼料 (500mg/kg 飼料) (G 群,  $n = 6$ ) を、それぞれ 40 日間摂取させた。飼料組成は Table 6 に示した。カゼインおよびストリップドコーン油の添加量を調節することによって、すべての飼料のタンパク質と脂質の含量を等しくした。また、C 群および S20 群の飼料の推定  $\gamma$ -トコフェロール含量は、50 mg/kg であった (Table 6)。調製した飼料は遮光状態で凍結保存し、1 週間以内に使用した。尿は、屠殺前の 10 時間採取し、窒素置換後に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、CEHC 定量に用いた。ラットには飼料と水を自由摂取させ、断頭により屠殺した。血清、肝臓、腎臓、心臓、肺、精巣および脳を採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した後、ビタミン K および E の定量に供した

#### ビタミン E 濃度の測定

第 2 章と同様に行った。

#### CEHC 濃度の測定

尿中の CEHC 濃度の測定は、Kiyose らの方法 (Kiyose ら, 2001) に従った。尿中の CEHC をヘキサン抽出した後、HPLC 法により測定した。内部標準には Trolox を用いた。分析機器は、電気化学検出器 (Coulochem III) 付の HPLC 装置 (島津 LC-10Ai) であり、分析カラムに ODS-3 を使用した。分析セルとガードセルは、+0.4 および +0.45V とした。溶離液には 50 nmol/L 過塩素酸ナトリウム/33% アセトニトリル pH3.6 を用い、流速 0.3 mL/分 で分析した。

#### ビタミン K 濃度の測定

第 2 章と同様に行った。

#### 統計処理

結果の値は、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。正規分布性の検定には Kolmogorov-Smirnov 検定を用い、結果の検定は一元配置分散分析と Tukey's post hoc test で解析した。分散が統計的に等しくない場合は、一元配置分散分析の前に結果を対数変換した。正規分布性が確認されなかった場合については、Kruskal-Wallis 検定と Dunn 検定によって結果を解析した。 $P < 0.05$  を有意差ありとした。全てのデータは、GraphPad Prism 6 for Windows を用いて解析した。

### 3-3 結果

#### 実験 1 : ビタミン K 濃度に及ぼすセサミン摂取の影響

ゴマに含まれるセサミンなどのゴマリグナンは、ビタミン E 異化の律速酵素である CYP4F を阻害し、ラット体内ビタミン E 濃度を上昇させることと、ビタミン E 代謝産物の尿中排泄量を減らすことが明らかとなっている (Yamashita ら, 1992、Yamashita ら, 1995、Ikeda ら, 2002)。最近になり、CYP4F が、ビタミン E だけでなくビタミン K の異化も担うことが明らかになった (McDonald ら, 2009)。そこで、セサミンおよび CYP 阻害剤の KCZ をラットに摂取させ、ビタミン K 濃度が変動するかどうかを調べた。実験期間終了後の最終体重、肝臓重量および飼料摂取量には、群間に差は見られなかった (Table 7)。血清および肝臓の $\gamma$ -トコフェロール濃度は、C 群に比べて S 群で上昇していた。肝臓の PK および MK-4 濃度も、C 群に比べて S 群で上昇した (Fig. 13)。KCZ 群では、肝臓の $\gamma$ -CEHC 濃度と $\gamma$ -CEHC の尿中排泄量が C 群と比べて有意に低下し (Table 7)、肝臓の PK 濃度は上昇する傾向 ( $P=0.090$ ) であった (Fig. 11)。以上の結果から、セサミン摂取によって、ビタミン E だけでなくビタミン K の濃度も上昇することが明らかになり、 $\gamma$ -トコフェロールの異化が、セサミンによって阻害される可能性が示された。

#### 実験 2 : ビタミン K 濃度に及ぼす短期間のゴマ摂取の影響

実験 1 の結果から、セサミンの摂取によって肝臓のビタミン K 濃度が上昇することが明らかになった (Fig.13)。そこで、次に、ゴマリグナンを含むゴマをラットに摂取させ、体内のビタミン K 濃度が変動するかどうかを調べた。最終体重、肝臓重量および飼料摂取量には、群間に差は見られなかった (Table 8)。血清、肝臓および腎臓の $\gamma$ -トコフェロール濃度は、C 群と比較して S1、S5 および S10 群で上昇し、S1 群に比べて S5 および S10 群でさらに上昇した。肝臓および腎臓の PK 濃度は C 群と比較して S1、S5 および S10 群で上昇し、S1、S5 および S10 群の PK 濃度は同程度であった (Fig. 14)。肝臓および腎臓の MK-4 濃度は、C、S1、S5 および S10 群の間に差は見られなかった (Fig.15)。 $\gamma$ -CEHC の尿中排泄量は、C 群に比べて S10 群で低下したが、S1 および S5 群では有意差は見られなかった (Table 8)。以上の結果から、ゴマを少なくとも 1%以上添加した飼料の摂取によって、肝臓および腎臓のビタミン K 濃度が上昇することが明らかになった。

#### 実験 3 : ビタミン K 濃度に及ぼす長期間のゴマ摂取の影響

実験 3 では、実際の食生活でゴマを摂取することを想定し、40 日間のゴマ添加飼料の摂取が体内ビタミン K 濃度に及ぼす影響を調べた。当研究室ではこれまでに、20%ゴマ添加飼料をラットに摂取させることで、血清、肝臓および腎臓、脳などの肝外組織のビタミン E 濃度が上昇することを見出している (Ikeda ら, 2002)。そこで、本実験では 20%ゴマ添

加飼料を用いた検討を行った。また、ゴマ摂取は、体内 $\gamma$ -トコフェロール濃度を大きく上昇させる。体内ビタミン K 濃度の上昇は、ゴマ摂取による CYP4F の阻害によるものなのか、 $\gamma$ -トコフェロールによりビタミン K の異化が競合阻害されたためなのかを検討するために、 $\gamma$ -トコフェロールを通常の 10 倍量である 500 mg/kg 飼料添加した群 (G 群) を設けた。本実験条件下では、すべての群の成長に差は見られなかったが、肝臓重量は、EF 群および C 群と比較して、S20 群で有意に増加した (Table 9)。血清および肝臓の $\gamma$ -トコフェロール濃度は、C 群と比較して S20 群および G 群で上昇し、G 群と比較して S20 群でさらに上昇した。腎臓、心臓、肺、精巣および脳のパラオキシド濃度と、脳の MK-4 濃度は、C 群と比較し S20 群で上昇した (Fig.16, 17)。腎臓、心臓、肺、精巣および脳のパラオキシド濃度と、脳の MK-4 濃度は、C 群と比較して G 群で低下した (Fig.16, 17)。 $\gamma$ -CEHC の尿中排泄量は、C 群と比べて S20 群で低下したのに対し、G 群では上昇した (Table 9)。以上の結果から、40 日間のゴマ摂取によっても体内ビタミン K 濃度が上昇することが明らかになった。また、500 mg/kg 飼料の $\gamma$ -トコフェロール摂取は、 $\alpha$ -トコフェロールと同様に肝外組織のパラオキシド濃度を低下させることが明らかになった。



**Table 6** Composition of experimental diets<sup>1</sup>

	Expt. 1			Expt. 2					Expt. 3			
	C	S	KCZ	F	C	S1	S5	S10	EF	C	S20	G
	g/kg diet											
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0	198.0	190.2	180.3	200.0	200.0	160.0	200.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
$\alpha$ -Starch	529.9	527.9	528.9	475.0	474.9	472.7	463.9	452.9	495.0	494.9	435.0	494.5
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Cellulose powder	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture <sup>2</sup>	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture <sup>3</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Stripped corn oil <sup>4</sup>	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Sesamin	—	2.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ketoconazole	—	—	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sesame seed <sup>5</sup>	—	—	—	—	—	10.0	50.0	100.0	—	—	200.0	—
	mg/kg diet											
Phylloquinone	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
RRR $\gamma$ -Tocopherol	100.0	100.0	100.0	—	60.0	57.4	47.0	33.9	—	50.0	6.2	500.0
Estimated amounts <sup>6</sup>												
	g/kg diet											
Protein	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Fat	70	70	70	125	125	125	125	125	105	105	105	105
	mg/kg diet											
$\gamma$ -Tocopherol	100	100	100	—	60	60	60	60	—	50	500	500

<sup>1</sup> C, control diet; EF, vitamin E-free diet; G,  $\gamma$ -tocopherol-rich diet; KCZ, ketoconazole diet; S, sesamin diet; S1, 1% sesame seed diet; S5, 5% sesame seed diet; S10, 10 % sesame seed diet; S20, 20% sesame seed diet.

<sup>2</sup> AIN93-MX

<sup>3</sup> AIN93-VX

<sup>4</sup> Stripped corn oil contained neither vitamin E nor K,

<sup>5</sup> Sesame seed used in Expt. 6 contained 197 mg protein/g, 582 mg lipids/g, and 0.261 mg  $\gamma$ -tocopherol/g. Sesame seed used in Expt. 7 contained 200 mg protein/g, 500 mg lipids/g, and 0.219 mg  $\gamma$ -tocopherol/g.

<sup>6</sup> Estimated amounts of protein, fat, and  $\gamma$ -tocopherol were calculated from contents in sesame seed and amounts of casein, stripped corn oil, and RRR- $\gamma$ -tocopherol.

**Table 7** Body and liver weights, food intake, and vitamin E and its metabolite levels in rats fed a control diet, a diet with 0.2% sesamin, or 0.1% ketoconazole for 7 days (Expt. 1)<sup>1</sup>

	C	S	KCZ
Initial body weight (g)	222±2	222±2	223±2
Final body weight (g)	247±6	245±3	240±3
Food intake (g/7 days)	107±6	103±3	90±5
Relative liver weight (g/kg body weight)	41.4±1.3	44.8±1.0	41.1±1.3
Serum $\gamma$ -tocopherol ( $\mu$ mol/L)	23±3 <sup>b</sup>	105±8 <sup>a</sup>	87±11 <sup>ab</sup>
Liver $\gamma$ -tocopherol (nmol/g)	12.9±1.3 <sup>b</sup>	77.6±8.4 <sup>a</sup>	67.6±8.6 <sup>sb</sup>
Liver $\gamma$ -CEHC (nmol/g)	14.3±2.5 <sup>a</sup>	5.4±0.9 <sup>ab</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>
Urinary $\gamma$ -CEHC excretion ( $\mu$ mol/24h)	2.93±0.20 <sup>a</sup>	1.84±0.15 <sup>ab</sup>	0.81±0.11 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SEMs, n = 4 (C) or 6 (S and KCZ). Data were analyzed by nonparametric tests. Labeled means in a row without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet;  $\gamma$ -CEHC, 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxymethyl)-6-hydroxychroman; KCZ, ketoconazole diet; S, sesamin diet.

**Table 8** Body and liver weights, food intake, and vitamin E and its metabolite levels in rats fed a vitamin K- and E-free diet, a control diet, or a diet with 1, 5, or 10% sesame seed for 3 days (Expt. 2)<sup>1</sup>

	F	C	S1	S5	S10
Initial body weight (g)	203±6	203±5	203±5	203±5	203±4
Final body weight (g)	220±5	218±4	222±4	223±3	219±3
Food intake (g/3 days)	46.2±1.2	44.6±1.1	45.8±1.3	46.7±1.1	45.4±0.8
Relative liver weight (g/kg body weight)	41.4±0.8	41.5±0.7	41.4±1.0	41.0±0.8	40.9±0.6
Serum $\gamma$ -tocopherol ( $\mu$ mol/L)	nd	4.8±0.4 <sup>c</sup>	14.2±0.8 <sup>b</sup>	18.6±0.9 <sup>a</sup>	18.8±0.9 <sup>a</sup>
Liver $\gamma$ -tocopherol <sup>2</sup> (nmol/g)	nd	13.0±0.4 <sup>c</sup>	37.1±1.1 <sup>b</sup>	45.0±1.7 <sup>a</sup>	47.7±2.3 <sup>a</sup>
Kidney $\gamma$ -tocopherol <sup>2</sup> (nmol/g)	0.15±0.09 <sup>d</sup>	3.6±0.2 <sup>c</sup>	11.3±0.6 <sup>b</sup>	15.0±0.7 <sup>a</sup>	15.6±0.7 <sup>a</sup>
Urinary $\gamma$ -CEHC excretion <sup>3</sup> ( $\mu$ mol/24h)	0.014±0.001 <sup>c</sup>	0.757±0.104 <sup>a</sup>	0.277±0.034 <sup>ab</sup>	0.183±0.038 <sup>abc</sup>	0.081±0.016 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SEMs, n = 7. Labeled means in a row without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet;  $\gamma$ -CEHC, 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxymethyl)-6-hydroxychroman; F, vitamin K- and E-free diet; nd,  $< 0.1 \mu$ mol/L serum and  $< 0.1$  nmol/g liver; S1, 1% sesame seed diet; S5, 5% sesame seed diet; S10, 10% sesame seed diet.

<sup>2</sup> Data were log-transformed prior to ANOVA.

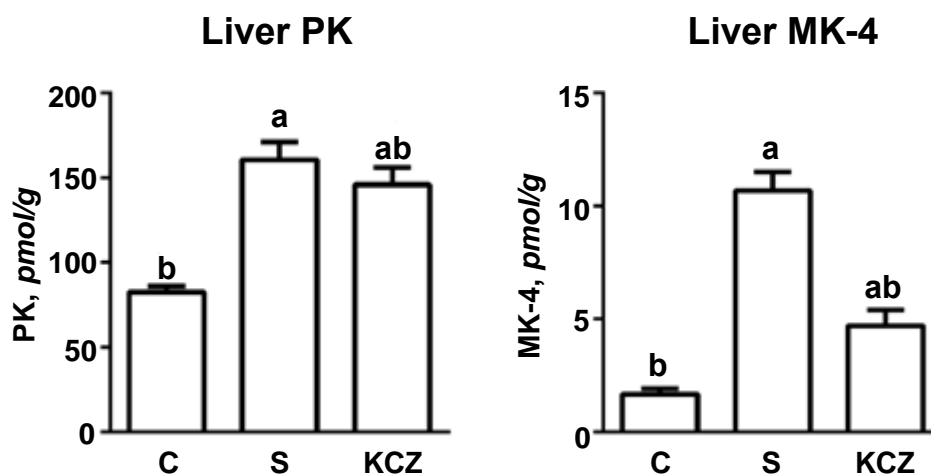
<sup>3</sup> Data were analyzed by nonparametric tests.

**Table 9** Body and liver weights, food intake, and vitamin E and its metabolite levels in rats fed a vitamin E-free diet, a control diet, a diet with 20% sesame seed, or a  $\gamma$ -tocopherol-rich diet for 40 days (Expt. 3)<sup>1</sup>

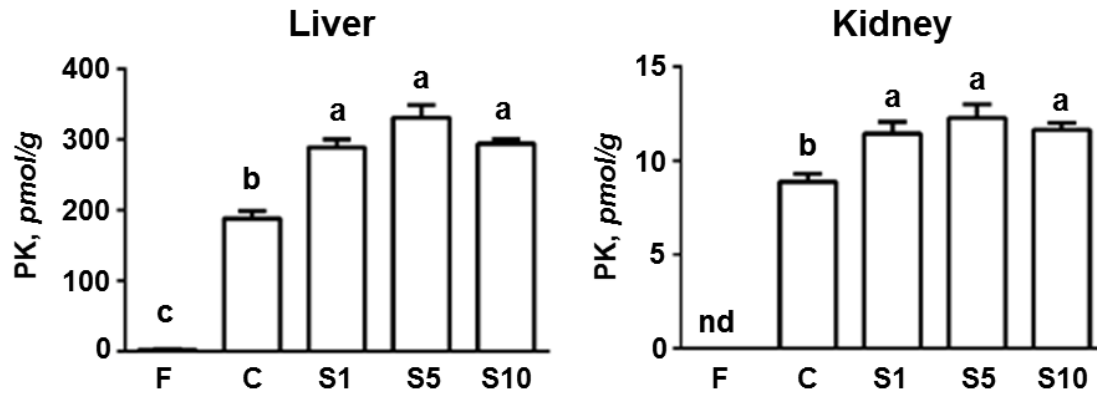
	EF	C	S20	G
Initial body weight (g)	86±3	86±2	86±3	86±3
Final body weight (g)	247±5	241±6	239±10	240±7
Relative liver weight (g/kg body weight)	27.7±0.5 <sup>b</sup>	27.1±0.3 <sup>b</sup>	29.7±1.0 <sup>a</sup>	28.0±0.5 <sup>ab</sup>
Serum $\gamma$ -tocopherol <sup>2</sup> ( $\mu$ mol/L)	nd	1.4±0.4 <sup>c</sup>	21.2±2.5 <sup>a</sup>	3.0±1.2 <sup>b</sup>
Liver $\gamma$ -tocopherol <sup>2</sup> (nmol/g)	nd	2.3±0.5 <sup>c</sup>	28.7±1.7 <sup>a</sup>	7.0±0.4 <sup>b</sup>
Urinary $\gamma$ -CEHC excretion ( $\mu$ mol/10h)	0.010±0.001 <sup>d</sup>	0.55±0.07 <sup>b</sup>	0.35±0.06 <sup>c</sup>	3.15±0.27 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SEMs, n = 5 (EF, C and S20) or 6 (G). Labeled means in a row without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet;  $\gamma$ -CEHC, 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxymethyl)-6-hydroxychroman; EF, vitamin E-free diet; G,  $\gamma$ -tocopherol rich diet.; nd,  $< 0.1 \mu$ mol/L serum and  $< 0.1$  nmol/g liver; S20, 20% sesame seed diet.

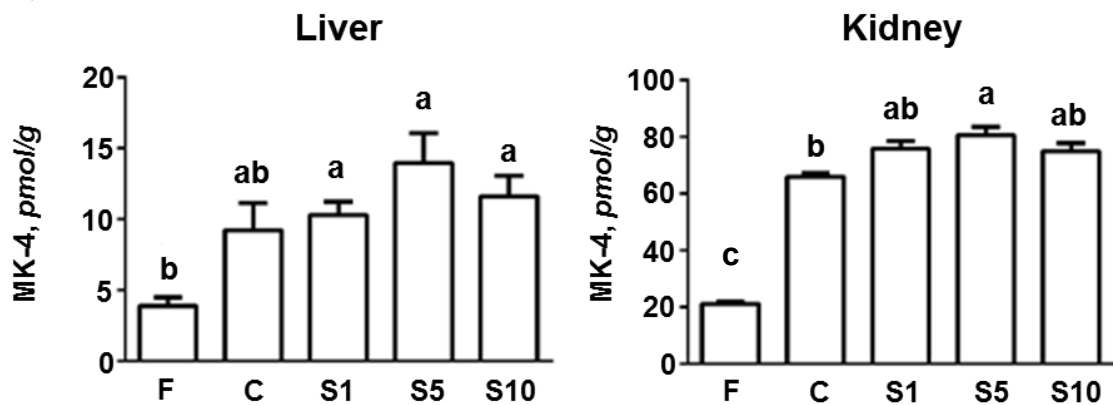
<sup>2</sup> Data were log-transformed prior to ANOVA.



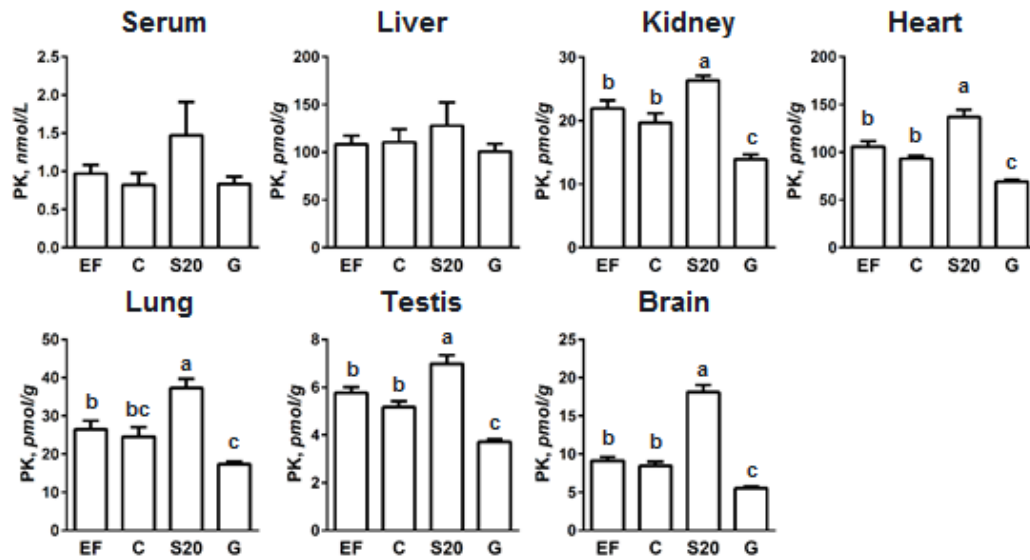
**Figure 13** PK and MK-4 concentrations in liver of rats fed either control diet, a diet containing 0.2% sesamin, or a diet containing 0.1% ketoconazole for 7 days (Expt. 1). Values are means + SEMs, n = 4 (C group) or n = 6 (S and KCZ group). Data were analyzed by nonparametric tests. Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet; KCZ, ketoconazole diet; MK-4, menaquinone-4; PK phylloquinone; S, sesamin diet.



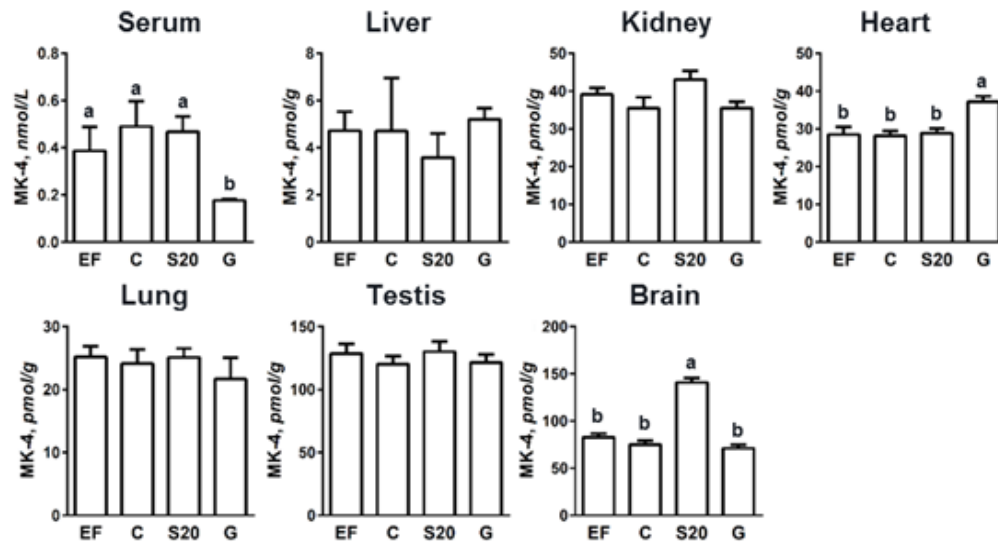
**Figure 14** PK concentrations in liver and kidney of rats fed either a vitamin K- and E-free diet, a control diet, or a diet containing 1, 5, or 10% sesame seed for 3 days (Expt. 2). Values are means + SEMs,  $n = 7$ . Liver PK concentration in liver was log-transformed prior to ANOVA. Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet; F, vitamin K- and E-free diet; PK, phylloquinone; S1, 1% sesame seed diet; S5, 5% sesame seed diet; S10, 10% sesame seed diet.



**Figure 15** MK-4 concentrations in liver and kidney of rats fed either a vitamin K- and E-free diet, a control diet, or a diet containing 1, 5, or 10% sesame seed for 3 days (Expt. 2). Values are means + SEMs,  $n = 7$ . MK-4 concentration in liver was analyzed by nonparametric tests and in kidney was log-transformed prior to ANOVA. Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet; F, vitamin K- and E-free diet; MK-4, menaquinone-4; nd,  $< 1$  pmol/g; S1, 1% sesame seed diet; S5, 5% sesame seed diet; S10, 10% sesame seed diet.



**Figure 16** PK concentrations in serum, liver, kidney, heart, lung, testis, and brain of rats fed either a vitamin E-free diet, a control diet, or a diet containing 20% sesame seed, or a  $\gamma$ -tocopherol-rich diet for 40 days. (Expt. 3). Values are means + SEMs,  $n = 5$  (EF, C, and S20 group) or  $n = 6$  (G group). PK concentrations in serum and liver were analyzed by nonparametric tests. Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet; EF, vitamin E-free diet; G,  $\gamma$ -tocopherol-rich diet; PK, phylloquinone; S20, 20% sesame seed diet.



**Figure 17** MK-4 concentrations in serum, liver, kidney, heart, lung, testis, and brain of rats fed either a vitamin E-free diet, a control diet, or a diet containing 20% sesame seed, or a  $\gamma$ -tocopherol-rich diet for 40 days (Expt. 3). Values are means + SEMs,  $n = 5$  (EF, C, and S20 group) or  $n = 6$  (G group). MK-4 concentrations in serum was log-transformed prior to ANOVA. MK-4 concentrations in liver was analyzed by nonparametric tests. Labeled means without a common letter differ,  $P < 0.05$ . C, control diet; EF, vitamin E-free diet; G,  $\gamma$ -tocopherol-rich diet; MK-4, menaquinone-4; S20, 20% sesame seed diet.

### 3-4 考察

3章では、ゴマリグナンによってPKの異化が阻害され、その結果、体内のPK濃度が上昇するという仮説の基に、セサミンとゴマの摂取が体内のビタミンK濃度に及ぼす影響について、ラットを用いて調べた。

実験1~3で用いた飼料のPK添加量は、0.75 mg/kg 飼料とした。本章では、ビタミンEとして、第2章で用いた *RRR*- $\alpha$ -トコフェロールではなく *RRR*- $\gamma$ -トコフェロールを用いた。その理由は、 $\gamma$ -トコフェロールは、 $\alpha$ -トコフェロールに比べて速やかにCYP依存性経路で異化され (Abe ら, 2007)、ゴマリグナンのCYP4F阻害作用を示す良いマーカであるためである。実験1では、ゴマリグナンとしてセサミンを用いた。ゴマには、1%程度のゴマリグナンが含まれている。実験3で用いた20%ゴマ添加飼料には、ゴマリグナンが0.2%含まれる計算となる。実験1で用いた0.2%セサミン添加飼料は、実験3で用いた20%ゴマ添加飼料と同量のゴマリグナン量となる。当研究室におけるこれまでの検討で、0.2%セサミン添加飼料と20%ゴマ添加飼料では、血清や組織の $\gamma$ -トコフェロール濃度の上昇効果と、尿中 $\gamma$ -CEHC排泄量の減少効果が同程度であることを見出している (Ikeda ら, 2002)。

実験1において、0.2%セサミン添加飼料を7日間摂取させたところ、対照群と比べて肝臓中の $\gamma$ -トコフェロール濃度の上昇、PKおよびMK-4濃度の上昇が認められた (Fig. 13)、 (Table 5)。実験2では、1%、5%、または10%ゴマ添加飼料を3日間摂取させたところ、対照群と比べて肝臓と腎臓のPK濃度が上昇した (Fig. 14)。実験3では、20%ゴマ添加飼料を40日間摂取させたところ、対照群に比べて腎臓、心臓、肺、精巣および脳のPK濃度が上昇し (Fig. 16)、脳中のMK-4濃度も上昇した (Fig. 17)。以上の結果から、ゴマおよびセサミンの摂取によって、トコフェロール濃度だけでなくPK濃度も上昇することを、初めて明らかにした。

ゴマ摂取量の違いが、ビタミンKおよびビタミンE濃度に与える影響を調べたところ、わずか1%のゴマ添加によって、ラットのPKおよび $\gamma$ -トコフェロール濃度が上昇した (Fig. 14)。しかし、ラットの1%ゴマ飼料の摂取が、ヒトではどの程度のゴマ摂取量に相当するかを推定するのは容易ではない。Wu らは、閉経期の女性に毎日ゴマ50gを5週間摂取させることによって、血中の $\gamma$ -トコフェロール濃度が上昇することを報告した (Wu ら, 2006)。Frank らもまた、健康な成人男性にゴマリグナン135mgを投与することによって、 $\gamma$ -トコフェロールの $\gamma$ -CEHCへの代謝が阻害されることを示した (Frank ら, 2008)。以上の結果から、ゴマリグナンの摂取は、ラットだけでなくヒトのビタミンE代謝も調節すると考えられる。したがって、ゴマの摂取によってヒトのPK濃度も影響を受けることが予想されるが、現在のところヒトのPK濃度とゴマ摂取の関連についての報告はない。

実験1のポジティブコントロールとして用いたKCZは、イミダゾール系抗真菌薬であり、イミダゾール環がCYPのヘム鉄と配位結合することによって、CYP酵素活性を阻害する。KCZは、ヒト肝臓マイクロソームにおけるCYP4F依存性のPK水酸化を阻害し、ヒトとラットの肝細胞において、トコフェロールのCEHCへの異化を阻害することが明らかにされている(Bardowellら, 2010)。さらに、当研究室でラットにKCZを経口投与したところ、様々な組織のγ-トコフェロールとトコトリエノール濃度が上昇し、それらの代謝産物の排泄量も低下した(Abeら, 2007)。そこで、本研究では、CYP4F依存性のビタミンKとEの異化の阻害剤として、予備実験でラットの成長に影響のないことが確認された0.1%KCZ添加飼料を用いた。

実験1の結果から、0.2%セサミン添加飼料を7日間摂取させることによって、対照群と比べて肝臓のPKおよびMK-4濃度が上昇した(Fig.13)。このとき、γ-トコフェロール濃度が上昇することと、その代謝産物であるγ-CEHC濃度が低下することを確認した。また、CYPの阻害剤であるKCZ添加飼料の摂取によって、セサミン摂取とほぼ同様の結果が得られた。これらの結果から、セサミン摂取によって、ビタミンEだけでなくビタミンKの濃度も上昇することが明らかになり、ビタミンKの異化がセサミンによって阻害されたことが示唆された。

一方、40日間の飼育を行った実験3で、ゴマ摂取により、腎臓、心臓、肺、精巣および脳のパク濃度は上昇していたが(Fig. 16)、脳以外のこれらの組織のMK-4濃度には、ゴマ摂取の有無による差が見られなかった(Fig. 17)。この結果から、ゴマリグナンは、肝臓におけるPKのCYP4F依存性異化反応を阻害することによってPKの肝外組織への輸送を亢進させる一方、肝外組織でのPKからMK-4への変換反応やMK-4の異化には影響を与えないことが推測された。脳にはMK-4が豊富に存在することから(Carriéら, 2004)、MK-4は脳機能において重要な働きをしていると想像されている(Carriéら, 2011)しかし、ゴマ摂取による脳のパク蓄積のメカニズムは、現時点で不明である。

γ-トコフェロールと比べると、肝臓のパク濃度はかなり低い。さらに、セサミンおよびゴマの摂取は、肝臓中のγ-トコフェロール濃度を著しく上昇させた(Table 7-9)。γ-トコフェロールとPKは同一酵素であるCYP4Fの基質であるため、ゴマ摂取によるCYP4F阻害によって肝臓に蓄積したγ-トコフェロールがPKの水酸化を競合阻害した結果、肝臓のパク濃度が上昇した可能性も考えられた。しかし、γ-トコフェロールの過剰摂取はγ-CEHCの尿中排泄量を著しく上昇させたが(Table 9)、血清および肝臓のパク濃度はγ-トコフェロール過剰摂取による影響がなかった。ゴマ摂取による肝臓パク濃度の上昇は、肝臓へのγ-トコフェロール蓄積によるCYP4Fの競合阻害によるものではないことが示唆された。γ-トコフェロールの過剰摂取により、肝外組織のパク濃度は逆に低下したが(Fig. 16)、第2章の実験1では、γ-トコフェロール摂取による肝外パク濃度に変動はなかった(Table 3)。この違いは、飼料に添加したγ-トコフェロール量の違いによることを考え

られる。実験 1 では、 $\gamma$ -トコフェロールを 100 mg/kg 飼料添加し、実験 7 では、500 mg/kg 飼料添加した。以上の結果から、 $\alpha$ -トコフェロールだけでなく、 $\gamma$ -トコフェロールによっても、標準の 10 倍量を摂取することによって、肝外 PK 代謝が変動する可能性が示唆された。

本章における結果は、ゴマおよびゴマリグナンの摂取によって、ラットの PK 濃度が上昇することを初めて明らかにしたものである。ゴマリグナンが、CYP4F2 依存性の PK 水酸化反応を阻害することによって肝外組織の PK 濃度を上昇させることが推測された。この推測を裏付けるためには、今後、ゴマリグナン摂取時の PK 代謝産物の尿中排泄量の測定が必要であろう。



## 第4章 総合討論

経口摂取した PK は、小腸で吸収され、そのほとんどはキロクミロンに会合してリンパ、血中を通り、肝臓へと運ばれる (Lamon-Fava ら, 1999、Erkkilä ら, 2004)。経口摂取した PK の一部は、小腸で MD に変換され、リンパ管を介して各組織に運搬される (Hirota ら, 2013)。肝臓に運ばれた PK は、リポタンパク質を介してさまざまな肝外組織に運ばれるか、肝臓で CYP4F 依存性の異化経路によって代謝産物に変換され、グルクロン酸等によって抱合体になり、主に尿中に排泄される (Shearer ら, 1973)。このビタミン K の代謝過程に、食品因子がどのような影響を及ぼすかという点については、ほとんど明らかにされていない。本研究では、食品因子によるビタミン K の代謝変動を明らかにすることを目的とした。

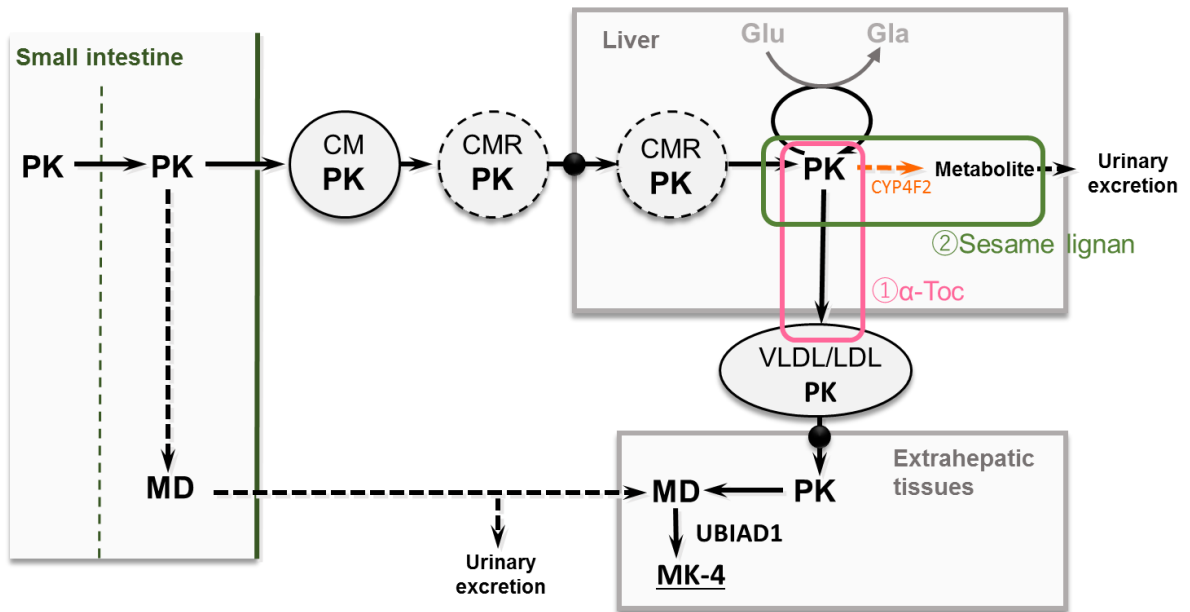
第2章において、 $\alpha$ -トコフェロール摂取は、PK 摂取ラットの肝臓 PK および MK-4 濃度を上昇させた。 $\alpha$ -トコフェロールは、*in vitro*において、CYP4F2 による PK の水酸化能を変動させず (Farley ら, 2013)、PK の  $\omega$  水酸化反応における  $K_m$  値には影響を与えない (Farley ら, 2014)。また、 $\alpha$ -トコフェロールの皮下注射の有無によって、ラットのビタミン K 代謝物の尿中排泄量は変化しないことが報告されている (Farley ら, 2012)。したがって、 $\alpha$ -トコフェロールとビタミン K を同時摂取した際に、肝臓において、ビタミン E はビタミン K の異化に影響を及ぼさないと考えられる。また、 $\alpha$ -トコフェロールの摂取によって多くの肝外組織の PK 濃度が一様に低下することが明らかとなった。このとき、肝臓の PK 濃度、MK-4 濃度は低下していない。肝臓でビタミン E によるビタミン K の異化の促進が起こっていないとすると、 $\alpha$ -トコフェロールによって、肝臓から肝外組織への PK の運搬が阻害されたことにより、肝外組織の PK 濃度が低下したと推測される。

第3章では、ゴマ及びゴマリグナンの摂取によってラットの PK 濃度が上昇することが明らかになった。セサミンは、CYP4F を阻害する働きを有することから (McDonald ら, 2012)、ゴマリグナンは、CYP4F2 依存性の PK 水酸化反応を阻害することによって肝外組織の PK 濃度を上昇させたと推定される。

以上の結果から、ビタミン K の代謝は  $\alpha$ -トコフェロールやゴマリグナンなどの食事因子の摂取によって変動することが明らかになった。ビタミン K の代謝を変動させる食事因子の作用点として、①PK の肝臓から肝外組織への運搬、②肝臓における CYP4F 依存性異化過程の2段階が考えられ、おそらく肝臓が食事因子によるビタミン K 代謝変動の1つのターゲットとなることが推測された (Fig. 18)。

ビタミン K は生体内で、肝臓における血液凝固反応をはじめ、骨などの様々な組織で重要な働きを示す。本研究の結果から、同量のビタミン K を摂取した場合でも、同時に摂取する他の食事因子によって、体内のビタミン K 濃度を上昇もしくは低下させることが示唆された。したがって、ビタミン K が生体内の様々な組織で栄養学的機能を発揮するための適切な栄養状態を維持するためには、ビタミン K と同時に摂取する食品因子による影響も

考慮する必要があると考えられる。



**Figure 18** Effects of  $\alpha$ -tocopherol and sesame lignan on vitamin K metabolism. CM, chylomicron; CMR, chylomicron remnant; CYP4F2, cytochrome P450 4F2; Gla,  $\gamma$ -carboxyglutamate; Glu, glutamate; LDL, low density lipoprotein; MD, menadione; MK-4, menaquinone-4; PK, phylloquinone; UBIAD1, UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1; VLDL, very low density lipoprotein.

## 第5章 要約

---

ビタミン K の栄養状態が、他の栄養素や機能性食品成分によって影響を受けるという報告はほとんどない。そこで本研究では、Wistar 系雄性ラットを用いて、ビタミン K の栄養状態に及ぼす食事因子の影響を調べた。

ビタミン E の過剰摂取によってビタミン K 欠乏性出血が起こる可能性が古くから知られているが、その詳細は現在もなお不明である。そこで、ビタミン E 摂取が体内のビタミン K 濃度に及ぼす影響を調べた。PK と  $\alpha$ -トコフェロールを含む飼料をラットに 6 週間摂取させたところ、 $\alpha$ -トコフェロールの摂取によって、肝臓の PK および MK-4 濃度が上昇した。それに対し、肝外組織の PK 濃度は  $\alpha$ -トコフェロールの摂取によって低下した。一方、PK の代わりに MK-4 を用いて同様の実験を行ったところ、血清と肝外組織の MK-4 濃度は  $\alpha$ -トコフェロール摂取によって低下しなかった。また、ビタミン K・E 欠乏ラットに、PK と  $\alpha$ -トコフェロールを含む試験液を経口投与し、6 時間後の PK 濃度を測定した。その結果、肝臓の PK 濃度は変化しなかったが、肝外組織の PK 濃度は低下した。以上の結果から、 $\alpha$ -トコフェロールが PK 摂取後の肝臓から肝外組織への PK の移行を阻害することによって、肝外組織の PK 濃度を低下させるのではないかと推測された。

ゴマリグナンであるセサミンは、ビタミン E 水酸化酵素である CYP4F2 を阻害することによって体内のビタミン E 濃度を上昇させる。一方、この CYP4F2 がビタミン K の水酸化活性も示すことが最近報告された。そこで、セサミン摂取が体内のビタミン K 濃度に及ぼす影響を調べた。ラットにセサミン添加飼料を 7 日間摂取させたところ、肝臓の PK および MK-4 濃度が上昇した。また、ラットにゴマ添加飼料を 3 日間摂取させるところ、肝臓と腎臓の PK 濃度が上昇した。さらに、ラットにゴマ添加飼料を 40 日間摂取させたところ、さまざまな肝外組織の PK 濃度が上昇した。以上の結果から、ゴマ摂取によって体内のビタミン K 濃度が上昇することが明らかになり、セサミンがビタミン E だけでなくビタミン K の異化も阻害することが示唆された。

本研究の結果から、摂取するビタミン K の量は一定にも関わらず、 $\alpha$ -トコフェロールおよびセサミンを摂取することによって、体内のビタミン K 濃度が変動したことから、ビタミン K の栄養状態がさまざまな食事因子によって影響を受けることが示唆された。

## 引用文献

---

- エーザイ株式会社 Warfarin 適正使用情報第3版 (2016)
- 厚生労働省 日本人の食事摂取基準 2015年版 (2015)
- 白幡聡, 伊藤進, 高橋幸博. 新生児・乳児ビタミン K 製剤投与の改訂ガイドライン (修正版). 公益財団法人日本小児科学会. (2012)
- Abdo KM, Rao G, Montgomery CA, Dinowitz M, Kanagalingam K. Thirteen-week toxicity study of d-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 24:1043-1050 (1986)
- Abe C, Uchida T, Ohta M, Ichikawa T, Yamashita K, Ikeda S. Cytochrome P450-dependent metabolism of vitamin E isoforms is a critical determinant of their tissue concentrations in rats. *Lipids* 42: 637-645 (2007)
- Abe C, Ikeda S, Uchida T, Yamashita K, Ichikawa T. Triton WR1339, an inhibitor of lipoprotein lipase, decreases vitamin E concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. *J Nutr* 137: 345-350 (2007)
- Akiyama Y, Hara K, Kobayashi M, Tomiuga T, Nakamura T. Inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption in ovariectomized rats: a histomorphometric and dual energy X-ray absorptiometric study. *Jpn J Pharmacol.* 80:67-74 (1999)
- Azuma K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S. Vitamin K2 suppresses proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells by activating steroid and xenobiotic receptor. *Endocr J* 56:843-849 (2009)
- Bardowell SA, Stec DE, Parker RS. Common variants of cytochrome P450 4F2 exhibit altered vitamin E- $\omega$ -hydroxylase specific activity. *J Nutr* 140: 1901-1906 (2010)
- Bardowell SA, Duan F, Manor D, Swanson JE, Parker RS. Disruption of mouse cytochrome p450 4f14 (Cyp4f14 gene) causes severe perturbations in vitamin E metabolism. *J Biol Chem* 287: 26077-26086 (2012)
- Booth SL, Golly I, Satchek JM, Roubenoff R, Dallal GE, Hamada K, Blumberg JB. Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status. *Am J Clin Nutr* 80:143-148 (2004)
- Carrié I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S, Ferland G. Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *J Nutr* 134: 167-172 (2004)
- Carrié I, Bélanger E, Portoukalian J, Rochford J, Ferland G. Lifelong low-phyloquinone intake is associated with cognitive impairments in old rats. *J Nutr* 141: 1495-1501 (2011)

- Edson KZ, Prasad B, Unadkat JD, Suhara Y, Okano T, Guengerich FP, Rettie AE. Cytochrome P450-dependent catabolism of vitamin K:  $\omega$ -hydroxylation catalyzed by human CYP4F2 and CYP4F11. *Biochemistry* 52: 8276-8285 (2013)
- Erkkilä AT, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Grusak MA, Jalbert SM, Aquino KA, Peterson JW, Booth SL. Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens. *Metabolism* 53:215-221 (2004)
- Farley SM, Leonard SW, Labut EM, Raines HF, Card DJ, Harrington DJ, Mustacich DJ. Vitamin E decreases extra-hepatic menaquinone-4 concentrations in rats fed menadione or phylloquinone. *Mol Nutr Food Res* 56:91-922 (2012)
- Farley SM, Leonard SW, Taylor AW, Birringer M, Edson KZ, Rettie AE, Traber MG.  $\omega$ -Hydroxylation of phylloquinone by CYP4F2 is not increased by  $\alpha$ -tocopherol. *Mol Nutr Food Res* 57: 1785-1793 (2013)
- Farley SM, Leonard SW, Stevens JF, Traber MG. Deuterium-labeled phylloquinone fed to  $\alpha$ -tocopherol-injected rats demonstrates sensitivity of low phylloquinone-containing tissues to menaquinone-4 depletion. *Mol Nutr Food Res* 58:1610-1619 (2014)
- Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. Brief communication: The prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Ann Intern Med* 143:116-120 (2005)
- Frank J, Weiser H, Biesalski HK. Interaction of vitamins E and K: effect of high dietary vitamin E on phylloquinone activity in chicks. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 242-247 (1997)
- Frank J, Lee S, Leonard SW, Atkinson JK, Kamal-Eldin A, Traber MG. Sex differences in the inhibition of gamma-tocopherol metabolism by a single dose of dietary sesame oil in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 87: 1723-1739 (2008)
- Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, Takitani K, Negishi-Koga T, Sunamura S, Kodama T, Takayanagi H, Tamai H, Kato S, Arai H, Shinomiya K, Itoh H, Okawa A, Takeda S. *Nat Med* 18:589-594 (2012)
- Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JC. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr* 134:3100-3105 (2004)
- Goncalves A, Margier M, Roi S, Collet X, Niot I, Goupy P, Caris-Veyrat C, Reboul E. Intestinal scavenger receptors are involved in vitamin K1 absorption. *J Biol Chem* 289: 30743-30752 (2014)
- Gu JY, Wakizono Y, Tsujita A, Lim BO, Nonaka M, Yamada K, Sugano M. Effects of sesamin and alpha-tocopherol, individually or in combination, on the polyunsaturated fatty acid metabolism,

- chemical mediator production, and immunoglobulin levels in Sprague-Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem*.59:2198-2202 (1995)
- Harrington DJ, Booth SL, Card DJ, Shearer MJ. Excretion of the urinary 5C- and 7C-aglycone metabolites of vitamin K by young adults responds to changes in dietary phylloquinone and dihydrophylloquinone intakes. *J Nutr* 137: 1763-1768 (2007)
- Helson L. The effect of intravenous vitamin E and menadiol sodium diphosphate on vitamin K dependent clotting factors. *Thromb Res* 35: 11-18 (1984)
- Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Takeuchi A, Sawada N, Kamao M, Wada A, Okitsu T, Okano T. Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *J Biol Chem* 288: 33071-33080 (2013)
- Horwitt MK. Vitamin E: a reexamination. *Am J Clin Nutr* 29: 569-578 (1976)
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409: 105-108 (1997)
- Ikeda S, Tohyama T, Yamashita K. Dietary sesame seed and its lignans inhibit 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman excretion into urine of rats fed gamma-tocopherol. *J Nutr* 132: 961-966 (2002)
- Ikeda S, Abe C, Uchida T, Ichikawa T, Horio F, Yamashita K. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 383-392 (2007)
- Iwamoto J, Yeh JK, Takeda T. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bones in orchidectomized and/or sciatic neurectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):776-83.
- Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, Uwano M, Yamaguchi N, Uenishi K, Ishida H, Sasaki S, Okano T. Vitamin K content of foods and dietary vitamin K intake in Japanese young women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 53: 464-470 (2007)
- Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34: 343-358 (1993)
- Kim M, Na W, Sohn C. Vitamin K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinone-4) supplementation improves bone formation in a high-fat diet-induced obese mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2013 Sep;53(2):108-13
- Kiyose C, Saito H, Kaneko K, Hamamura K, Tomioka M, Ueda T, Igarashi O. Alpha-tocopherol affects the urinary and biliary excretion of 2,7,8-trimethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, gamma-tocopherol metabolite, in rats. *Lipids* 36:467-472 (2001)

- Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phyloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr* 67: 1226-1231 (1998)
- Lodge JK, Ridlington J, Leonard S, Vaule H, Traber MG. Alpha- and gamma-tocotrienols are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids* 36: 43-48 (2001)
- March BE, Wong E, Seier L, Sim J, Biely J. Hypervitaminosis E in the chick. *J Nutr* 103: 371-377 (1973)
- McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol* 75: 1337-1346 (2009)
- Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Suhara Y, Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 468: 117-121 (2010)
- Puckett RM, Offringa M. Prophylactic vitamin K for vitamin K deficiency bleeding in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD002776 (2000)
- Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, Nakagawa K. Conversion of phyloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem* 283: 11270-11279 (2008)
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951 (1993)
- Schultz M, Leist M, Petrzika M, Gassmann B, Brigelius-Flohé R. Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am J Clin Nutr* 62: 1527S-1534S (1995)
- Shimizu S, Akimoto K, Shinmen Y, Kawashima H, Sugano M, Yamada H. Sesamin is a potent and specific inhibitor of delta 5 desaturase in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids* 26:512-516 (1991)
- Shearer MJ, Barkhan P. Studies on the metabolites of phyloquinone (vitamin K 1) in the urine of man. *Biochim Biophys Acta* 297: 300-312 (1973)
- Shearer MJ, Fu X, Booth SL. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Adv Nutr* 3:182-195 (2012)
- Shirakawa H, Ohsaki Y, Minegishi Y, Takumi N, Ohinata K, Furukawa Y, Mizutani T, Komai M. Vitamin K deficiency reduces testosterone production in the testis through down-regulation of



- the Cyp11a a cholesterol side chain cleavage enzyme in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1760: 1482-1488 (2006)
- Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15:515-521 (2000)
- Sirato-Yasumoto S, Katsuta M, Okuyama Y, Takahashi Y, Ide T. Effect of sesame seeds rich in sesamin and sesamolin on fatty acid oxidation in rat liver. *J Agric Food Chem*. 49:3647-3651 (2001)
- Sontag TJ, Parker RS. Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem* 277: 25290-25296 (2002)
- Sontag TJ, Parker RS. Influence of major structural features of tocopherols and tocotrienols on their omega-oxidation by tocopherol-omega-hydroxylase. *J Lipid Res* 48:1090-1098 (2007)
- Suttie JW, Carlisle TL. Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver. *Biochemistry* 19:1161-1167 (1980)
- Swanson JE, Ben RN, Burton GW, Parker RS. Urinary excretion of 2,7,8-trimethyl-2-(beta-carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of elimination of gamma-tocopherol in humans. *J Lipid Res* 40: 665-671 (1999)
- Takada T, Yamanashi Y, Konishi K, Yamamoto T, Toyoda Y, Masuo Y, Yamamoto H, Suzuki H. NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy. *Sci Transl Med* 7:275ra23 (2015)
- Thijssen HH, Vervoort LM, Schurgers LJ, Shearer MJ. Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *Br J Nutr* 95: 260-266 (2006)
- Tovar A, Ameho CK, Blumberg JB, Peterson JW, Smith D, Booth SL. Extrahepatic tissue concentrations of vitamin K are lower in rats fed a high vitamin E diet. *Nutr Metab (Lond)* 3: 29 (2006)
- Traber MG, Sies H. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 16: 321-347 (1996)
- Traber MG, Arai H. Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu Rev Nutr* 19: 343-355 (1999)
- Traber MG. Vitamin E and K interactions--a 50-year-old problem. *Nutr Rev* 66:624-629 (2008)
- Ueda T, Igarashi O. New solvent system for extraction of tocopherols from biological specimens for hplc determination and the evaluation of 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol as an internal standard. *J Micronutr Anal* 3: 185-198 (1987)

- Vos M, Esposito G, Edirisinghe JN, Vilain S, Haddad DM, Slabbaert JR, Van Meensel S, Schaap O, De Strooper B, Meganathan R, Morais VA, Verstreken P. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science* 1306-1310 (2012)
- Wheldon GH, Bhatt A, Keller P, Hummler H. d,1-alpha-Tocopheryl acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 53:287-296 (1983)
- Wu WH, Kang YP, Wang NH, Jou HJ, Wang TA. Sesame ingestion affects sex hormones, antioxidant status, and blood lipids in postmenopausal women. *J Nutr* 136: 1270-1275 (2006)
- Yamamoto R, Komai M, Kojima K, Furukawa Y, Kimura S. Menaquinone-4 accumulation in various tissues after an oral administration of phylloquinone in Wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43: 433-143 (1997)
- Yamashita K, Nohara Y, Katayama K, Namiki M. Sesame seed lignans and gamma-tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats. *J Nutr* 122: 2440-2446 (1992)
- Yamashita K, Iizuka Y, Imai T, Namiki M. Sesame seed and its lignans produce marked enhancement of vitamin E activity in rats fed a low alpha-tocopherol diet. *Lipids* 30: 1019-1028 (1995)
- You CS, Sontag TJ, Swanson JE, Parker RS. Long-chain carboxychromanols are the major metabolites of tocopherols and tocotrienols in A549 lung epithelial cells but not HepG2 cells. *J Nutr* 135:227-232 (2005)

## 謝辞

---

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、日々の実験や研究に対する取り組み方について終始ご指導ご鞭撻を賜りました池田彩子教授に心より感謝いたします。池田教授には、研究発表や研究助成に関する書類作成についても、一つ一つ懇切丁寧なご指導をいただき、深く感謝申し上げます。これまで何度も同じ失敗を繰り返しましたが、暖かいご指導をいただき、無事修了することが出来ました。池田教授には、学部生時代からも含め、6年間もの間ご指導いただきました。本当にありがとうございました。

実験技術のご指導のみならず、研究室生活のあらゆる面においてお世話になりました野村早助手に心より感謝申し上げます。野村助手には、ビタミン E、ビタミン K の測定方法を、優しくご指導いただきました。沢山の失敗を重ねてしまい、多大なご迷惑をおかけしましたが、野村助手のおかげで本研究は成し遂げられました。

本研究の遂行を支えてくださった鈴木規恵助手に深く感謝いたします。鈴木助手には、私の心が挫けそうなときに、幾度となく励ましのお言葉をいただき救われました。また、研究に対して、私では到底考えが及ばないような幅広い視野から適切なアドバイスをいただきました。鈴木助手のお力添えなくして本研究を終えることは不可能だったと確信しております。ありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、飼料に添加したビタミン E 同族体を提供して下さいましたエーザイフード・ケミカル株式会社、ビタミン E 標準試薬、CEHC および MK-3 を提供して下さいましたエーザイ株式会社、煎りゴマを提供して下さいました株式会社真誠、セサミンを提供して下さいました竹本油脂株式会社に感謝の意を表します。

栄養化学研究室の 4 年生および 3 年生の皆様には、毎日の実験および実験動物の飼育、解剖などで多大なご協力をいただきました。皆様のおかげで本研究を成し遂げることができました。ありがとうございました。

最後に、名古屋大学栄養生化学研究室の小田裕昭准教授に深謝申し上げます。小田准教授には、名古屋大学での研究の機会をいただきました。また、研究に対する姿勢や心構えをご指導いただき、小田准教授のおかげで、私の研究に対する意識は大きく変わりました。ありがとうございました。