

ラットにおけるビタミンK1またはビタミンK2経口投与によるアルカリホスファターゼ活性への影響

誌名	日本栄養・食糧学会誌
ISSN	02873516
著者名	祓川,摩有 曾我部,夏子 田辺,里枝子 五関,正江
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	68巻5号
掲載ページ	p. 217-223
発行年月	2015年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ラットにおけるビタミン K₁ またはビタミン K₂ 経口投与によるアルカリホスファターゼ活性への影響祓 川 摩 有^{1,2}, 曾我部 夏子³, 田 辺 里 枝 子¹, 五 関-曾 根 正 江^{*1}

(2015年4月21日受付; 2015年6月10日受理)

要旨: アルカリホスファターゼ (ALP) は, リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する酵素である。小腸型 ALP 活性は脂質の投与により上昇することが知られているが, 生理的機能については不明な点が多い。そこで今回, ビタミン K₁ (PK) またはビタミン K₂ (MK-4) 経口投与による ALP 活性への影響について検討を行った。7週齢の SD 系雄ラット 56 匹について, PK を経口投与した PK 群, MK-4 を経口投与した MK 群とし, 投与前, 投与後 1.5, 3.0, 4.5 時間後に小腸, 肝臓, 腎臓のサンプルを採取した。その結果, PK 群または MK 群において, 十二指腸および回腸上部の ALP 比活性が投与前に比べて有意に高値を示した。一方, 肝臓や腎臓では, ビタミン K 経口投与による ALP 活性への影響は認められなかった。以上の結果から, PK または MK-4 の経口投与により, 小腸の ALP 活性が増強されることが明らかになった。

キーワード: アルカリホスファターゼ, ビタミン K₁, ビタミン K₂, ラット, 小腸

リンは, 成人の生体内に, 最大で約 850 g 存在し, その 85% が骨組織, 14% が軟組織, 1% が細胞内, 細胞外液および細胞膜に存在している。骨組織においては, ヒドロキシアパタイトの形として主に存在している。カルシウムのように日本人の食生活において通常不足することはほとんどみられないが, 食事からのリンの過剰摂取により, 腸管でのカルシウム吸収率が低下することが指摘されており, ミネラル代謝における食事性因子の栄養学的視点からのリンの研究が注目されている。しかし, リン代謝に関する研究は解明されていない点が多く残されている。

リン酸代謝に関する酵素の 1 つに, アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) [EC 3.1.3.1] がある。ALP は, リン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒する。アルカリ性 (pH 8-10) に至適 pH を持つ亜鉛含有酵素で, Mg²⁺ で活性化される。

ヒトにおいては, ALP は少なくとも 4 種類のアイソザイムが存在しており, 骨, 肝臓, 腎臓などに存在する組織非特異型 ALP (tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNSALP), 小腸に存在する小腸型 ALP (intestinal alkaline phosphatase; IAP), 胎盤型 ALP, 生殖細胞型 ALP に分類されている¹⁻⁴⁾。いずれのアイソザイムにおいても, リン酸化合物を加水分解して無機リン酸を提供することで, リン酸代謝に関わっており, 共通の生理的機能

を有することが推察されている⁵⁾。

TNSALP 遺伝子の欠損により引き起こされる低ホスファターゼ症 (hypophosphatasia; HPP) の研究から, TNSALP は骨組織において, 石灰化に深く関与していることが示されている⁶⁻⁸⁾。また, 我々は日本人高齢女性 (501 名) において, TNSALP 遺伝子多型 (787T>C) (rs3200254) と骨密度が深く関連していることを報告した⁹⁾。一方, 小腸に存在する IAP は脂質投与により活性が上昇し, 食事性因子との関連が示唆されているが, その生理機能については, 不明な点が多い。

骨代謝と関連する栄養素として, ビタミン K があげられる。ビタミン K は, 1,4-ナフトキノン環を共通構造として, ビタミン K₁ (phyloquinone) とビタミン K₂ (menaquinone) が天然に存在する。ビタミン K は, 血液凝固因子 (Ⅱ・Ⅶ・Ⅸ・Ⅹ) を活性化させ, 欠乏すると血液凝固の遅延を引き起こす。また, 骨基質タンパク質であるオステオカルシンの活性化 (Gla 化) にも関与し, 骨折のリスクを低下させることが報告されている¹⁰⁾。さらに, 肝臓再発進展予防効果作用¹¹⁾や, 冠動脈疾患リスクの軽減リスク¹²⁾なども示唆されている。

我々は, これまでにラットにおけるビタミン K 混餌の長期摂取による影響について検討を行ってきたが^{13,14)}, 今回さらにラットを用いてビタミン K₁ (phyloquinone: PK) またはビタミン K₂ (menaquinone-4: MK-4) の経口

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ 日本女子大学家政学部食物学科栄養学研究室 (112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1)² 聖徳大学児童学部児童学科 (271-8555 千葉県松戸市岩瀬 550)³ 駒沢女子大学人間健康学部健康栄養学科 (206-8511 東京都稲城市坂浜 238)

投与によるALP動態への影響について比較を行った。ビタミンKがALPへ及ぼす作用について検討することは、ALPの機能解明だけでなく、ビタミンK₁またはビタミンK₂によるリン酸代謝への影響を明らかにすることにつながると考えられる。さらにはビタミンK₁またはビタミンK₂のリン酸代謝や脂質代謝などにおける生体内での役割についても、新たな証拠が得られることが期待され、骨粗鬆症や脂質異常症などの生活習慣病の予防の観点からも重要であると考えられた。

方 法

1. 実験方法

実験動物には体重190-240gの7週齢SD系ラット56匹を用いた。動物は一晚絶食させた後、経口投与前にサンプリングしたものを投与前(0h)とし、PK群はPKを0.2mL投与し、それぞれ1.5時間後(PK 1.5h)、3.0時間後(PK 3.0h)、4.5時間後(PK 4.5h)に、MK群はMK-4(37°Cで溶解)を0.2mL(≒0.4mmol/0.2mL)投与し、それぞれ1.5時間後(MK 1.5h)、3.0時間後(MK 3.0h)、4.5時間後(MK 4.5h)に、ジエチルエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血した。PKおよびMK-4の分子量は、それぞれ450.7、444.7であり、今回実験に使用したPK(含量:97.0%以上)およびMK-4(含量:98.0%以上)は、エーザイ株式会社よりご寄与いただいた。ビタミンKの溶媒としてエタノールなどを用いた場合、その影響について検討する必要が生じるため、今回の実験ではPKおよびMK-4の原材料を溶媒で希釈せずにそのまま用いた。

なお、本実験は日本女子大学動物実験委員会の承認を受けた研究である(承認番号:II07-05)。

2. 血清生化学検査

採取した血液を遠心分離(2500rpm, 10min)し、上清を血清サンプルとした。その後、HDLコレステロール(HDL-Cho)、LDLコレステロール(LDL-Cho)は酵素法¹⁵⁾、トリグリセライド(TG)はGK-GPO(glycerokinase-glycerol-3-phosphate oxidase)法¹⁶⁾、カルシウム(Ca)は

OCPC法¹⁷⁾、無機リン(P)は*p*-methylaminophenol法¹⁸⁾、総タンパク質(TP)はBiuret法¹⁹⁾、アルカリホスファターゼ(ALP)はBessey-Lowry法²⁰⁾により測定した。

3. 各組織中のALP比活性測定

採血後のラットから十二指腸、空腸、回腸を採取して、縦に切開し、冷生理的食塩水で洗浄し、スライドグラスでスクレープしたものを小腸粘膜サンプルとした。なお、小腸については胃幽門部から3cmを十二指腸とし、その後盲腸までを上部1/2を空腸、下部1/2を回腸とし、さらに空腸と回腸をそれぞれ2等分し、胃幽門部側から順に空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部とした。採取した肝臓および腎臓は、それぞれ冷生理的食塩水で洗浄後、-80°Cにて保存した。ALPの抽出およびALP活性測定は、既報に従った²¹⁾。タンパク質含量はBCA Protein Assay Kit(PIERCE, IL, U.S.A.)を使用して測定した。

4. 統計解析

統計解析はIBM SPSS Statistics 22を用いた。各データの有意差検定は一元配置の分散分析を行った後、Dunnetの検定により危険率0.1, 1, および5%で検定した。

結 果

1. 血清生化学検査

Table 1に血清総タンパク質、カルシウム、リン、ALP、TG、HDL-Cho、LDL-Choのそれぞれの測定結果を示した。血清総タンパク質、カルシウム、リン、ALP活性いずれにおいても、PK群およびMK群ともに、投与後1.5時間後、3.0時間後、4.5時間後において、投与前に比べて有意差は認められなかった。血清TG値において、PK群では、1.5時間後でPK投与前に比べて有意に高値を示した($p < 0.001$)。一方、MK群では、MK-4投与後1.5時間後、3.0時間後ならびに4.5時間後のいずれにおいても投与前に比べて血清TG値に有意差は認められなかった。血清HDL-Cho値については、PK群ではPK投与後1.5時間後、3.0時間後、4.5時間後いずれ

Table 1 The levels of serum total protein, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol.

Groups	TP (g/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	ALP (U/L)	TG (g/dL)	HDL-Cho (mg/dL)	LDL-Cho (mg/dL)
0 h	5.9±0.2	9.7±0.3	9.1±0.8	731±44	10.4±0.8	19.7±0.6	8.9±0.4
PK 1.5 h	5.9±0.2	10.1±0.4	9.0±0.6	784±39	26.5±3.5	##	8.5±0.7
PK 3.0 h	5.9±0.2	9.6±0.3	9.0±0.5	844±58	15.6±2.4	#	8.3±0.5
PK 4.5 h	5.9±0.2	9.8±0.3	8.5±0.4	785±51	12.1±1.6	##	7.9±0.6
MK 1.5 h	5.9±0.1	9.7±0.3	8.5±0.9	821±91	10.0±1.9		7.8±0.4
MK 3.0 h	5.8±0.1	9.6±0.3	8.6±0.4	761±28	7.6±0.7		7.8±0.4
MK 4.5 h	5.9±0.3	10.0±0.3	8.9±0.8	773±37	10.7±0.9	**	5.9±0.6 ***

Each value represents mean ± S.E. ($n=8$). TP: Total Protein, Ca: Calcium, P: Phosphorus, ALP: Alkaline Phosphatase, TG: Triglycerides, HDL-Cho: High-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-Cho: Low-Density Lipoprotein Cholesterol. PK group vs 0 h (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$). MK group vs 0 h (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

においても投与前に比べ、有意に高値を示した（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ ）。一方、MK 群においては、MK-4 投与後 4.5 時間後のみ投与前に比べて血清 HDL-Cho 値が有意に高値を示した ($p < 0.01$)。LDL-Cho 値については、PK 群では PK 投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後で投与前に比べて、やや低値傾向を示したが有意差は認められなかった。一方、MK 群では、MK-4 投与後 4.5 時間後で投与前に比べて有意に低値を示した ($p < 0.001$)。

2. 各組織中の ALP 活性

Figures 1-3 に小腸 5 部位（十二指腸，空腸上部，空腸下部，回腸上部，回腸下部）における ALP 比活性の結果を示した。

十二指腸におけるビタミン K の経口投与の ALP 活性への影響については Figure 1 に示した通りである。PK 群では、PK 投与後 1.5 時間後から ALP 比活性が徐々に上昇し、4.5 時間後で投与前に比べて有意な高値を示した ($p < 0.05$)。一方、MK 群では、MK-4 投与後 ALP 比活性が 1.5 時間後で投与前に比べて顕著に上昇して有意な高値を示し ($p < 0.001$)、その後 3.0 時間後、4.5 時間後と徐々に減少した。

空腸上部における ALP 活性への影響については、PK 群および MK 群ともに、経口投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後いずれも、投与前に比べて ALP 比活性に有意差は認められなかった (Figure 2A)。空腸下部における ALP 活性への影響を Figure 2B に示した。PK 群では、経口投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後で、投与前に比べて ALP 比活性に有意差は認められなかった。一方、MK 群では、MK-4 投与後 ALP 比活性が 1.5 時間後で投与前に比べて、有意に高値を示し ($p < 0.001$)、その後 3.0 時間後、4.5 時間後と徐々に減少した。

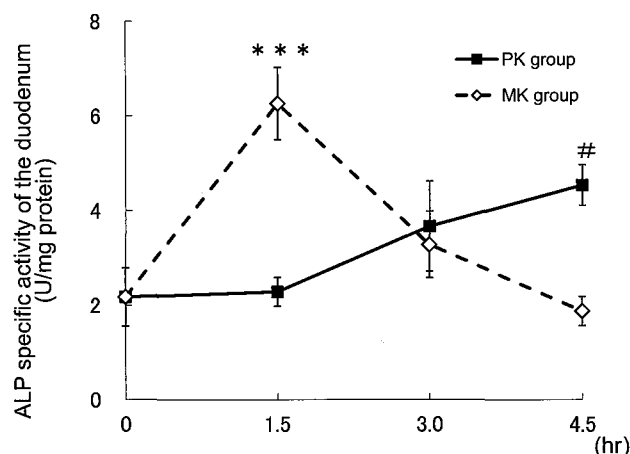


Figure 1 Time course changes of ALP specific activity of the duodenum after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n = 8$). Significant difference between the PK group and 0 h (# : $p < 0.05$). Significant difference between the MK group and 0 h (***) : $p < 0.001$).

回腸上部における ALP 活性への影響については Figure 3A に示した通りである。ALP 比活性は、PK 群で PK 投与後 1.5 時間後に投与前に比べて有意に高値を示した ($p < 0.001$)。また、MK 群でも MK-4 投与後 1.5 時間後で、投与前に比べて ALP 比活性が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。回腸下部では PK 群および MK 群ともに、経口投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後で、投与前に比べて ALP 比活性に有意差は認められなかった (Figure 3B)。

肝臓組織における ALP 活性への影響を Figure 4A に示した。肝臓では、ALP 比活性は PK 群および MK 群ともに、経口投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後いずれにおいても、投与前に比べて有意差は認められなかった。腎臓組織における ALP 活性への影響を Figure 4B に示した。腎臓では、ALP 比活性は PK 群および MK 群ともに、経口投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後いずれにおいても、投与前に比べて有意差は認められなかった。

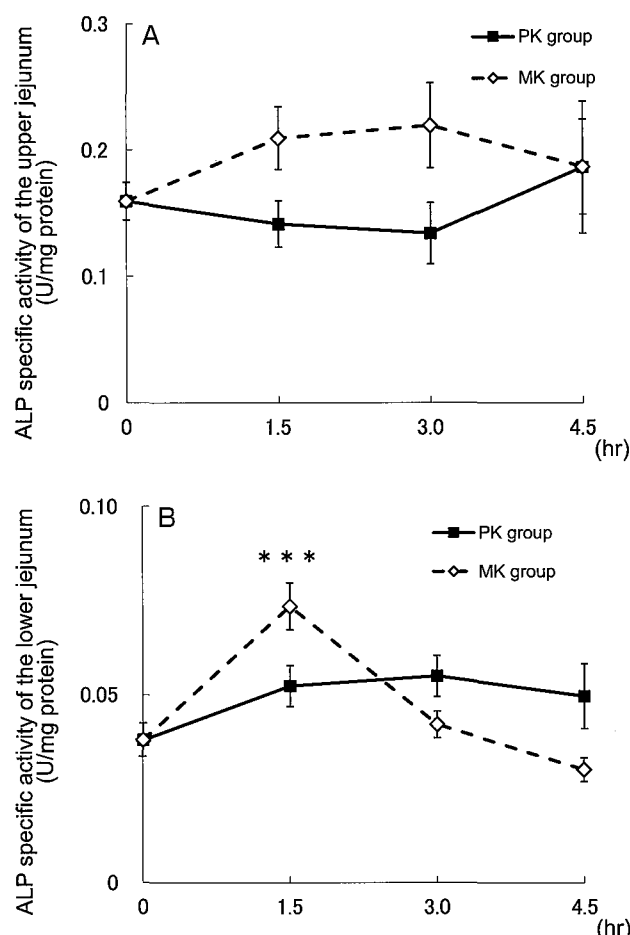


Figure 2 A: Time course changes of ALP specific activity of the upper jejunum after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n = 8$). B: Time course changes of ALP activity of the lower jejunum after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n = 8$). Significant difference between the MK group and 0 h (***) : $p < 0.001$).

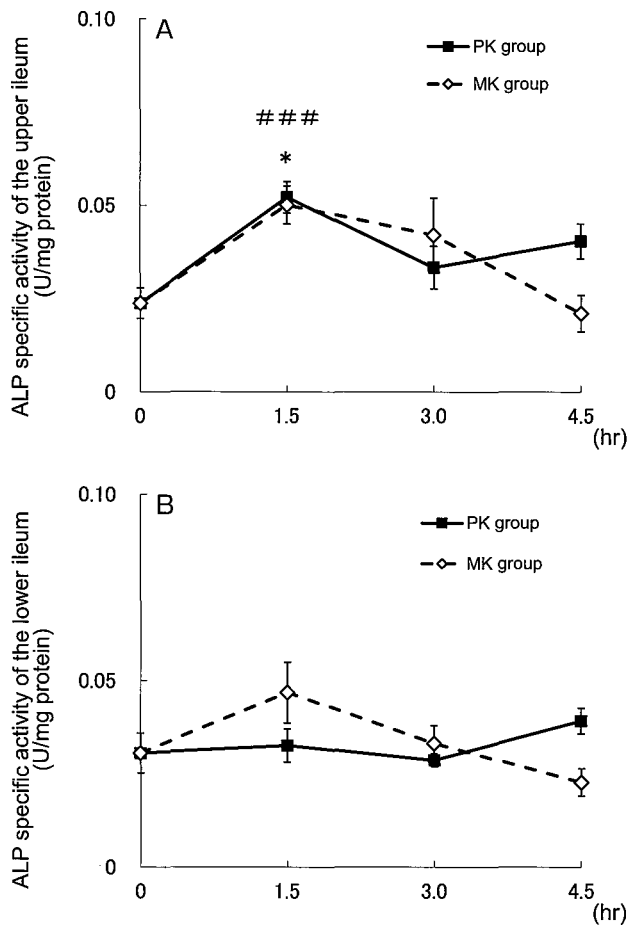


Figure 3 A: Time course changes of ALP specific activity of the upper ileum after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n=8$). Significant difference between the PK group and 0 h (### : $p<0.001$). Significant difference between the MK group and 0 h (* : $p<0.05$). B: Time course changes of ALP specific activity of the lower ileum after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n=8$).

考 察

本研究では、PKまたはMK-4経口投与による各組織中のALP動態への影響について、解析を行った。

ラットやマウスでは、骨などに存在する組織非特異型ALP (TNSALP) と小腸に存在する小腸型ALP (IAP) の2種類のALPアイソザイムに分類されている。さらに、ラットのIAPとして、2種類のcDNA (IAP-I, IAP-II) が報告されており、それぞれのアミノ酸レベルのホモロジーは約79%で、2種類のmRNA (IAP-I, IAP-II) が検出されている^{22,23}。また、それぞれのmRNAの大きさはIAP-Iが2.7 kb, IAP-IIが3.0 kbであることも示されている²⁴。IAP-Iは小腸全域に存在しており、一方、IAP-IIは小腸上部に局在している²⁵。IAP-IおよびIAP-II共に、脂肪食投与により小腸ALP活性の上昇が認められており、より強く応答するのはIAP-IIであることが示されている²⁶。これらのアイソザイムには遺伝子およびタンパク質構造の違いだけでなく、5'側の上流領域

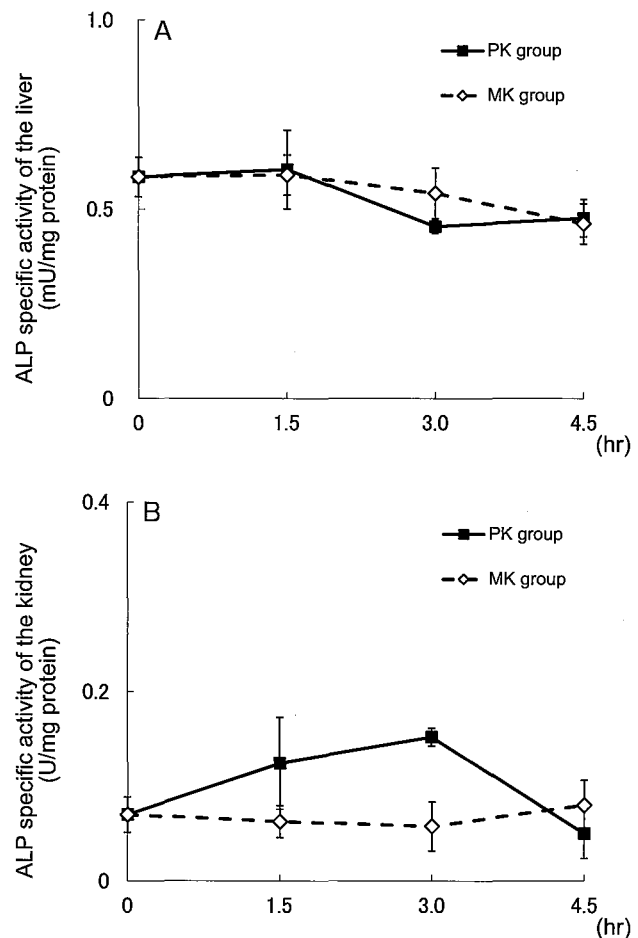


Figure 4 A: Time course changes of ALP specific activity of the liver after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n=8$). B: Time course changes of ALP specific activity of the kidney after PK or MK-4 administration. Results are the means \pm S.E. ($n=8$).

の違いによる発現調節の相違が推察されている²⁷。

ラットを用いた先行研究で、基準食 (Cont.) 群, PK (600 mg/kg diet) を添加したPK群, MK-4 (600 mg/kg diet) を添加したMK群の計3群として約3カ月 (85日間) の飼育を行った¹³。小腸を5部位で解析したところ、PK群では十二指腸と空腸上部でALP活性の有意な上昇が認められ、MK群では空腸上部と回腸下部でALP活性の有意な上昇が認められた。そこで今回、このようなPKまたはMKの影響が、長期のビタミンKの摂取によるものなのか、あるいは短期間でも認められる影響なのかを明らかにするために、ビタミンKの経口投与によるALP活性への影響について検討を行った。その結果、ビタミンK経口投与により、PK群では十二指腸と回腸上部でALP活性の有意な上昇が認められ、MK群では十二指腸と空腸下部、回腸上部でALP活性の有意な上昇が認められ、経時的な影響についても示すことができた。先行研究での飼育期間中のPKまたはMK-4の総摂取量を算定したところ、約800 mgであった¹³。今回の経口投与量は約200 mg (0.2 mL : 比重0.971) で

あり、先行研究の混餌の時のビタミン K 総摂取量の約 1/4 量であった。ヒトでは、乳児ビタミン K 欠乏性出血症に対する予防のためのビタミン K₂ シロップ剤 (2 mg/mL) の投与や骨粗鬆症の治療のために MK-4 (45 mg/day) の投与が行われているが、本研究でのビタミン K の投与量は、かなり多いと考えられ、今後、投与量についての検討を進める必要がある。

小腸 ALP の 2 種のアイソザイムのうち、IAP-II は小腸上部に局在しており、PK または MK-4 の経口投与による小腸 ALP 活性の上昇が十二指腸だけでなく回腸上部でも示されたことから、IAP-II だけでなく IAP-I も上昇している可能性が示唆された。また、PK または MK-4 の経口投与において、経時的な ALP 活性上昇作用に違いが認められ、腸管における PK と MK-4 の吸収機序あるいは ALP 活性への応答機序の相違が推察され、興味深い結果を得ることができた。特に十二指腸では、Figure 1 に示したように、PK 群では PK 経口投与後、徐々に ALP 活性が上昇し、投与後 4.5 時間後に投与前に比べ有意な高値を示したのに対して、MK 群では MK-4 投与後 1.5 時間後に投与前に比べ、顕著な ALP 活性の上昇が認められ、その後、徐々に低下し、PK と MK-4 による ALP 活性の上昇作用の違いを明らかにすることができた。MK-4 投与後 1.5 時間後の ALP 活性の上昇については、ALP 遺伝子の転写レベルの誘導というよりも、リン代謝に関与した一過性の作用によるものではないかと推察されるが、さらに詳細について検討していく必要がある。

また、Table 1 に示したように、PK または MK-4 の経口投与による血清脂質への影響については、PK 群で PK 投与後 1.5 時間後に血清 TG 値が顕著に上昇し、その後徐々に低下する経過が認められたのに対して、MK 群では血清 TG 値にはほとんど変化が認められなかった。一方、LDL-Cho 値については、PK 群では PK 投与後 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後で、投与前に比べてやや低下が認められたものの有意な低下は認められなかったが、MK 群では MK-4 投与後 4.5 時間後で、投与前に比べて LDL-Cho 値が有意な低値を示し、血清脂質レベルにおける PK あるいは MK-4 経口投与による影響の違いを示すことができた。ヒトを対象とした先行研究において、PK の摂取後、血清 TG 値が上昇していた結果が得られており²⁸⁾、ラットを用いた実験でも PK の混餌食を長期摂取させた結果、血清 TG 値が減少して脂質代謝改善効果が認められている²⁹⁾。PK は、カイロミクロンに取り込まれて、リンパ管を経て血中に入って肝臓へ運ばれると考えられており、今回の血清 TG 値の変化は、PK を輸送するために一時的に上昇したのではないかと推察された。データは示さなかったが、PK の代わりにコーンオイルを同様に 0.2 mL 経口投与したところ、投与 3 時間後で投与前に比べて十二指腸の ALP 比活性が有意に高値を示し ($p < 0.01$)、その後の投与 4.5 時間

後では減少して投与前と比べて有意な差は認められなかった。PK の経口投与と比べ、経時的な影響に違いが認められたことから、脂質とは別のメカニズムで小腸の ALP 活性が上昇したことが考えられた。先行研究で MK-4 は PK に比べ吸収率がよいこと³⁰⁾、MK-4 は LDL および HDL 中に存在していることも示されており、脂質代謝、特にコレステロール代謝に関与していることが示唆された³¹⁾。

小腸 ALP については、食事性因子との関連が深いことが示唆されているが、肝臓および腎臓での機能については不明な点が多く残されている。ラットにおいて、脂質の経口投与により、肝臓における IAP-II mRNA の発現の増強が示されている²⁶⁾。しかし、マウスにおいては、高脂肪食で飼育した場合、IAP-II のホモログである *Akp3* の肝臓における発現増強効果は認められなかった³²⁾。これらのことから、ラットとマウスの種差による肝臓での脂質代謝の相違が考えられる。また、腎臓の ALP と食事性因子との関連を調べた研究は少ないが、高食塩摂取³³⁾や、脂質経口投与³⁴⁾によって、腎臓組織中の ALP 活性に有意な差は認められていない。本研究においても、肝臓や腎臓で、ALP 活性の上昇は認められなかった。今後はさらに他の食事性因子についても、肝臓や腎臓の ALP への影響について検討していく必要があるだろう。

本研究では、ラットにおけるビタミン K₁ またはビタミン K₂ 経口投与による、小腸での ALP 活性増強効果を初めて示すことができた。ビタミン K が小腸における ALP 活性の上昇作用を介してリン代謝あるいは脂質代謝に関与している可能性が推察され、今後さらに ALP 活性誘導メカニズムについて検討を進めることで、小腸 ALP の生理的機能の解明だけでなく、ビタミン K の生体内での新しい生理作用の解明につながることを期待されよう。

本研究の一部は、JSPS 科研費 (24300259) の助成を受けたものである。

文 献

- 1) Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988) Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12002-10.
- 2) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H (1988) Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* **263**: 12011-9.
- 3) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M (1988) Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene, evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution. *J Biol Chem* **263**: 12020-7.
- 4) Shen LP, Liu H, Kan YW, Kam W (1988) 5' nucleotide sequence of a putative human placental alkaline phos-

- phatase-like gene. *Nucleic Acids Res* **16**: 5694.
- 5) 五関-曾根正江, 大井田新一郎, 佐々木哲 (1990) 骨のアルカリホスファターゼの構造と生理機能. 日本骨代謝学会雑誌 **8**, 9-19.
 - 6) Whyte MP (1989) Alkaline phosphatase: Physiological role explored in hypophosphatasia. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 - 7) Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP (1992) Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9924-8.
 - 8) Goseki-Sone M, Orimo H, Imura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida S (1998) Expression of the mutant (1735T-DEL) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. *J Bone Miner Res* **13**: 1827-34.
 - 9) Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Orimo H, Suzuki T, Nakamura H, Orimo H, Hosoi T (2005) Functional analysis of the single nucleotide polymorphism (787 T>C) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with BMD. *J Bone Miner Res* **20**: 773-82.
 - 10) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会 (2011) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011年版. ライフサイエンス出版, 東京.
 - 11) Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kobayashi K, Kanai T, Umeshita K, Endoh W, Mori T (1991) The effects of vitamin K on the generation of des-gamma-carboxy prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* **86**: 339-45.
 - 12) Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JC (2004) Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: The rotterdam study. *J Nutr* **134**: 3100-5.
 - 13) Sogabe N, Maruyama R, Hosoi T, Goseki-Sone M (2007) Enhancement effects of vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**: 219-24.
 - 14) Haraikawa M, Sogabe N, Tanabe R, Hosoi T, Goseki-Sone M (2011) Vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression. *J Nutr Sci Vitaminol* **57**: 274-9.
 - 15) Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20**: 470-5.
 - 16) Spayd RW, Bruschi B, Burdick BA, Dappen GM, Eikenberry JN, Esders TW, Figueras J, Goodhue CT, LaRossa DD, Nelson RW, Rand RN, Wu TW (1978) Multilayer film elements for clinical analysis: Applications to representative chemical determinations. *Clin Chem* **24**: 1343-50.
 - 17) Hillel JG (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* **18**: 521-31.
 - 18) Drewes PA (1972) Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin Chim Acta* **39**: 81-8.
 - 19) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751-66.
 - 20) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* **164**: 321-9.
 - 21) Goseki MS, Omi N, Yamamoto A, Oida S, Ezawa I, Sasaki S (1996) Ovariectomy decreases osteogenic activity in rat bone. *J Nutr Sci Vitaminol* **42**: 55-67.
 - 22) Lowe M, Strauss AW, Alpers R, Seetharam S, Alpers DH (1990) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta* **1037**: 170-7.
 - 23) Strom M, Krisinger J, DeLuca HF (1991) Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 299-304.
 - 24) Yeh K, Yeh M, Holt PR, Alpers DH (1994) Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes. *Biochem J* **301**: 893-9.
 - 25) Strom M, Krisinger J, DeLuca HF (1991) Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 299-304.
 - 26) Goseki-Sone M, Oida S, Imura T, Yamamoto A, Matsumoto HN, Omi N, Takeda K, Maruoka Y, Ezawa I, Sasaki S (1996) Expression of mRNA encoding intestinal type alkaline phosphatase in rat liver and its increase by fat-feeding. *Liver* **16**: 358-64.
 - 27) Xie QM, Zhang Y, Mahmood S, Alpers DH (1997) Rat intestinal alkaline phosphatase II messenger RNA is present in duodenal crypt and villus cells. *Gastroenterology* **112**: 376-86.
 - 28) Lamou-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ (1998) Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K₁) in humans. *Am J Clin Nutr* **67**: 1226-31.
 - 29) Sogabe N, Maruyama R, Baba O, Hosoi T, Goseki-Sone M (2011) Effects of long-term vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* **48**: 1036-42.
 - 30) Koivu-Tikkanen TJ, Schurgers LJ, Thijssen HH, Vermeer C (2000) Intestinal, hepatic, and circulating vitamin K levels at low and high intakes of vitamin K in rats. *Br J Nutr* **83**: 185-90.
 - 31) Schurgers LJ, Vermeer C (2002) Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* **1570**: 27-32.
 - 32) Goseki-Sone M, Sogabe N, Nakano T, Tanabe R,

- Haraikawa M, Alpers DH, Komoda T (2010) Expression of intestinal-type alkaline phosphatase mRNA in liver of Akp 3 knockout mice. *J Electrophoresis* **54**: 27-32.
- 33) Vieira-Coelho MA, Hussain T, Kansra V, Serrao MP, Guimaraes JT, Pestana M, Soares-Da-Silva P, Lokhandwala MF (1999) Aging, high salt intake, and renal dopaminergic activity in fischer 344 rats. *Hypertension* **34**: 666-72.
- 34) 祓川摩有, 曾我部夏子, 田辺里枝子, 五関-曾根正江 (2012) マウスにおける脂質経口投与によるアルカリホスファターゼ活性の経時的変化について. 日本女子大学大学院紀要 家政学研究科・人間生活学研究科 **18**, 61-7.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **68**: 217-223 (2015)

Research Note

Effect of Oral Administration of Vitamin K₁ or K₂ on Alkaline Phosphatase Activity in Rats

Mayu Haraikawa,^{1,2} Natsuko Sogabe,³ Rieko Tanabe,¹ and Masae Goseki-Sone^{*.1}

(Received April 21, 2015; Accepted June 10, 2015)

Summary: Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes a variety of monophosphate esters into inorganic acid and alcohol at a high optimum pH (pH 8-10). Intestinal ALP activity is known to be increased by oil administration, but little is known about its physiological function. In the present study, we examined the effect of oral administration of vitamin K₁ or K₂ on alkaline phosphatase activity in rats. Male Sprague Dawley rats were orally administered 0.2 mL of a solution of PK (PK group) or MK-4 (MK group). Just before (0 hours) and after (1.5, 3.0, or 4.5 h) oral administration, we obtained samples from the intestine, liver, and kidney. It was found that in the PK and MK groups, the levels of ALP activity in the duodenum and upper ileum were increased significantly after oral administration. However, there were no significant differences in ALP-specific activities in the liver or kidney after oral administration of vitamin K. These results suggest that oral administration of PK and MK-4 induces intestinal ALP activity.

Key words: alkaline phosphatase, vitamin K₁, vitamin K₂, rat, intestine

* Corresponding author (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ Division of Nutrition, Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Sciences and Design, Japan Women's University, 2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

² Department of Child Studies, Faculty of Child Studies, Seitoku University, 550 Iwase, Matsudo, Chiba 271-8555, Japan

³ Department of Health and Nutrition Sciences, Faculty of Human Health, Komazawa Women's University, 238 Sakahama, Inagi, Tokyo 206-8511, Japan