

研 究

周産期のホルスタイン種乳牛に対するビタミンK3 給与が初乳中IgG濃度に与える影響

黒岩朋子^{1,2)}, 大谷喜永³⁾, 小原嘉昭³⁾, 寺田文典³⁾, 渡邊きみか⁴⁾, 白川仁⁴⁾,
駒井三千夫⁴⁾, 佐藤洋^{1,5)}, 佐藤繁^{1,5)}, 一條俊浩^{5,*)}

- 1) 岩手大学農学部 獣医学研究科, 岩手県盛岡市
- 2) 宮城県農業共済組合 県北家畜診療センター, 宮城県登米市迫町
- 3) 明治飼糧㈱ 水戸研究牧場, 茨城県水戸市
- 4) 東北大学大学院農学研究科 栄養学研究室, 宮城県仙台市
- 5) 岩手大学農学部 共同獣医学科, 岩手県盛岡市

要 約

周産期の乳牛にビタミンK3を添加給与し、分娩後3日目における乳汁中の免疫関連物質、血液中の酸化ストレス指標、並びに血液と乳汁のVK1濃度およびメナキノン4 (MK-4) 濃度に与える影響を評価した。40頭の臨床的に健康な乾乳期のホルスタイン種乳牛を用い、21頭をVK3給与群、残りの19頭を対照群とした。VK3給与群には分娩予定21日前から分娩後7日まで1日5gのメナジオン亜硫酸ナトリウム (VK3として50mg/日/頭) をトップドレスで添加給与した。VK3給与群は対照群と比較して、分娩後3日目における血漿および乳中のMK-4濃度が有意に高値を示した。さらに、VK3給与区において乳中免疫グロブリンG (IgG) 濃度が有意に高値を示し、またNAGase活性が高い傾向が認められた。本調査により、周産期乳牛へのVK3給与はIgGおよびMK-4含有量の高い良質な初乳の生産に寄与する可能性が示唆された。

キーワード：周産期乳牛、初乳、ビタミンK3、メナキノン4、免疫グロブリンG

初乳は子牛が最初に摂取する重要な免疫物質であり、免疫グロブリン (Ig) による受動免疫は新生子牛の生存と健全な発育のために必要不可欠なものである¹⁾。特に免疫グロブリンG (IgG) は反芻動物の乳汁に含まれている免疫グロブリンの中で主要なものである²⁾。しかしながら、周産期の乳牛においては血清中IgG濃度の減少がみられること³⁾や、末梢リンパ球の幼若化が減少することが報告されている⁴⁾。また周産期には、酸化ストレスが亢進する結果として免疫機能が低下すること、およびその結果として乳房炎等の周産期疾患にり患しやすくなること⁵⁾が報告されている。そのため、免疫機能を維持

し、十分なIgGを含有した高品質の初乳を生産するためには適正な管理方法が必要である。

N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ (NAGase) は細胞のライソゾームに含まれる加水分解酵素であり、細菌の細胞壁構成成分であるN-アセチル-β-D-グルコサミドを分解する。ラクトフェリンは多様な機能を有する鉄結合性糖タンパクであり、免疫調節作用や、細菌、真菌、ウイルス等の感染防御反応においても重要な役割を担っている。従って、周産期には生理活性物質等の給与によりNAGaseやラクトフェリンのような初乳中の免疫関連物質のレベルを上げることが良質な初乳生産およ

び感染症予防のために有用と考えられる。

ビタミンK (VK) は脂溶性ビタミンの一つである。VKは血液凝固の重要な因子であり⁶⁾、四つの血液凝固因子(第II, 第VII, 第IX, および第X因子)の合成に必要である。VKは植物由来のVK1 (phylloquinone), 細菌由来のVK2 (menaquinones : MK), および化学合成またはMK-4合成の中間物質としてのVK3 (menadione) からなる。MKは側鎖の長さによって複数のサブファミリーを形成しており、側鎖を形成するプレニル基の数に応じてMK-nのように表記される。動物体内に最も高濃度に存在し、様々な生理活性を有するのはMK-4と考えられている。一方、側鎖の長いMK (MK-5 から MK-13) は細菌によって合成される⁷⁾。飼料から摂取されたVK1は体内でMK-4に変換され⁸⁾、様々な生理活性を発揮する⁹⁾。VKはVK依存性Gla蛋白を介して、血液凝固能の制御の他に骨代謝や動脈硬化予防、および細胞増殖制御など多様な生理代謝に関与している¹⁰⁻¹²⁾。さらに、VKは抗炎症作用にも関連していることが報告されている¹³⁾。

β カロテン、ビタミンA、および α トコフェロールなどの脂溶性ビタミンには免疫賦活作用があることが報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。反芻動物は餌となる植物からVK1を摂取するほか、ルーメン内微生物によってVK2が合成されるため、反芻動物においてVKが欠乏することは稀であると考えられており、VKに関する研究は少ない。しかしながら、近年、Bair¹⁸⁾によってMK-4が泌乳期乳牛において末梢血リンパ球の幼若化を促進することが報告され、免疫機能を活性化する可能性が示唆された。VKの摂取量を増やすことは、乳牛の健全な飼養管理において有益であるかもしれない。我々の知る限り、周産期乳牛に対するVK3経口給与による効果を検証した報告は見当たらない。本研究では、周産期の乳牛にVK3製剤を経口給与し、分娩後3日目における乳汁中の免疫関連物質、血液中の酸化ストレス指標、並びに血液と乳汁のVK1濃度およびメナキノン4 (MK-4)濃度に与える影響を評価した。

材料と方法

供試動物と試験計画

宮城県内の4戸の農場で飼養されている臨床的に健康な周産期のホルスタイン-フリージアン種乳牛40頭を用いた(表1)。いずれの農場も繫養方法はタイストール形式であり、飼料は一日に2回、乾物として6~8kgを給餌、水は自由飲水であった。飼料内容および充足率は表2に示した。40頭中、ランダムに選抜した21頭をVK3給与群とし、残りの19頭を対照群とした(表1)。各群のプロファイルは表3に示した。体重、産次およびボディコンディションスコア (Body Condition Score ; BCS) に有意な差は無かった。(VK3給与群vs対照群 : $640 \pm 6.83\text{kg}$ vs $650 \pm 6.87\text{kg}$)。産次 (VK3給与群 vs 対照群 ; 1.94 ± 0.31 vs 2.00 ± 0.25)、およびBCS (VK3給与群vs対照群 : 2.98 ± 0.04 vs 2.93 ± 0.08)。VK3給与群には、分娩予定の21日前から分娩後7日目まで、メナジオン亜硫酸水素ナトリウム(1% VK3含有、コーキン化学株式会社、大阪) 5g (VK3として50/day/head) を餌に振りかけるトップドレスで添加給与した¹⁸⁾。残りの19頭は非給与の対照群とした。分娩後3日目に採血と採乳を行い、全血凝固時間、血漿中および乳汁中のVK1濃度、MK-4濃度、IgG濃度、ラクトフェリン、NAGase活性および血乳の有無を調査した。なお、乳汁採取時に目視およびCalifornia Mastitis Test (CMT) 変法 (PLT, ZENOAQ Co., 福島) により乳房炎でないことを確認した。すべての試験は、宮城県農業共済組合のアニマルウェルフェア推進委員会に審査・承認(承認番号を記載)され、同委員会が定めるガイドラインに基づいて実施した。

表1 各農場における飼養頭数、平均乳量、乾乳期間および試験動物頭数

	A	B	C	D
飼養頭数 (n)	14	20	40	38
平均乳量 (kg)	12000	8000	11000	13000
乾乳期間 (days)	60	60	60	60
試験動物 (n)				
対照群	3	5	3	8
VK3給与群	5	4	4	8

表2 各農場における飼料設計の詳細

	A	B	C	D
組成(乾物中%)				
濃厚飼料	15.4	18.9	19.3	13.0
ビートパルプ	15.4	18.9	0.0	0.0
ヘイキューブ	23.4	0.0	0.0	0.0
チモシーヘイ	15.3	0.0	0.0	33.6
オーツヘイ	7.6	0.0	0.0	0.0
ワラ	23.0	0.0	0.0	0.0
バミューダストロー	0.0	0.0	0.0	53.4
アルファルファヘイ	0.0	9.1	0.0	0.0
グラスサイレージ	0.0	53.1	67.8	0.0
コーンサイレージ	0.0	0.0	12.8	0.0
化学組成(乾物中%)				
可消化養分総量(TDN)	63.5	65.7	58.4	60.3
粗タンパク質(CP)	13.5	16.0	10.1	9.2
総繊維(NDF)	55.5	47.3	48.3	59.3
酸性デタージェント繊維(ADF)	31.9	27.2	35.8	30.0
デンプン	7.41	5.80	7.27	8.94
カルシウム	0.7	0.7	0.5	0.4
リン	0.2	0.3	0.3	0.2
栄養充足率(%)				
乾物(DM)	101	87	105	127
可消化養分総量(TDN)	102	90	96	102
粗タンパク質(CP)	119	121	92	100

血液サンプルの採取

血液は頸静脈からヘパリン添加真空採血管（ベノジェクトII VP-H100K, テルモ株式会社, 東京）および5 mLのプラスチック注射筒（テルモシリンジ SS-05SZ, テルモ株式会社）を用いて採取した。血液採取後ヘパリン添加真空採血管はアルミホイルで遮光して氷水中で保管し、2時間以内に遠心分離（1,895×g×10分）を行い、血漿を得た。得られた血漿はマイクロチューブ（遮光プラスチックマイクロチューブT7100BK, アズワン, 大阪）に分注して-80℃で冷凍保存した。

乳汁サンプルの採取

採乳は朝の搾乳時に行った。乳汁は分房ごとにス

ピッツ管（滅菌Fスピッツ白FB2100, 栄研化学株式会社）に採取した。採取後はアルミホイルで遮光し、氷水中で保管した。乳汁の一部はマイクロチューブ（遮光プラスチックマイクロチューブT7100BK, アズワン）に分注して-80℃で冷凍保管した。乳中N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAGase）活性は分房ごとに測定し、4分房の平均値を算出した。その他の項目については、4分房の乳汁を合乳として測定した。

化学分析方法

血漿および乳中のVK1濃度およびMK-4濃度は、定法（抽出法の論文があればここに入れる）に従いサンプルから抽出したのち、蛍光高速液体クロマトグラフィー（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA）を用いて既存の方法¹⁹⁾により測定した。乳汁中IgG濃度およびラクトフェリン濃度はそれぞれ市販測定キット（IgG: 牛 IgG エライザ定量キット, ラクトフェリン: 牛ラクトフェリン定量エライザキット, Bethyl Laboratories, Montgomery, USA）を用いてELISA法により測定した。乳汁中のNAGase活性は小原らの方法²⁰⁾により測定した。血漿および乳中の酸化ストレス指標であるチオバルビツール酸（TBARS）はキット（TBARS アッセイキット, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA）を用いて、抗酸化力の指標である1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl（DPPH）ラジカル消去活性はLiら²¹⁾の方法により測定した。

統計解析

得られた結果は、平均値±標準誤差で記載した。統計解析にはJMP 15.2.1（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いた。血液および乳中の各検査項目の比

表3 VK3給与群および対象群における産次数, 体重, BCSおよびVK3給与日数

群	n	産次数	体重	BCS	VK3 給与日数
対照群	19	2.00 ± 0.25	650 ± 6.87	2.93 ± 0.08	—
VK3給与群	21	1.94 ± 0.31	640 ± 6.83	2.98 ± 0.04	28.9 ± 1.39
<i>p</i> -value		NS	NS	NS	—

較については予め等分散性を確認するためF検定を実施したのち、分散が等しい場合にはStudentのt検定、分散が異なる場合にはWelchのt検定を行った。いずれも $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

供試動物

分娩予定日は最終人工授精月日から予測した。実際の分娩日との差は給与群で-7から11日、対照群で-13から11日であった。そのため、給与群における

VK3給与日数は 28.9 ± 1.39 日（平均 \pm SEM）であった。分娩からサンプリングまでの経過時間（対照群： 50.6 ± 1.83 時間、VK3給与群： 50.8 ± 0.95 時間、 $P = 0.93$ ）および搾乳回数（対照群： 4.0 ± 0.07 回、VK3給与群： 3.90 ± 0.006 回、 $P = 0.35$ ）に差は認められなかった。

乳中IgG濃度（対照群 vs. VK3給与群： 2.73 ± 0.51 vs. 7.91 ± 2.13 、 $P = 0.03$ ）はVK3給与群で有意に高値を示した。乳中NAGase活性（対照群 vs. VK3給与群： 24.6 ± 4.84 vs. 55.9 ± 14.3 、 $P = 0.05$ ）はVK3給与群で高い傾向が認められた。乳中ラクトフェリン

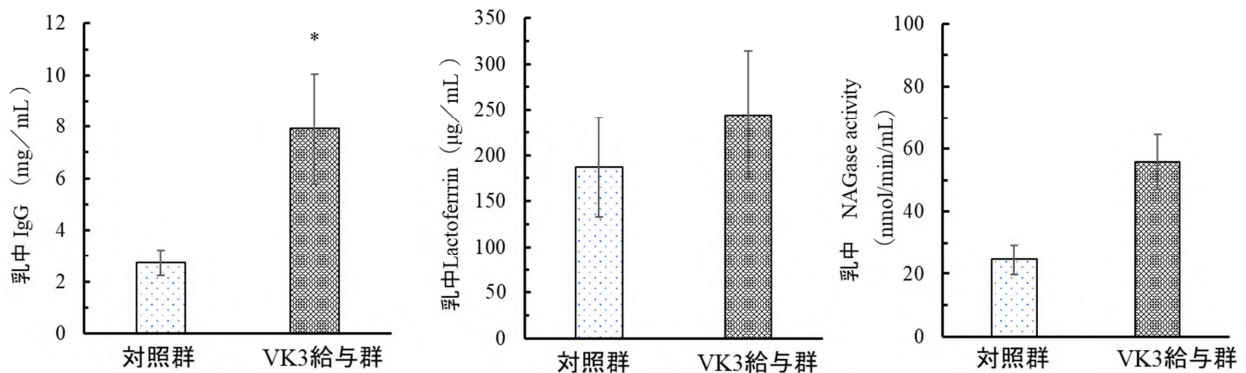


図1 分娩後3日目における乳中IgG濃度、ラクトフェリン濃度およびNAGase活性(* $p < 0.05$)

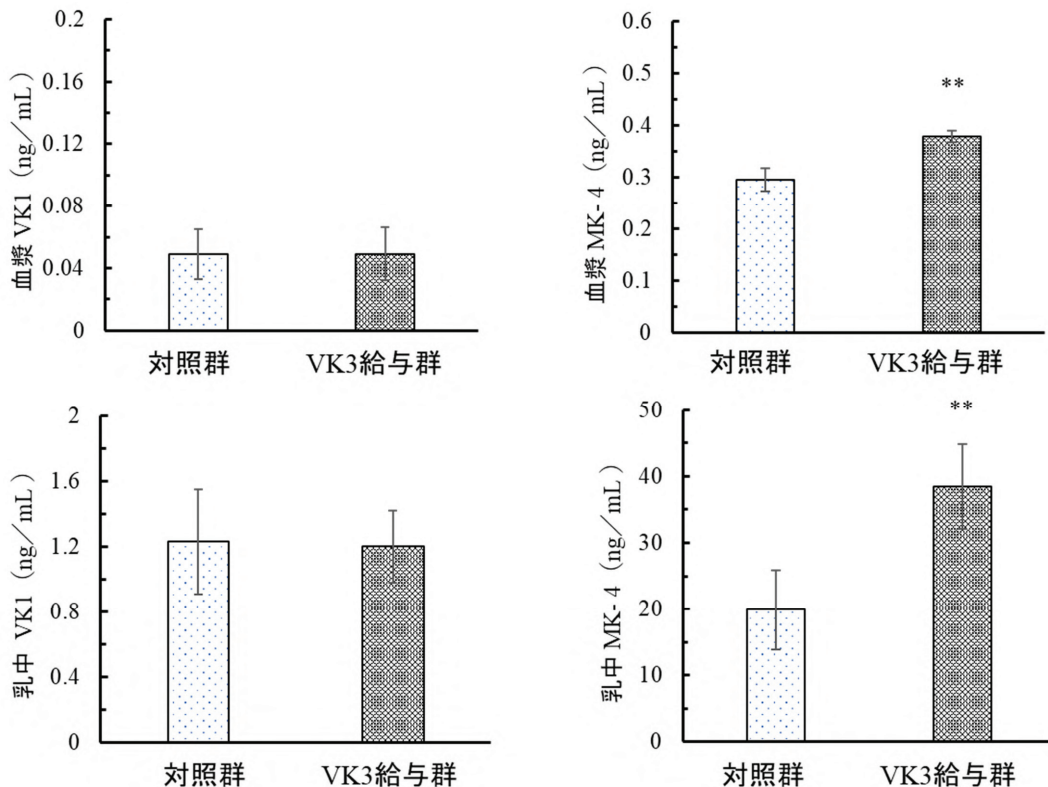


図2 分娩後3日目における血漿中および乳中VK1およびMK-4濃度(** $p < 0.01$)

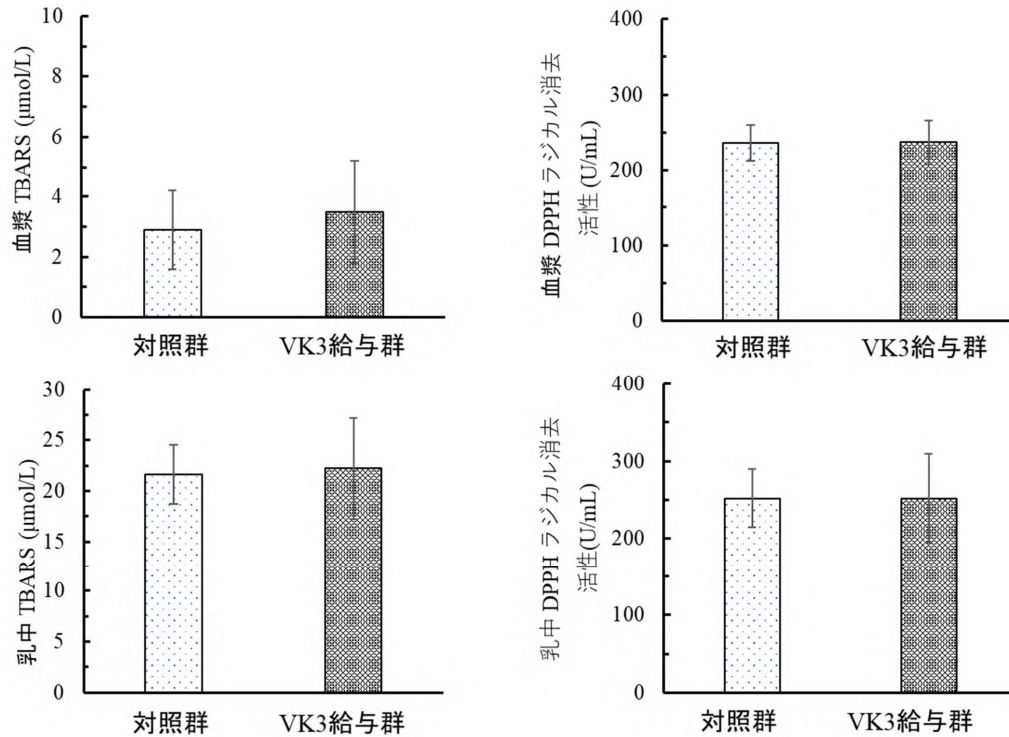


図3 分娩後3日目における酸化ストレス指標

濃度 (対照群 vs. VK3給与群: 187 ± 53.9 vs. 244 ± 70.0 , $P = 0.53$) についてはVK3の添加による効果は認められなかった。

血漿中VK1濃度 (対照群 vs. VK3給与群: 0.05 ± 0.02 vs. 0.05 ± 0.02 , $P = 0.99$) および乳中VK1濃度 (対照群 vs. VK3給与群: 1.22 ± 0.32 vs. 1.20 ± 0.22 , $P = 0.94$) はVK3の添加による差は認められなかった。一方、血漿MK-4濃度 (対照群 vs. VK3給与群: 0.29 ± 0.02 vs. 0.38 ± 0.01 , $P = 0.002$) および乳中MK-4濃度 (対照群 vs. VK3給与群: 19.9 ± 5.99 vs. 38.5 ± 6.39 , $P = 0.04$) はVK3給与群において有意に高値を示した。

酸化ストレス

血漿TBARS (対照群 vs. VK3給与群: 2.94 ± 0.30 vs. 3.49 ± 0.37 , $P = 0.26$) および乳中TBARS (対照群 vs. VK3給与群: 21.6 ± 0.69 vs. 22.2 ± 0.11 , vs. 0.67) についてはVK3添加による差は認められなかった (図3)。同様に、血漿DPPHラジカル消去活性 (対照群 vs. VK3給与群: 236 ± 5.43 vs. 236 ± 6.17 , vs. 0.96) および乳中DPPHラジカル消去活性 (対照群 vs. VK3給与群: 252 ± 8.60 vs. 257 ± 12.8 , vs.

$= 0.77$) についてもVK3添加による効果は認められなかった (図3)。

考察

本研究では、周産期乳牛にVK3を添加給与し、乳中IgG濃度、NAGase活性、ラクトフェリン濃度、血漿中および乳中のVK1およびMK-4濃度、並びに酸化ストレスに対する効果を調査した。乳中IgG濃度は対照群に比べてVK3給与群において有意に高値を示した (図1)。血漿および乳中MK-4濃度はいずれも、VK3給与群において有意に高値を示した。一方で、VK1濃度には差が認められなかった (図2) ことから、VK3給与群における高レベルのMK-4は飼料中のVK1に由来するものではなく、VK3から代謝されたものであると考えられた。体内に入ったVK1は2通りの経路でMK-4に変換されると考えられている。一つは、VK1のフィチル側鎖の不飽和によりMK-4が生成される経路である。もう一つは、フィチル側鎖がナフトキノン環から解離して側鎖を持たないVK3を形成した後、メバロン酸経路由来のゲラニルゲラニル基が導入され、プレニルトランスフェラー

ぜであるUBIAD1 (UbiA prenyltransferase domain-containing¹⁾)の作用を受けてMK-4に変換される経路である^{22,23)}。UBIAD1は乳腺を含む複数の組織に発現しており、肝臓、骨組織、脳、性腺および唾液腺等の多くの組織においてVKがMK-4に変換されることが報告されている²⁴⁾。このことから、VK3給与による血漿および乳中MK-4濃度の増加は、吸収されたVK3からMK-4への変換によるものと考えられる。本研究において、VK3給与により乳中MK-4濃度は有意に増加した。このことから、泌乳牛の乳腺組織におけるMK-4の変換が増加したことが考えられる。VK3は容易にMK-4に変換されるVKのひとつであり、乳牛の乳腺はMK-4変換生成を担う重要な組織のひとつであることが示唆された。

乳牛において、初乳中のIgG濃度は分娩直後が最も高く、その後7～14日かけて常乳のレベルまで漸減することが報告されている²⁵⁾。分娩後3日目のIgG濃度は分娩直後の初乳中IgG濃度を反映していると考えられる。血漿中IgGは乳腺を介して乳中に移行するが²⁶⁾、VK3給与群においてはIgGの産生が増加していた可能性が考えられた。

Ohsakiら¹³⁾は、ラットにおいてMK-4が免疫反応を抑制する機能を有する可能性を報告している。一方、Baiら¹⁸⁾は泌乳牛においてMK-4がリンパ球の幼若化作用を高め、免疫反応を促進する作用を有することを報告している。Hatanaka²⁸⁾はヒト末梢血単核細胞において、高用量(10-100 μ M)のVK3感作がインターロイキン6(IL-6)を含む複数のサイトカイン産生を抑制する一方、低用量(0.1 μ M)のVK3処理はIL-6の産生を増加させることを報告している。これらの報告から、MK-4は動物種あるいは暴露濃度の違いにより、免疫反応に異なる作用を及ぼす可能性が考えられる。本研究において、周産期乳牛にVK3を給与したことで血漿および乳中のMK-4濃度が増加、およびIgGの産生が促進された可能性が考えられる。しかしながら、今回の調査では抗体産生細胞または抗体産生に関連するサイトカインの測定を行っていなかった。VK3の血漿IgGに対する効果および乳中IgGレベルが増加したメカニズムを明かにするためには、さらなる検討が必要である。

NAGase活性はVK3給与群で高い傾向が認められ

たが、有意ではなかった(図3)。乳牛が乳房炎に罹患した際、好中球が細菌を貪食した後にNAGaseが細菌を分解する効果を発揮することが知られている。NAGase活性は乳房炎罹患時に増加する²⁷⁾ほか、分娩直後には正常な分房においても体細胞の増加に伴って著しく上昇することが報告されている²⁹⁾。SordilloとAitken⁵⁾は、乳牛において酸化ストレスが健康や免疫機能に影響を与えることを報告している。そのため、VK3給与は酸化ストレスを軽減することによって免疫機能を活性化する可能性が考えられた。しかしながら、本研究ではVK3給与による酸化ストレス軽減効果は認められなかった。

本研究において、周産期乳牛に対するVK3給与は血漿および乳中のMK-4濃度を高め、乳中のIgG濃度を上昇させる効果が認められた。初乳から摂取するIgGは新生子牛の感染症予防において重要な物質である。そのため、VK3給与は高濃度のIgGを含有する良質な初乳を生産させ、新生子牛の健全な成長に寄与するものと考えられた。

謝 辞

本研究に際し、貴重なサンプルを提供して頂きました宮城県内の畜産農家の皆様、日々多忙を極める中で採材にご協力を頂きましたNOSAI宮城県北家畜診療センターの皆様、厚く御礼申し上げます。また、検体処理および分析にご尽力頂きました、明治飼糧株式会社水戸研究所の皆様、心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Blum JW : Nutritional physiology of neonatal calves, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 1-11 (2006)
- 2) Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hogkinson A, Wheeler TT : Immune components of bovine colostrum and milk, *Journal of Animal Science*, 87, 3-9 (2009)
- 3) Ishikawa H: Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves, *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 49, 469-475 (1987)
- 4) Kashiwazaki Y, Maede Y, Namioka S: Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period,

- Nihon Juigaku Zasshi, 47, 337-339 (1985)
- 5) Sordillo LM, Aitken SL: Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 104-109 (2009)
 - 6) Dam H, Schönheyder F: The occurrence and chemical nature of vitamin K, *The Biochemical Journal*, 30, 897-901 (1936)
 - 7) Walther B, Karl JP, Booth SL, Boyaval P: Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements, *Advances in Nutrition*, 4, 463-473 (2013)
 - 8) 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, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 11270-11279 (2008)
 - 9) Thijssen HHW, Driessens-Reijnders MJ: Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phyloquinone is a source of tissue menaquinone-4, *British Journal of Nutrition*, 72, 415-425 (1994)
 - 10) Shearer MJ: Vitamin K, *Lancet*, 345, 229-234 (1995)
 - 11) Simes DC, Viegas CSB, Araújo N, Marreiros C: Vitamin K as a powerful micronutrient in aging and age-related diseases: Pros and cons from clinical studies, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4150 (2019)
 - 12) Vermeer CV: Vitamin K: the effect on health beyond coagulation—an overview, *Food and Nutrition Research*, 56, 5329 (2012)
 - 13) Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, Komai M: Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α/β phosphorylation, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 1120-1126 (2010)
 - 14) Sato S, Suzuki T, Konno K, Ono H, Ichijo T, Takahashi T: Effect of E-SE injection on lymphocyte blastogenesis in cows at periparturient period, *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 49, 619-622 (1996)
 - 15) Taniguchi S, Wang M, Ikeda S, Yoshioka H, Nagase H, Kitamura S, Kume S: Relationships between immunoglobulin M and immunoglobulin G or A in colostrum of Japanese Black multiparous cows, *Animal Science Journal*, 87, 536-540 (2016)
 - 16) Wang M, Ikeda S, Yoshioka H, Nagase H, Kitamura S, Itoyama E, Kume S: Relationships between immunoglobulin and fat-soluble vitamins in colostrum of Japanese Black multiparous cows, *Animal Science Journal*, 86, 673-678 (2015)
 - 17) Weiss WP, Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL: Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 80, 1728-1737 (1997)
 - 18) Bai H, Hiura H, Obara Y, Kawahara K, Takahashi M Short communication: Menaquinone-4 (vitamin K2) induces proliferation responses in bovine peripheral blood mononuclear cells, *Journal of Dairy Science*, 103, 7531-7534 (2020)
 - 19) Sultana H, Watanabe K, Rana MM, Takashima R, Ohashi A, Komai M, Shirakawa H: Effects of vitamin K₂ on the expression of genes involved in bile acid synthesis and glucose homeostasis in mice with humanized PXR, *Nutrients*, 10, 982 (2018)
 - 20) Obara Y, Komatsu M: Relationship between N-acetyl- β -D-Glucosaminidase activity and cell count, lactose, chloride, or lactoferrin in cow milk, *Journal of Dairy Science*, 67, 1043-1046 (1984)
 - 21) Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T: Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk, *Nutrition*, 25, 105-114 (2009)
 - 22) Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Okano T: Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phyloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 33071-33080 (2013)
 - 23) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okano T: Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme, *Nature*, 468, 117-121 (2010)
 - 24) Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA: Tissue phyloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender, *The Journal of Nutrition*, 129, 1039-1044 (1999)
 - 25) Hodate K, Johke T, Ohmori S, Irie T, Mori M, Ikeda T: Changes of the concentration of the milk serum proteins in dairy cows after parturition, *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 49, 588-593 (1978)
 - 26) Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR: Immune components of colostrum and milk—a historical perspective, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12, 237-247 (2007)
 - 27) Kitchen BJ, Kwee WS, Middleton G, Andrews RJ: Relationship between the level of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens, *Journal of Dairy Research*, 51, 11-16 (1984)
 - 28) Hatanaka H, Ishizawa H, Nakamura Y, Tadokoro H, Tanaka S, Onda K, Sugiyama K, Hirano T: Effects of vitamin K3 and K5 on proliferation, cytokine production, and regulatory T cell-frequency in human peripheral-blood mononuclear cells, *Life Sci.*, 99, 61-68 (2014)
 - 29) Chagunda MGT, Larsen T, Bjerring M, Ingvarsen KL: L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis, *Journal of Dairy Research*, 73, 431-440 (2006)