

ウマに対するメナキノ-7 補給が血漿中メナキノ-7 濃度に及ぼす影響

寺地 智弘¹⁾, 井上 喜信^{2,3)}, 蘆原 永敏²⁾,
 小林 光紀⁴⁾, 安藤 邦英⁴⁾, 松井 徹¹⁾
 (¹⁾京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻*, ²⁾日本中央競馬会**,
³⁾現鳥取県庁***, ⁴⁾軽種馬育成調教センター****)

Plasma vitamin K concentration in horse supplemented with menaquinone-7

Tomohiro TERACHI¹⁾, Yoshinobu INOUE^{2,3)}, Nagatoshi ASHIHARA²⁾,
 Mitunori KOBAYASHI⁴⁾, Kunihide ANDO⁴⁾ and Tohru MATSUI¹⁾

¹⁾Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

²⁾Japan Racing Association ³⁾Present address, Prefectural Government of Tottori

⁴⁾Bloodhorse Training Center

Summary

It is generally considered that phylloquinone in forage along with menaquinones synthesized by intestinal microbes meet the requirement of horses. We investigated the concentrations of fecal and plasma menaquinone-7 (MK-7) and the effect of MK-7 supplementation on plasma vitamin K concentration in adult horses.

Fecal and plasma samples were collected from twenty Thoroughbred horses aged 9.0 ± 2.9 yr before MK-7 supplementation, and MK-7 concentrations in feces and plasma were determined. Subsequently the horses were allocated to 4 groups ($n = 5$) and each group was given MK-7 at 20 $\mu\text{mol/d}$, 40 $\mu\text{mol/d}$, 60 $\mu\text{mol/d}$, or no MK-7 supplement for 7 d. Plasma samples were collected before feeding, and 2, 4, and 8 h after feeding on d 7, and plasma concentrations of menaquinone-7 were determined (Experiment 2). Although fecal MK-7 concentration can be measured in all horses without supplying vitamin K, plasma MK-7 concentration was extremely low and was under the measurement limit in some horses. Additionally, the relationship between plasma concentration and fecal excretion of MK-7 was not observed. We suggest that MK-7 produced by intestinal bacteria is not important for horses. Plasma MK-7 concentration was higher in the 40 $\mu\text{mol/d}$ group ($P < 0.001$) and the 60 $\mu\text{mol/d}$ group ($P < 0.001$) than in the control group through the experiment. Further, plasma MK-7 concentration was not changed after feeding in the 40 $\mu\text{mol/d}$ group; plasma MK-7 concentration was stably high in this group. These results suggest that MK-7 is a good source of vitamin K for bone health in horses because the supplementation of MK-7 increases its plasma concentration greatly and continuously.

ビタミン K は、その構造からビタミン K₁ (フィロキノ-ン, PK), ビタミン K₂ (メナキノ-ン, MK), ビタミン K₃ (メナジオン, MD) に分類される。PK は植物が、多種の MK 類は微生物が生産するビタミン K である。また、吸収された PK は動物体内で MD を介して MK-4 に変換されることが報告されている¹⁾。

ビタミン K の機能として、血液凝固機能、骨代謝調節機能が知られているが、近年の培養細胞を用いた研究により、MK 類の一つである MK-4 は PK および MD よりもヒト骨芽細胞の分化促進作用や、マウス破骨細胞分化抑制

作用がはるかに強いことが報告されている^{2,3)}。また、MK-4 はオーファンレセプターである核内転写因子の SXR を活性化し、骨形成を促進すること、MK-4 がプロテインキナーゼ A の活性を介して骨芽細胞に作用することも報告されている^{4,5)}。MK-4 同様に MK-7 もまた、MC3T3-E1 骨芽細胞において、骨形成を促進することや、骨形成マーカーの発現を調節していること、BMP2 の産生を促進することにより、遺伝子発現を調節することが報告されており⁶⁻⁸⁾、これらの報告は、MK 類は骨における活性型ビタミン K であることを示唆している。

*所在地：京都府京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

**所在地：北海道浦河郡浦河町西舎535-13 (〒057-0171)

***所在地：鳥取県鳥取市東町1-220 (〒680-8570)

****所在地：北海道浦河郡浦河町西舎535-13 (〒057-0171)

ウマでは、生草や良質な乾草に含まれるPKおよび腸管内の微生物によって合成されるMK類でビタミンK要求量は満たされているとされている⁹⁾。この根拠としては、正常なウマではビタミンK欠乏に起因する出血が見いだされていないことが挙げられている¹⁰⁾。しかし、ヒトにおいて正常な骨代謝の維持には正常な血液凝固よりも多くのビタミンKが必要であることが報告されており¹¹⁾、ウマにおいてもビタミンK不足によって、骨代謝が変化する危険性も示唆されている¹⁰⁾。

ビタミンKは胆汁酸とリパーゼなどの膵酵素の存在下で小腸から吸収され、リンパ系に移行する¹²⁾。そのため、大腸で合成されるMK類の吸収は一般に少なく、食糞をしない動物ではその利用は限られているとされている¹³⁾。実際にGroenen-van Doorenら¹⁴⁾は、ラットにおいて、PK、MK-4あるいはMK-9を経口投与した場合と大腸に直接投与した場合の吸収性の違いを検討し、大腸内投与では、経口投与した場合の0.2から2%しか吸収されないことを報告している。

我々は、成馬の血漿中MK-4濃度が低いこと、PK、MK-4あるいはMDを成馬に補給すると、MDの補給によってのみ血漿中MK-4濃度が上昇することを明らかにした¹⁵⁾。これらの結果から、ウマでは、他動物種と比べ、PKからMDへの変換効率が低く、飼料摂取によりPKは要求量を満たしていても、骨における活性型ビタミンKと考えられるMK-4の血漿中濃度は低いことが示唆された。

Schurgersら¹⁶⁾は、ヒトではPKと比べMK-7の血漿中濃度上昇は長時間維持されることを示し、吸収されたMK-7は肝臓に取り込まれた後、PKおよびMK-4とは異なり、肝臓から放出されやすいことを推察している¹⁷⁾。こうした血漿中の滞留時間の長さから、ヒトにおいては、ビタミンKサプリメントとして、MK-7が注目されている。また、Raeら¹⁸⁾は、馬糞から*Bacillus cereus*を検出しているが、*Bacillus cereus*を含む多くの*Bacillus*属はMK-7を合成することが報告されている¹⁹⁾。

本試験では、糞中に排泄されるMK-7量と血漿中MK-7濃度の比較を行うとともに、ウマに対するMK-7補給の効果を検討した。

実験方法

本試験は日本中央競馬会競走馬総合研究所動物実験倫理委員会の承認の下で行った。

1. 第一試験 糞中MK-7排泄量と血漿中濃度の関係

1) 供試動物と供試飼料

サラブレッド種馬20頭(去勢牡馬(セン馬)14頭、牝馬6頭、年齢 9.0 ± 2.9 歳齢、体重 486.0 ± 28.1 kg)を供試した。これらを午後(12:00~15:00)に3時間、生草の生えていないサンシャインパドックで放牧し、それ以外(15:00~12:00)は個別の厩舎で飼育した。供試馬には、

Table 1. Composition of experimental diet (as-fed basis)

Ingredient, g/kg	
Timothy hay	546.9
Oat grain	227.9
Commercial ration ^{a)}	109.4
Alfalfa hay cube	91.2
Wheat bran	22.8
Sodium chloride	0.9
Calcium carbonate	0.9
Concentration	
DE, Mcal/kg	2.29 ^{b)}
CP, %	10.50 ^{b)}
Phylloquinone, $\mu\text{mol/kg}$	1.92 ^{c)}

a) Power Up Horse II (Keiba Shiryo, Tokyo, Japan; DE, 2.6 Mcal/kg; CP, 14.0%).

b) Calculated value.

c) Analytical Value.

飼料(Table 1)を11 kg/dの割合で、それぞれ朝(8:00)と夕方(17:00)の二度に分けて同量ずつ給与した。チモシー乾草とヘイキューブのPK濃度はそれぞれ1.00 mg/kgDM、3.08 mg/kgDMであった。したがって供試馬は、1日あたり9.54 mg (21.2 μmol)のPKを飼料より摂取していた。一方、飼料中MK-7は検出されなかった。1週間の予備期の後に、朝の給餌直前(8:00)に各ウマから血液と糞を採取した。採血は頸静脈穿刺により行い、採取した血液は遠心分離(2,500×g, 30分間, 4°C)によりヘパリン血漿として、窒素ガス封入後分析まで-20°Cで保存した。飼料は粉碎した後、分析まで室温で保存した。糞は、凍結乾燥した後、分析まで-20°Cで保存した。

2) 分析

血漿中MK-7濃度、飼料中PK濃度およびMK-7濃度の分析は我々の先行研究¹⁵⁾と同様の方法により測定した。糞中MK-7濃度は飼料と同様の方法で測定した。一日あたりの糞排泄量は酸不溶性灰分を指標として算出した。すなわち、飼料および糞中酸不溶性灰分をThoneyら²⁰⁾の方法により測定し、摂取した酸不溶性灰分量と糞中酸不溶性灰濃度から1日当たり排泄量を算出した。糞中MK-7濃度に1日当たり排泄量を乗じることによって、1日当たりの糞中MK-7排泄量を得た。

本試験での血漿中MK-7の測定下限は0.05 nmol/lであった。

2. 第二試験 MK-7補給が血漿中MK-7濃度に及ぼす影響

1) 供試動物と供試飼料

第一試験終了後に、第一試験で供試したウマを、第一試験と同様に飼養した。20頭のウマを、性ならびに平均年齢と体重が揃うように、4区(n=5)に割り当て、各区に、0 $\mu\text{mol/d}$ (対照区)、20 $\mu\text{mol/d}$ 、40 $\mu\text{mol/d}$ 、60 $\mu\text{mol/d}$ のMK-7(J-オイルミルズ、東京)を1週間連続補給した。MK-7はフスマと混合し、窒素ガス封入後、-20°Cで保存し、給与前に同量のフスマと置き換え混合した。

2) 試料採取と分析

補給期最終日の、朝の給餌直前(8:00)、給餌2, 4, 8時間後に採血を行った。採取した血液は遠心分離(2,500×g, 30分間, 4℃)によりヘパリン血漿として、窒素ガス封入後分析まで-20℃で保存した。

血漿中MK-7濃度の分析は第一試験と同様の方法により測定した。

3. 統計処理

第一試験では、血漿中MK-7濃度と糞中MK-7濃度、また血漿中MK-7濃度と糞中MK-7排泄量について一次回帰分析を行った。

第二試験の統計処理はSAS(SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いた。MK-7補給が血漿中MK-7濃度に及ぼす影響をMIXED PROCを用い、各ウマを試験単位とし、同一個体の異なる採血時間の効果を繰り返し測定値とする下の統計モデルにより検定した。

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Treat}_i + \text{Time}_j + (\text{Treat} \times \text{Time})_{ij} + \text{Animal}_{k(i)} + e_{ijk}$$

μ : 全平均, Treat_i : 処理の母数効果($i=4$), Time_j : 時間の母数効果($j=4$), $(\text{Treat} \times \text{Time})_{ij}$: 処理×時間の母数効果, $\text{Animal}_{k(i)}$: 処理に含まれるウマの変量効果($k=5$), e_{ijk} : 残差

同一処理における給餌後変化はCONTRAST optionを用い、一次回帰と二次回帰とで検討した。各処理における1日間最少二乗平均(LSM)の差はLSMEANS optionを用い、Tukeyの多重比較法により検定した。処理と採血時間の交互作用が有意であった場合、同一採血時間における処理区間のLSMの差も、Tukeyの多重比較法により検討した。 $p < 0.05$ を統計的に有意な差とした。なお、測定下限以下であった場合は測定下限の半分の値として計算した。

結果

供試したウマは、いずれも試験期間を通じて、臨床的には異常所見は認められなかった。

1. 第一試験

MK-7を補給されていないウマでは、平均1.8 $\mu\text{mol/d}$ (0.8–4.6 $\mu\text{mol/d}$)のMK-7が糞中に排泄されていると推定された。血漿中MK-7濃度は 0.084 ± 0.014 nmol/l(平均±標準誤差)であり、供試した20頭の内9頭が測定下限以下であった。糞中MK-7濃度ならびにMK-7排泄量は個体間の差が大きく、血漿中MK-7濃度と糞中MK-7濃度、また血漿中MK-7濃度と糞中MK-7排泄量にはいずれも有意な関係は認められなかった(Fig 1, 2)。

2. 第二試験

血漿中MK-7濃度は、60 $\mu\text{mol/d}$ 補給区において給餌4

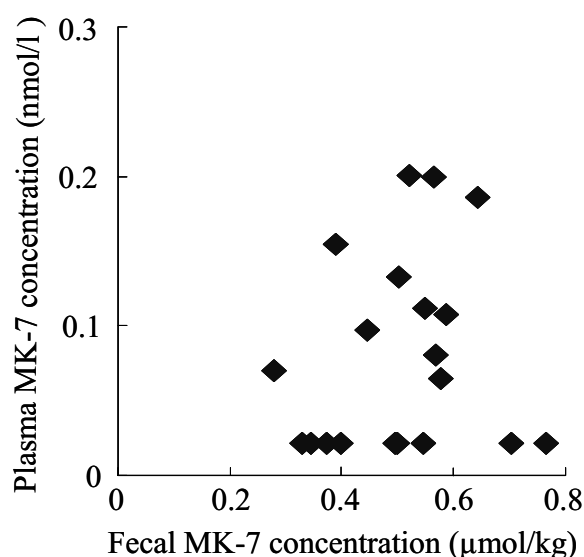


Fig 1 Relationship between plasma and fecal concentrations of menaquinone-7(MK-7) in horses without supplying vitamin K.

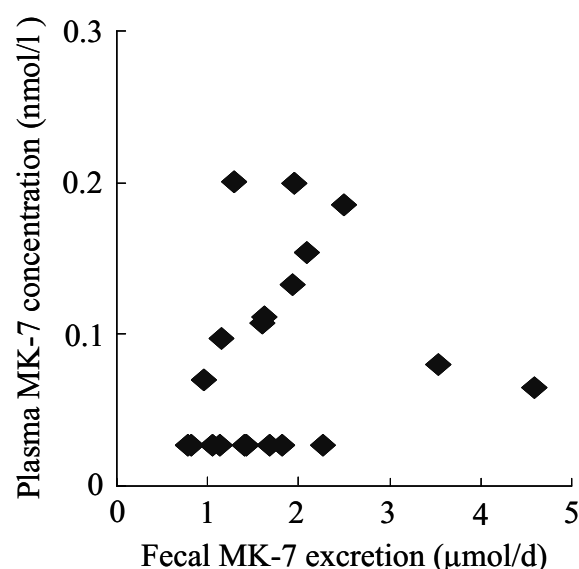


Fig 2 Relationship between plasma concentration and fecal excretion of menaquinone-7 (MK-7) in horses without supplying vitamin K.

時間後をピークに、二次曲線的に変化した($P=0.005$)(Table 2)。一方、それ以外の区では血漿中MK-7濃度に有意な給餌後の経時変化はなかった。

対照区の血漿中MK-7濃度は著しく低い濃度であり、給餌直前、給餌2, 4, 8時間後の血漿中MK-7濃度は、5頭中それぞれ1, 4, 3, 2頭で測定下限を下回った。対照区以外の区の血漿中MK-7濃度は、すべての個体ならびに採血時刻で測定可能であり、40 $\mu\text{mol/d}$ 補給区および60 $\mu\text{mol/d}$ 補給区の血漿中MK-7濃度は、対照区と比べすべての採血時刻で有意に高かった($P < 0.05$)。また、各処理における1日間LSMにおいて、20 $\mu\text{mol/d}$ 補給区は対照区と比較し、MK-7濃度が高い傾向にあった($P=0.07$)。40 $\mu\text{mol/d}$ 補給区および60 $\mu\text{mol/d}$ 補給区では、すべての採血時刻のLSMにおいて、20 $\mu\text{mol/d}$ 補給区と比べても、有意に高

Table 2. Plasma menaquinone-7 concentration (nmol/L) after feeding in horses given the diet supplemented with different amounts of menaquinone-7¹

Dose ²	Time after feeding, h				LSM of treatment ³		P-value	
	0	2	4	8	SEM	Linear	Quadratic	
Control	0.099 ^a (1) ⁴	0.048 ^a (4)	0.057 ^a (3)	0.084 ^a (2)	0.072 ^a	0.011	0.995	0.995
20	0.921 ^a	2.269 ^a	5.016 ^a	2.463 ^a	2.666 ^a	0.284	0.235	0.271
40	4.181 ^b	6.641 ^b	7.194 ^b	5.891 ^b	5.977 ^b	0.757	0.357	0.358
60	3.487 ^b	6.675 ^b	12.796 ^b	7.812 ^b	7.693 ^b	1.105	0.003	0.005

^{a, b} LSM within a column without a common superscript differ (P < 0.05).

¹ Effects of treatment, P < 0.001; time, P = 0.002; treatment and sampling time interaction, P < 0.001 (n = 5)

² Dose of menaquinone-7 (μmol/d).

³ LSM = least squares mean

⁴ Parenthetic number showed sample number under measurement limit.

かった (P < 0.05)。一方、40 μmol/d 補給区と 60 μmol/d 補給区との間に有意な血漿中 MK-7 濃度の差は認められなかった。

考 察

本試験では、MK-7 を摂取していないすべてのウマの糞で MK-7 が認められた。この結果は、ウマの大腸内で MK-7 が合成されていることを示しており、糞中の MK-7 排泄量は、0.8–4.6 μmol/d であるので、少なくともこの値以上の MK-7 が消化管内で合成されていたと考えられる。実際、馬糞からは *Bacillus cereus* が検出されており¹⁸⁾、*B. cereus* を含む多くの *Bacillus* 属は MK-7 を合成することが報告されている¹⁹⁾。糞中 MK-7 濃度ならびに MK-7 排泄量は個体間の差が大きいことから、ウマの消化管内における MK-7 生産量には大きな個体差があることが示唆された。さらに、血漿中 MK-7 が検出されたウマがいたことから、消化管内で合成された MK-7 はウマに利用されていることが明らかになった。一方、血漿中 MK-7 濃度と糞中 MK-7 排泄量には明瞭な関係は認められなかったことから、消化管内で合成された MK-7 の吸収性に大きな個体差があることが示唆された。さらに、血漿中 MK-7 濃度が検出されない場合も認められ、ウマの消化管内で合成されている MK-7 は、血漿中 MK-7 濃度の上昇には不十分な場合がある可能性が示唆された。また、後述するようにウマでは経口的に補給された MK-7 は PK よりも高い効率で吸収されることが考えられる。先行研究において、ビタミン K を補給されていないウマの血漿中 PK 濃度と MK-4 濃度は、それぞれ、0.87 nmol/l、0.125 nmol/l であり、本試験の MK-7 濃度の 0.084 nmol/l を大きく上回っていた。したがって、ウマの消化管内で合成される MK-7 の栄養学的意義は、大きくない可能性がある。Groenen-van Dooren ら¹⁴⁾ は、ウマと同様に大腸で多量の MK 類を合成できるラットにおいて、MK 類は大腸から吸収されにくいことを示唆している。ビタミン K は胆汁酸とリパーゼなどの酵素の存在下で小腸から吸収され、リンパ系に移行するため¹²⁾、大腸で合成される MK 類の吸収は一般に少ないとされている¹³⁾。ウマでも、消化管内で合成された MK-7 の吸収は少なく、そ

の利用は限られている可能性がある。MK-7 以外の長鎖 MK 類もウマの大腸で合成されると考えられるが、Ichihashi ら²¹⁾ は側鎖が長いほど MK 類は吸収されにくいとしている。したがって、大腸で合成される MK-7 より長鎖の MK 類はさらに利用性が低い可能性がある。

ウマにおけるビタミン K 要求量は、飼料中 PK と消化管内で合成される MK 類で十分満たされていると考えられてきた⁹⁾。本試験の結果から、ウマの消化管内で合成される MK 類の栄養学的意義については更に検討する必要があることが明らかである。

第二試験でも、対照区のウマの血漿中 MK-7 濃度は低く、測定限界以下の個体も多かった。60 μmol/d の MK-7 を補給した区では、給餌 4 時間後をピークに血漿中 MK-7 濃度は二次曲線的に変化した (Table 2)。また、60 μmol/d 補給区における血漿中 MK-7 濃度のピークは、12.8 nmol/l であった。一方、先行研究において、60 μmol/d の PK を補給した区の水漿中 PK 濃度は、本試験同様、給餌 4 時間をピークに変化し、血漿中 PK 濃度のピークは 4.8 nmol/l であった¹⁵⁾。また、MK-7 補給と PK 補給に関して、各処理における 1 日間 LSM を比較すると、本試験の 40 μmol/d、60 μmol/d の MK-7 補給区における血漿中 MK-7 濃度はそれぞれ 6.0 nmol/l、7.7 nmol/l であり、先行試験における 60 μmol/d の PK 補給区の水漿中 PK 濃度の 3.3 nmol/l を大きく上回っていた。これらの結果から、ウマでは、経口摂取された MK-7 は PK よりも吸収されやすいことが示唆された。一方、給餌前の PK 補給区における血漿中 PK 濃度は 2.1 nmol/l だったのに対して、本試験の 40 μmol/d 補給区では給餌前の MK-7 濃度は 4.2 nmol/l と高く、給餌後の MK-7 濃度の有意な経時変化は認められなかった。すなわち、ウマでは PK 補給と比べ MK-7 摂取後の血漿中 MK-7 濃度は高濃度を維持していた。この結果は、ヒトにおける Schurgers ら¹⁶⁾ の報告と一致する。さらに Schurgers ら¹⁷⁾ は、MK-7 の長い半減期は吸収性の差ではなく、吸収された MK-7 が肝臓に取り込まれた後、PK とは異なり、肝臓から放出されやすいことに起因していることを示唆している。ウマにおいても、摂取された MK-7 は、肝臓に蓄積された後に再び血漿中に放出されやすいことで、長い血漿中滞留時間につながっていると考えられる。

結論として、ウマの消化管内で合成される MK-7 の栄養学的意義は小さい可能性が示された。一方、経口補給された MK-7 は PK よりも吸収されやすく、補給後に血漿中濃度が長時間維持されることが示されたため、ウマにおいてもヒト同様に、MK-7 はより良いビタミン K サプリメントとして利用可能である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、日本中央競馬会の資金補助によって行われた。

参考文献

- 1) Thijssen HH, Vervoort LM, Schurgers LJ, Shearer MJ (2006) Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *British Journal of Nutrition* 95: 260-266.
- 2) Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, Shiraki M (1996) Vitamin K2 promotes $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamin D3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 59: 466-473.
- 3) Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Fujita T (2000) Vitamin K2 inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. *Bone* 27: 769-776.
- 4) Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi J, Romero K, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B (2003) Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *Journal of Biological Chemistry* 278: 43919-43927.
- 5) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S (2007) Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39: 239-247.
- 6) Yamaguchi M, Sugimoto E, Hachiya S (2001) Stimulatory effect of menaquinone-7 (vitamin K2) on osteoblastic bone formation in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry* 223: 131-137.
- 7) Katsuyama H, Otsuki T, Tomita M, Fukunaga M, Fukunaga T, Suzuki N, Saijoh K, Fushimi S, Sunami S (2005) Menaquinone-7 regulates the expressions of osteocalcin, OPG, RANKL and RANK in osteoblastic MC3T3E1 cells. *Int J Mol Med* 15: 231-236.
- 8) Katsuyama H, Saijoh K, Otsuki T, Tomita M, Fukunaga M, Sunami S (2007) Menaquinone-7 regulates gene expression in osteoblastic MC3T3E1 cells. *Int J Mol Med* 19: 279-284.
- 9) NRC (2007) Nutrient requirements of horses, 6th edn. National Academy Press, Washington, DC.
- 10) Siciliano PDW, Lawrence LK (2000) Changes in Vitamin K Status of Growing Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 20: 726-729.
- 11) Booth SL, Suttie JW. (1998) Dietary intake and adequacy of vitamin K. *Journal of Nutrition* 128: 785-788.
- 12) Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P (1974) Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitamins and Hormones* 32: 513-542.
- 13) McDowell LR (1989) Introduction and Historical Considerations. In: McDowell LR (ed.), *Vitamin in Animal Nutrition*, Harcourt Brace Jovanovich, New York: pp. 1-9.
- 14) Groenen-van Dooren MM, Ronden JE, Soute BA, Vermeer C (1995) Bioavailability of phylloquinone and menaquinones after oral and colorectal administration in vitamin K-deficient rats. *Biochem Pharmacol* 50: 797-801.
- 15) Terachi T, Inoue Y, Ashihara N, Kobayashi M, Ando K, Matsui T (2010) Plasma vitamin K concentration in horses supplemented with several vitamin K homologues. *Journal of Animal Science* 89: 1056-1061.
- 16) Schurgers LJ, Vermeer C (2002) Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 1570: 27-32.
- 17) Schurgers LJ, Teunissen KJ, Hamulyák K, Knapen MH, Vik H, Vermeer C (2007) Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood* 109: 3279-3283.
- 18) Rae R, Iatsenko I, Witte H, Sommer RJ (2010) A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. *Environ Microbiol* 11: 3007-3021.
- 19) Collins MD, Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* 45: 316-354.
- 20) Thoney M, Palhof BA, DeCarlo MR, Ross DA, Firth NL, Quaas RL, Perosio DJ, Duhaime DJ, Rollins SR, Nour AYM (1985) Sources of variation of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker. *Journal of Dairy Science* 68: 661-668.
- 21) Ichihashi T, Takagishi Y, Uchida K, Yamada H, Ichihashi T, Takagishi Y, Uchida K (1992) Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. *Journal of Nutrition* 122: 506-512.