原 著

ヒト生体試料中の vitamin K₁ (phylloquinone) および
vitamin K₂ (menaquinones) 同族体の個別測定

白幡 聡* 中村外士雄*

Studies on contents of phylloquinone and menaquinones family in native serum and feces from human adults and newborn infants.

Akira SHIRAHATA* and Toshio NAKAMURA*

Key words: vitamin K deficiency, phyloquinone, menaquinones, newborn

A sensitive and specific method for the determination of phyloquinone (K₁) and the menaquinones family (MK-n), between MK-4 and MK-10, was developed. Vitamin K₁ and MK-n extracted from biological materials were separated by high performance liquid chromatography using a Cosmosil 5 C₁₈ column with ethanol-water as a mobile phase. The separated K₁ and MK-n were detected by a fluorometry after their reaction with ethanolic sodium borohydride in a reaction coil connected by one-line to a chromatographic column. Minimum detectable quantities of K₁, MK-4 and MK-7 were 10, 10 and 50 pg, respectively. The recovery rates of the serum and feces assay were assessed by adding a known amount of vitamins K to them. More than 95 % and more than 94 % of added K₁ and MK-7 were recovered in the serum and feces.

With a wide variation of vitamins K concentration in each sample, K₁, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 and MK-10 were detected in feces from 6 normal adults, as shown in figure 4 and table 1. On the other hand, only K₁ and MK-7 were detected in meconium collected from 6 normal newborn infants before the start of initial feeding (Table 2). The contents of vitamins K in meconium were less than 1 percent of those in adult feces. Vitamin K₁ and MK-7 were detected in normal adult serums, as shown in figure 5 and table 3. The mean

* 産業医科大学小児科学教室[〒807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1], Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan.

serum concentration of K_1 in 5 normal adults was 0.47 ng/ml (range 0.21-0.89), and the range of MK-7 concentration was from less than 0.05 to 0.92 ng/ml. In 6 pooled serums of umbilical cord blood from 56 normal newborn infants, only MK-7 was detected, ranging from less than 0.014 to 0.188 ng/ml (Table 4).

These results show that the measurement of contents of K_1 and MK-n in human biological materials is an important subject in the elucidation of the cause of vitamin K deficiency.

緒 言

1929年, Dam が vitamin K を発見してから半世紀以上が経過した。この間, γ -carboxy-glutamic acid の発見をはじめとして vitamin K に関する重要な事実が次々と明らかにされ, その結果, vitamin K 依存性蛋白の局在や vitamin K の作用機序については細部まで解明されている¹⁾。一方, 生体内動態とくにヒトにおける vitamin K の生体内動態の研究はいまだ立ち遅れており, 正確な栄養所要量すら確立されていないのが現状である²⁾。その最大の理由は, ヒトにおける重要な vitamin K の供給源である vitamin K_2 (menaquinone, 以下MK) の同族体の個別測定法が開発されていなかったことによる。われわれ³⁾は high performance liquid chromatography (以下, HPLC) と蛍光分光光度計を組み合わせた阿部ら⁴⁾の方法に改良を加えて vitamin K_1 および MK の同族体のひとつである MK-4 の高感度測定法を確立しすでに報告したが, 今回さらに MK-5 から MK-10 までの MK 同族体について高感度個別測定法を確立し, 生体試料中の vitamin K 含量を測定したので報告する。

I. 対象および方法

過去1週間以上服薬歴がなく, かつ納豆を摂取していない健康成人5名と正常正期産新生児56名の臍帯から得られた血清ならびに同様に過去1週間以上服薬歴がなく, かつ納豆を摂取していない健康成人6名および出生後3日までの正常正期産新生児6名から得られた糞便を vitamin K 測定の対象とした。

測定方法は既報³⁾に準じ, 蒸留水 2 ml, iso-

propyl alcohol 4 ml, n-hexane 10 ml を加えて氷冷下で vitamin K を抽出後, n-hexane 層 8 ml を分取し, N_2 ガス下で蒸発乾固させ, 測定に供した。HPLC は逆相分配型カラム Cosmosil 5 C_{18} , 移動相は 95 % ethanol 溶液を用い, 流速 0.5 ml/分で分離した。しかるのち, 0.1 % $NaBH_4$ ethanol 溶液にて還元発色させ, 蛍光分光光度計 (Ex 335 nm, Em 430 nm) を用いて測定した。実際の測定にあたっては, 0.1 % $NaBH_4$ ethanol 溶液を加えた系と加えない系についてそれぞれの retention time に一致するピークの高さの差を求め, 試料と同様に処理した内部標準のピークの高さから vitamin K_1 および MK 同族体の含量を求めた。なお, 本法による vitamin K の回収率は, 血清では 95 % 以上, 糞便では 94 % 以上であった。

II. 成 績

1. vitamin K_1 と MK-4 から MK-10 までの純品を混和溶解後, 本法を用いて測定した結果, それぞれの単品の retention time と一致する位置にピークが認められた (図1)。retention time の log 値と各 MK が有する isoprenyl unit の数の間には完全な直線関係が成立した (図2)。内部標準を用いた場合の測定限界は, 図3に示したごとく vitamin K_1 で 10pg, MK-4 で 10pg, MK-7 で 50pg であった。

2. 成人糞便中には vitamin K_1 の他に, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10 が認められた。vitamin K_1 および MK 同族体の含量には大きな個人差が認められ, MK-4, MK-5, MK-9 は検出されない例もみられた (表1)。図4に症例 Y. K. における vitamin K の分離溶出パターンを示した。

Fig. 1 Chromatogram of HPLC in the assay of standard mixture including phyloquinone and the menaquinones (MK) family from MK-4 to MK-10.

Fig. 2 Correlation between number of isoprenoid units in each menaquinone and logarithmic values of retention time in this assay system.

Fig. 3 Calibration curve for HPLC assay of phyloquinone (K₁), menaquinone-4 (MK-4) and menaquinone-7 (MK-7).

Calibration graphs were constructed by the injection of K₁, MK-4 and MK-7 that were dissolved in the respective mobile phase. Peak heights were measured from the chromatogram. Graphs of peak height vs. amount injected were constructed. A calibration graph of peak height vs. mass of K₁, MK-4 and MK-7 injected was linear in the range of 10-125 pg, 10-100 pg and 50-500 pg, respectively.

Table 1 Physiological fecal levels of phyloquinone and menaquinones family in normal adults (ng/g in dry weights)

	K ₁	MK-4	MK-5	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
A	648	116	109	422	387	910	2054	11854
B	1898	289	281	2140	1988	511	3080	15662
C	5345	<10	<20	507	1826	2476	2702	7085
D	1634	<10	273	407	1071	525	<25	5167
E	2477	73	1570	189	753	389	1411	5745
F	2220	537	1138	2071	2562	1273	2548	9585

一方、胎便中には vitamin K₁ と MK-7 が検出されたがその含量は少なく、成人糞便の 1/100 以下であった (表 2)。

3. 成人血清中には vitamin K₁ と MK-7 が見い出された。糞便同様、個人差が大であったが、とくに MK-7 は測定した 5 名中、最高が

Fig. 4 Chromatograms of HPLC in the assay of phyloquinone (K_1) and the menaquinones (MK) family in human feces from a normal adult. Chromatograms of HPLC before and after their reaction with ethanolic sodium borohydride are shown in the lower and upper row of this figure.

Table 2 Physiological levels of phyloquinone and menaquinones family in meconium from normal newborn infants (ng/g in dry weights)

	K_1	MK-7
A	3.6	<0.3
B	18.2	0.9
C	3.0	<0.3
D	9.8	<0.3
E	2.5	<0.3
F	2.0	0.5

Table 3 Physiological levels of phyloquinone and menaquinones family in serum from normal adults (ng/ml)

	K_1	MK-7
A	0.21	<0.05
B	0.43	0.70
C	0.26	0.39
D	0.89	0.92
E	0.54	<0.05

Table 4 Physiological levels of phyloquinone and menaquinones family in umbilical cord serum from normal newborn infants (ng/ml)

	n*	K_1	MK-7
A	6	<0.006	0.040
B	2	<0.018	0.039
C	12	<0.004	<0.014
D	12	<0.004	0.188
E	12	<0.004	<0.014
F	12	<0.004	<0.014

*n : number of pooled serum

920 pg/ml で、2名は測定限界である 50 pg/ml 以下であった (表 3)。図 5 に症例 G.B. の vitamin K 分離溶出パターンを示した。臍帯血清は vitamin K 濃度がさらに低値であったため 2名から12名分をプールし、10~20 ml を starting volume として測定に供したが vitamin K_1 は検出されず MK-7 のみが6検体中3検体のみで検出された (表 4)。

III. 考 案

通常のラットに脱脂食を与えても vitamin K

欠乏をきたすことはないが、無菌ラットを vitamin K 欠乏食で飼育した場合、vitamin K 欠乏による致命的な出血がみられることから、ある種の動物では腸内細菌が vitamin K の供給に重要な役割りを果していることが古くから知られていた。ヒトの場合でも単純な飢餓のみでは vitamin K 欠乏に陥らないことから腸内細菌が産生する MK が、経口的に摂取される vitamin K とは独立した形で vitamin K の source となっていると考えられている⁹⁾。しかし、このことを直接的に証明した報告はこれまでみられな

Fig. 5 Chromatogram of HPLC in the assay of phyloquinone (K_1) and menaquinones (MK) family in human serum from a normal adult. Two shadowed areas show the peaks seen only after reaction of the sample with ethanolic sodium borohydride.

い。

MK には多くの同族体が存在する。MK は vitamin K_1 の phytyl 側鎖が 1~14 個の isoprenyl unit からなる側鎖におきかえられたもので、それぞれの同族体は保有する isoprenyl unit の数 (n) をとって MK-n と呼ばれる。MK はヒトの腸内細菌の中でも *Staphylococcus albus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides* などにより産生される⁶⁻⁸⁾。Hollander ら⁹⁻¹⁰⁾ のラットを用いた実験によれば、vitamin K_1 が小腸から energy requiring saturable transport mechanism により吸収されるのに対して、MK は回腸末端と結腸において passive diffusion process により吸収され生体内に入ると報告されている。しかし、血清中に MK が存在することを証明した報告はこれまでみられず、したがって腸内細菌が産生する MK は、vitamin K の source となりえないとする説も提唱されていた。この混乱が生じた主な理由は vitamin K の優れた測定法が開発さ

れていなかったことによる。すなわち、これまで報告された方法の測定限界は、400~1000 pg の間にあり、しかも阿部らの方法が vitamin K_1 の他に MK-4 を測定できる点を除いてはいずれも vitamin K_1 のみの測定しかできなかった⁴⁾¹¹⁻¹⁴⁾。われわれは、阿部ら⁴⁾の方法に、(1)抽出操作を短時間に、氷冷下で行ったこと、(2)カラムに理論段数の高い Cosmosil 5 C_{18} を用いたこと、(3)蛍光条件を変更したこと、などの改良を加え、原法の 40 倍の感度を有する vitamin K の測定法を確立しえた。しかも、われわれの方法ではほぼ同様な感度で MK の同族体を個別に測定することが可能であった。

本法を用いて生体試料中の vitamin K を測定した結果はすでに示したごとく、成人糞便中には vitamin K_1 の他に少なくとも MK-4 から MK-10 までの MK 同族体が見い出された。ヒトの腸内細菌は MK-7 以降を産生するとこれまで報告されているが、今回の検索で見い出された MK-4, MK-5 および MK-6 が腸内細

菌由来か、食物由来かは完全な飢餓実験を行っていないので明らかでない。さらに興味あることは、糞便中には多くの MK 同族体が認められたにもかかわらず血清中には vitamin K₁ と MK-7 のみが見い出されたことである。もちろん、われわれの方法の測定感度でも検出しない他の MK 同族体が血清中に存在する可能性は十分に考えられるが、MK-1 に対する MK-7 の比活性が 122 と、MK-4 に次いで高いこと¹⁵⁾ を考えると腸内細菌由来の MK の中で MK-7 が最も重要な役割りを果している可能性が強い。preliminary data ではあるが、vitamin K₁ と MK-5~MK-7 を大量に含有する納豆を摂取させると血清中の vitamin K₁ と MK-7 が増加すること、飢餓と抗生剤の投与で vitamin K 欠乏をきたした例では、vitamin K₁ とともに MK-7 の血清濃度が低下することをわれわれは確めている¹⁶⁾。

糞便中の MK の同族体の含量は個人差が大であった。これは腸内細菌叢の差異によるものと推測されるがわれわれの今回の検討では同時に腸内細菌叢の検討を行っていないので詳細は明らかでない。native plasma あるいは serum 中の vitamin K 濃度の測定成績は vitamin K₁ についてのみ報告があるが、それによると Shearer ら¹⁷⁾が男性 0.30 ng/ml, 女性 0.22 ng/ml, Lefevre ら¹¹⁾が 5~30 ng/ml, Chiu ら¹²⁾が 1~2 ng/ml, Hart ら¹⁴⁾が 0.41 ng/ml と報告している。われわれの測定成績は、Shearer らおよび Hart らの報告に近い。一方、MK-7 の血清濃度は糞便同様、個人差が大であったが、これが糞便中の MK-7 の含量を反映しているかどうかは、今回同一例について同時に糞便と血清の vitamin K を測定したわけではないので不明である。

出生後 2~4 日目の新生児が vitamin K の欠乏による出血傾向を示すことはよく知られている。その原因として、新生児では腸内細菌叢が形成途上にあるため MK の供給が少ないこと、乳汁を通しての vitamin K₁ の補給が少ないことなどが推測されている。われわれ¹⁸⁾は母乳中の vitamin K₁ 含量は人工乳に比べて少なく、しかも個人差が非常に大きいことを既に報

告したが、今回の検討でさらに糞便中の vitamin K₁ および MK の含量が成人に比べて非常に少ないことを明らかにした。出生直後で授乳開始前の胎便からも vitamin K₁ と MK-7 が検出されたのは興味あるが、これは胎盤を介しての母体由来と考えるのが妥当であろう。vitamin K₁ と MK-7 は羊水中にも微量ながら検出されている。一方、臍帯血では一部の pooled serum においてのみ MK-7 が検出されたが、vitamin K₁ は検出されなかった。Shearer ら¹⁷⁾も、われわれの方法に比べて感度は低いが、臍帯血では vitamin K₁ を検出することができなかったと報告している。分娩直前の母体に vitamin K₁ を投与した場合、症例によってはかなり、臍帯血への移行が認められると駒沢¹⁹⁾は報告しているが、われわれおよび Shearer らの成績から考えると vitamin K は胎盤通過性が悪く、胎生期に胎盤を介しての補給、畜積が少ないことが出生後 2~4 日目に vitamin K の枯渇をきたすひとつの要因であると考えられた。

以上、vitamin K の生体内動態とくに vitamin K 欠乏症の成因、vitamin K の最少栄養所要量を解明してゆくためには vitamin K₁ とともに MK の同族体の測定を行うことが必須であることが示された。

文 献

- 1) Suttie, J.W.: Current concepts of the mechanism of action of vitamin K and its antagonists. (edited by Lindenbaum J.: Nutrition in hematology), Churchill Livingstone, New York, 1983. p. 245~270.
- 2) Savage D. and Lindenbaum J.: Clinical and experimental human vitamin K deficiency. (edited by Lindenbaum J.: Nutrition in hematology), Churchill Livingstone, New York, 1983. p. 271~320.
- 3) 白幡聡, 中村外士雄, 小松啓子, 椎木みどり, 萱島成美: 血清ならびに糞便中のビタミン K (phyloquinone および menaquinone-4) の測定成績——とくに新生児と成人の比較. 医学のあゆみ, **129**; 21~22, 1984.
- 4) 阿部皓一, 広島 修, 石橋恭子, 大前雅彦, 阿部 靖, 勝井五一郎: 高速液体クロマトグラフ

- ィーによる生体中のフィロキノンおよびメナキノン-4 の蛍光定量. 薬学雑誌, **99**; 192~200, 1979.
- 5) Udall, J.A.: Human sources and absorption of vitamin K in relation to anticoagulation stability. J.A.M.A., **194**; 107~109, 1965.
 - 6) Almquist, H.J., Pentler, C.F. and Mecchi, E.: Synthesis of the antihemorrhagic vitamin by bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **38**; 336~338, 1938.
 - 7) Coates, M.E.: Gnotobiotic animals in nutrition research. Proc. Nutr. Soc., **32**; 53~58, 1973.
 - 8) Collins, M.D. and Jones, D.: Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev., **45**; 316~354, 1981.
 - 9) Hollander, D., Rim, E. and Muralidhara, K. S.: Vitamin K₁ intestinal absorption in vivo: influence of luminal contents on transport. Am. J. Physiol., **232**; E69~E74, 1977.
 - 10) Hollander, D., Rim, E. and Ruble, P.E.: Vitamin K₂ colonic and ileal in vivo absorption: bile, fatty acid, and pH effects on transport. Am. J. Physiol., **233**; E124~E129, 1977.
 - 11) Lefever, M.F., de Leenheer, A.P. and Claeys, A.E.: High-performance liquid chromatographic assay of vitamin K in human serum. J. Chromatogr., **186**; 749~762, 1979.
 - 12) Chiu, Y.J.D., Zee-Cheng, R.K.Y. and Olson, R.E.: Determination of vitamin K₁ in human plasma. Fed. Proc., **40**; 873, 1981.
 - 13) Haroon, Y., Shearer, M.J., Rahin, S., Gunn, W.G., McEnery, G. and Barkhan, P.: The content of phylloquinone (vitamin K₁) in human milk, cows' milk and infant formula foods determined by high-performance liquid chromatography. J. Nutr., **112**; 1105~1117, 1982.
 - 14) Hart, J.P., Shearer, M.J., McCarthy, P.T. and Rahim, S.: Voltammetric behaviour of phylloquinone (vitamin K₁) at a glassy-carbon electrode and determination of the vitamin in plasma using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Analyst, **109**; 477~481, 1984.
 - 15) Matschiner, J.T. and Doisy, E.A., Jr.: Bioassay of vitamin K in chicks. J. Nutr., **90**; 97~100, 1966.
 - 16) 白幡 聡: 未発表データ
 - 17) Shearer, M.J., Rahim, S., Barkhan, P. and Stimmler, L.: Plasma vitamin K₁ in mothers and their newborn babies. Lancet, **II**; 460~463, 1982.
 - 18) 白幡 聡, 野尻外士雄, 宮地良和, 山田兼雄, 池田稲穂, 滝井泰弘, 鈴木英夫, 佐藤 誠也: 母乳ならびに調整粉乳中のビタミンK含量. 医学のあゆみ, **118**; 857~859, 1981.
 - 19) 駒沢 勝: 新生児, 乳児におけるビタミン K₁ の消化管からの吸収. (前川喜平, 今村栄一編, 小児科の進歩 3), 診断と治療社, 東京, 1983. p. 30~34.

●疾病の免疫遺伝学的アプローチ!

HLA と 疾病

月刊「臨床免疫」第14巻冬季特別増刊号

編集 慶応大学教授 渡辺 格、東海大学教授 辻 公美、専門医22氏分担執筆

B5判 144頁 定価3,500円(〒300円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768