

# 血清ならびに糞便中のビタミンK含量の測定

## — 新生児, 幼若乳児と成人の比較 —

産業医科大学小児科学教室

白 幡 聡 小 松 啓 子  
中 村 外 士 雄 萱 島 成 美

### 結 言

特発性乳児ビタミンK欠乏性出血症の病因の究明が急がれている。現在、ビタミンK欠乏が惹起される原因として、①ビタミンK摂取量の不足、②腸内細菌によるビタミンK産生の低下、③肝障害あるいは肝の未熟性による vitamin K dependent carboxylase の活性低下などが考えられている。また、新生児早期にみられる一次性出血症（新生児一次性出血症）の場合も同様な原因が推測されているが、これまでビタミンKを特異的かつ高感度に測定する方法が開発されていなかったため、これら欠乏症におけるビタミンKの動態は不明のままである。我々は、high performance liquid chromatography（以下HPLC）とfluorometryを組み合わせた阿部ら<sup>1)</sup>の方法に改良を加え、従来の方法より高い感度でビタミンKを測定する方法を確立し、健康新生児、成人ならびにビタミンK欠乏症患者の血清と糞便中ビタミンKを測定したので報告する。

### 方 法

臍帯血清（8例）および健康成人（男性12例、女性9例）から得られた血清と、出生後7日までの正常新生児（27例）、出生後17～48日の幼若乳児（9例）、健康成人男子（5例）および乳児ビタミンK欠乏性出血症患者（1例）から得られた糞便を試料とした。上記の血清1～2mlあるいは凍結乾燥処理した糞便0.1gに蒸留水2ml、isopropyl alcohol 4ml、n-hexane 10mlを添加混和後、3000r. p. m. 5分間遠心し

てビタミンKを抽出分離した。抽出操作はすべて氷冷下で行った。上清のn-hexane層8mlを、分取し、N<sub>2</sub>下にて蒸発乾固後、100～300μlのisopropyl alcoholで溶解して測定に供した。HPLCによるビタミンKの測定は、逆相分配型のカラムCosmosil 5C<sub>18</sub>を用い、移動相として95%のエタノール水溶液（流速0.5ml/分）にて分離した。その後1%NaBH<sub>4</sub>エタノール溶液にて還元発色させ、蛍光分光光度計（Ex. 335nm, Em. 430nm）にてビタミンK<sub>1</sub>とビタミンK<sub>2</sub>をそれぞれ測定した。なお、本法によるビタミンKの抽出効率95%以上で、回収率は94～100%の間であった。また、阿部らの方法に改良を加えることにより、ビタミンK<sub>2</sub>（エーザイKKより供与のmenaquinone-4）の検出限界はともに10pgとなり、原法の約40倍の感度を得ることができた。図1に本法による検量線と、標準分質の分離パターンを示した。

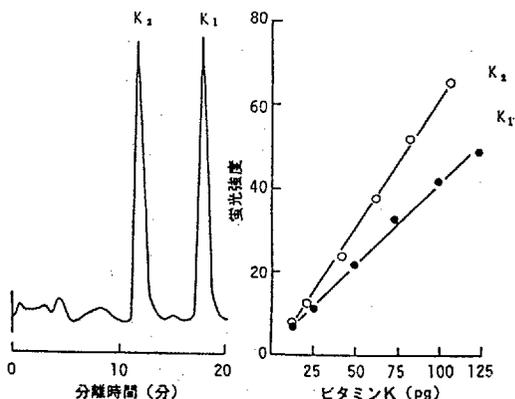


図1 ビタミンK<sub>1</sub>およびK<sub>2</sub>の分離パターンと検量線

成 績

1. 血清中のビタミンK濃度 (図2)

血清中のビタミンK<sub>1</sub>濃度の平均±1SDは、成人男子4.8±4.0 ng/ml, 成人女子1.5±1.6 ng/ml, 臍帯血0.8±0.4 ng/mlであり、臍帯血のビタミンK<sub>1</sub>濃度の平均値は成人の約1/4であった。成人男子と女子の比較ではP<0.05の危険率で、女子が低値であった。一方、ビタミンK<sub>2</sub>濃度は成人男子1.8±2.0 ng/ml, 成人女子0.6±1.6 ng/mlで、臍帯血は0.12, 0.09, 0.08 ng/mlの3例を除き、残りはいずれも0.03 ng/ml未満であった。成人に比べて臍帯血のビタミンK<sub>1</sub>+K<sub>2</sub>濃度はP<0.05の危険率で有意に低値であった。

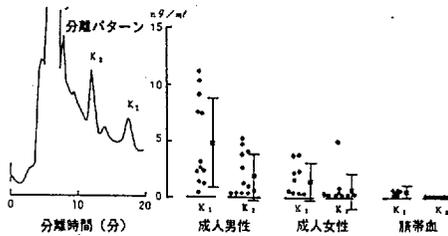


図2 成人血ならびに臍帯血中のビタミンK濃度

2. 糞便中のビタミンK含量 (図3および図4)

糞便中のビタミンK<sub>1</sub>含量の平均±1SDは、成人男子4032±2845 ng/g, 出生後7日までの新生児91±91 ng/g, 出生後17~48日の幼若乳児163±72 ng/gで、新生児の糞便中のビタミンK<sub>1</sub>含量は成人の約1/40であった。一方、ビタミンK<sub>2</sub>含量の平均±1SDは、それぞれ1328±1566 ng/g, 100±179 ng/g, 156±133 ng/gであった。新生児および幼若乳児の糞便中のビタミンK<sub>1</sub>+K<sub>2</sub>含量はP<0.001の危険率で成人に比して有意に低値であった。しかし、出生後7日までの新生児と、出生後17~48日の幼若乳児の間に有意差は認められなかった。ビタミンK投与前に糞便中のビタミンK含量を測定しえた乳児ビタミンK欠乏性出血症の1症例のビタミンK<sub>1</sub>とK<sub>2</sub>はそれぞれ20 ng/g, 48 ng/g

であった。出生直後で、授乳開始前の新生児胎便からも、ビタミンK<sub>1</sub>とK<sub>2</sub>が検出されたため、羊水中のビタミン濃度を測定したところ微量ながらビタミンK<sub>1</sub>とK<sub>2</sub>を検出しえた。

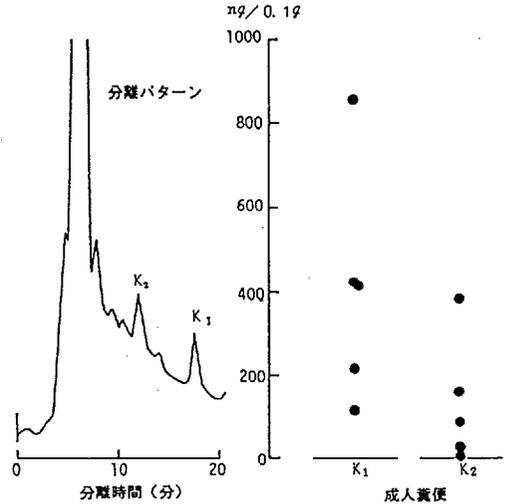


図3 成人糞便中のビタミンK<sub>1</sub>およびK<sub>2</sub>含量

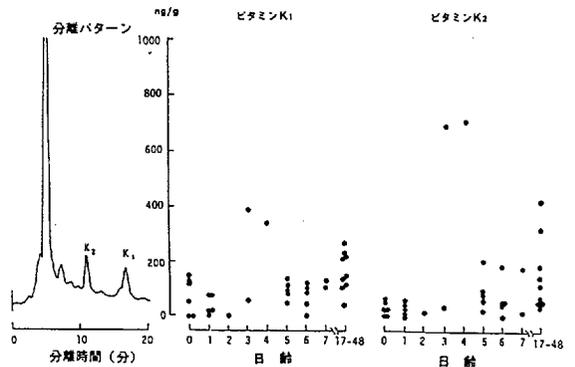


図4 新生児・幼若乳児糞便中ビタミンK<sub>1</sub>およびK<sub>2</sub>含量

考 察

ビタミンKの測定法としては、bioassay, 酸化還元法, ポーラログラフィー, カラムクロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィー, HPLCなどが考案されている。しかし、既報のビタミンKの測定感度はもつとも良いもので400 pgであり、我々が今回確立した方法の1/40に過ぎな

ない。しかも、これまでの方法では、一部を除き、ビタミンK<sub>1</sub>のみしか測定することができなかったため、native plasmaあるいはserum中にビタミンK<sub>2</sub>を検出しえたという報告はない。ビタミンK<sub>1</sub>の血清中濃度に関してはLefevereら<sup>2)</sup>が5~30 ng/ml, Chiuら<sup>3)</sup>が1~2 ng/ml, Shearerら<sup>4)</sup>が、男性0.30 ng/ml, 女性0.22 μg/mlと報告しており、報告者間のバラツキが大であるが、我々の成績はLefevereらとChiuらの報告の間にある。臍帯血については既報<sup>4)</sup>では検出不能とされている。我々の成績ではビタミンK<sub>1</sub>が0.8 ng/mlで、これは成人値の約1/4であった。一方、ビタミンK<sub>2</sub>は0.12 ng/mlの1例を除き、残りは全て0.10 ng/ml未満であり、成人値の1/10以下であった。これらの結果はビタミンKは胎盤通過性が良くないとするこれまでの報告と一致する。

糞便中のビタミンKの測定成績を文献上、見つけることができなかった。したがって他の報告との比較はできない。今回の我々の検討で明らかにされた重要な事実は、新生児と幼若乳児のビタミンK含量が成人の1/10以下であることである。このように、臍帯血中と糞便中のビタミンKが成人に比して著しく少ないということは、新生児や幼若乳児では必要とされるビタミンKを外からの供給に強く依存していることを示している。したがって我々がすでに報告したように、乳汁により供給されるビタミンK含量が少ないと容易にビタミンK欠乏状態に陥るのであろう。1例ではあるが、乳児ビタミンK欠乏性出血症患児の糞便でビタミンK<sub>1</sub>とK<sub>2</sub>がいずれも著しい低値を示し

たことはそれらの推測をある程度、裏付けるものである。もちろん、vitamin K dependent carboxylaseの活性の低下など他の要因がさらにビタミンK依存性凝固因子の産生低下に関与している可能性は十分考えられる。さて、我々の今回の報告の問題点は、ビタミンK<sub>2</sub>に関してmenaquinone - 4のみしか測定しえていないことである。最近、我々は、menaquinoneの他のシリーズについてもほぼ測定法を確立しえたので、今後はすべてのビタミンK同族体についてヒトではいまだ知られていない動態を解明してゆく予定である。

#### 文 献

- 1) 阿部皓一ほか：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，99：192，1979.
- 2) Lefevere M. F. et al : High performance liquid chromatographic assay of vitamin K in human serum. J. Chromatogr. 186 : 749, 1979.
- 3) Chiu Y. J. D. et al. : Determination of vitamin K in human plasma. Fed. Proc. 40 : 873, 1981.
- 4) Shearer M. J. et al. : Plasma vitamin K in mothers and their newborn babies. Lancet. ii : 460, 1982.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 緒言

特発性乳児ビタミン K 欠乏性出血症の病因の究明が急がれている。現在，ビタミン K 欠乏が惹起される原因として， ビタミン K 摂取量の不足， 腸内細菌によるビタミン K 産生の低下， 肝障害あるいは肝の未熟性による vitamin K d-dependent carboxylase の活性低下などが考えられている。また，新生児早期にみられる一次性出血症(新生児一次性出血症)の場合も同様な原因が推測されているが，これまでビタミン K を特異的かつ高感度に測定する方法が開発されていなかったため，これら欠乏症におけるビタミン K の動態は不明のままである。我々は，high performance liquid chromatography(以下 HPLC)と fluorometry を組み合わせた阿部らの方法に改良を加え，従来の方法より高い感度でビタミン K を測定する方法を確立し，健康新生児，成人ならびにビタミン K 欠乏症患者の血清と糞便中ビタミン K を測定したので報告する。