

# 肝組織中のビタミンK同族体含量の測定

産業医科大学小児科学教室

白幡聰，中村外土雄，  
小松啓子，萱嶋成美

## 目的

ビタミンK（以下V.K）依存性凝固因子（第II, 第VII, 第X因子）と凝固阻害因子（プロテインC, プロテインS）はいずれも肝で産生されるので、V.Kの肝における局在とその変動を検索する意義は大きい。われわれは、HPLCと螢光分光度計を組み合わせた高感度測定法を確立し、血液、尿、糞便、羊水などの生体試料中のV.K含量を測定し、報告してきたが、血液、尿、糞便などの試料に比べて、肝組織中には夾雜物質が多いため、従来のわれわれの抽出方法ではV.Kの分離定量が不可能であった。そこでDuelloらの方法に準じて、夾雜物質を除去するための抽出方法を検討した。

## 試料ならびに方法

ラットの肝組織を生理的食塩水で洗浄後、凍結乾燥した。凍結乾燥後、均一に粉碎して測定試料とした。

凍結乾燥試料1gを蒸留水15mlに懸濁後、エチアルコール15ml、ジエチルエーテル37.5ml、石油エーテル37.5mlを加え、ラット肝組織中の脂肪を抽出した。有機層を採取し、組織中のV.K同族体の回収率を高めるため、さらに同操作を3回繰り返した。全有機溶媒を回収後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（芒硝）にて水分を除去してからN<sub>2</sub>下で有機溶媒を除去した。

次に抽出した脂肪を石油エーテルに溶解し、石油エーテル、蒸留水にて平衡化したアルミナカラムにapplyした。石油エーテル中のベンゼン濃度を0, 4, 6, 8, 16%と段階的にかえ、各濃度溶50mlで溶出した分画をN<sub>2</sub>下で乾固した。ここで得られた各分画の残渣をイソプロピルアルコールで溶解し、HPLCにより溶出後、発螢光物質の分離パターンを検索した。

次に、いずれの濃度のベンゼン分画にV.K同族体が溶出されるかを明らかにするために、K<sub>1</sub>, M<sub>K-4</sub>, MK-7を混和した標準物質をアルミナカラムにapplyし、ベンゼン濃度を肝組織の場合と同様に段階的にあげ、各濃縮分画のHPLC溶出パターンを検討した。

## 結果

- (1) 肝組織を試料とした場合、4%ベンゼン分画に最も多くの発螢光物質のピークが認められた。発螢光物質のピークは、ベンゼン濃度を6, 8, 16%と上げることにより、順次減少した。
- (2) 標準物質を試料とした場合、0, 4, 6, 8%のベンゼン分画にはK<sub>1</sub>, MK-4, MK-7と一致するピークは観察されず、16%のベンゼン、第1, 第2, 第3分画にのみ、applyした標準物質が溶出された。

上記の結果より、V.Kの分離抽出には16%のベンゼン分画が適当と考えられた。

- (3) 以下、本法を用い、新生児ならびに乳児各1例の肝組織を試料としてV.K同族体の含量を測定した。なお、ベンゼン分画は16%分画と念のため18%分画をプールして試料とした（図1）。新生児は、出生時体重520gの超未熟児で3時間後に呼吸不全にて死亡した。死亡前には乳汁を全く与えておらず、また抗生素とV.K製剤の投与も行われていなかった。一方、乳児は、狭義の乳幼児突然死症候群の例で、死亡直前まで一般状態は良好であり、抗生素の投与、補乳量の低下等、V.K欠乏をきたすリスク因子は認められていなかった。両症例の肝組織中のV.K含量は表1に示したごとく、未熟児の肝からはMK-7とMK-8が、乳児の肝からはMK-4, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10が検出された。図2は乳児例のクロマトグラムである。

## 考 按

未熟児の肝組織のV.K含量は乳児に比べてもなお著しく低値であり、出生時のV.Kの貯蔵量はきわめて少ないと考えられる。今回、成人の突然死あるいは事故死の症例の肝組織を検索する機会に恵まれなかった。これまでの報告では成人肝のV.K含量は100～200 $\mu\text{g}$ と言われているので、仮りに成人肝の重量を2000 gとした時、湿重量100 gあたりのV.K含量は5,000～10,000 mgとなり、

これに比べると乳児のV.K含量は成人に比べてかなり少ない。ただし、これまでの報告は、ニワトリを用いたbioassayであり、われわれの測定成績とは単純な比較はできない。今後、できるだけintactで、しかも経口摂取量の低下や抗生剤服用の既往がない成人例での成績と比較することにより、新生児、乳児の生理的特性が明らかにされるであろう。

表 1

### 肝臓中のビタミンK同族体含量

		K <sub>1</sub>	MK-4	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
未熟児	ng/Wet 100g	< 1.9	< 1.7	19.3	63.3	< 8.3	< 17.1
	ng/Dry 100g	< 10.7	< 9.7	110.2	362.0	< 47.2	< 97.9
乳 児	ng/Wet 100g	< 5.6	34.2	1173.7	132.8	198.9	337.3
	ng/Dry 100g	< 26.0	159.0	5452.8	616.8	924.3	1567.2

#### 脂肪の抽出

肝臓(凍結乾燥試料1.0g) + 蒸留水 15.0ml  
 ↓  
 Ethyl Alcohol 15.0ml  
 Diethyl Ether 37.5ml  
 Petroleum Ether 37.5ml

有機層を採取

同抽出操作を2回行う

回収した有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>にて脱水後、N<sub>2</sub>下で乾固

残渣をPetroleum Etherで溶解(試料I)

#### アルミニナカラム処理

Neutral alumina(200mesh, Woelm Pharma)  
 50gを平衡化

カラム充填(35cm×2.5cmφ, ガラスカラム)

試料Iをカラムに負荷

0, 2, 4, 6, 8, 16, 16, 16, 18V/V% Benzene  
 /Petroleum Ether各50mlにて溶出

16V/V% Benzene/Petroleum Ether分画以降を  
 集収、N<sub>2</sub>下で乾固

Isopropyl Alcoholで溶解

図 1. 肝臓中のV.K同族体の測定法

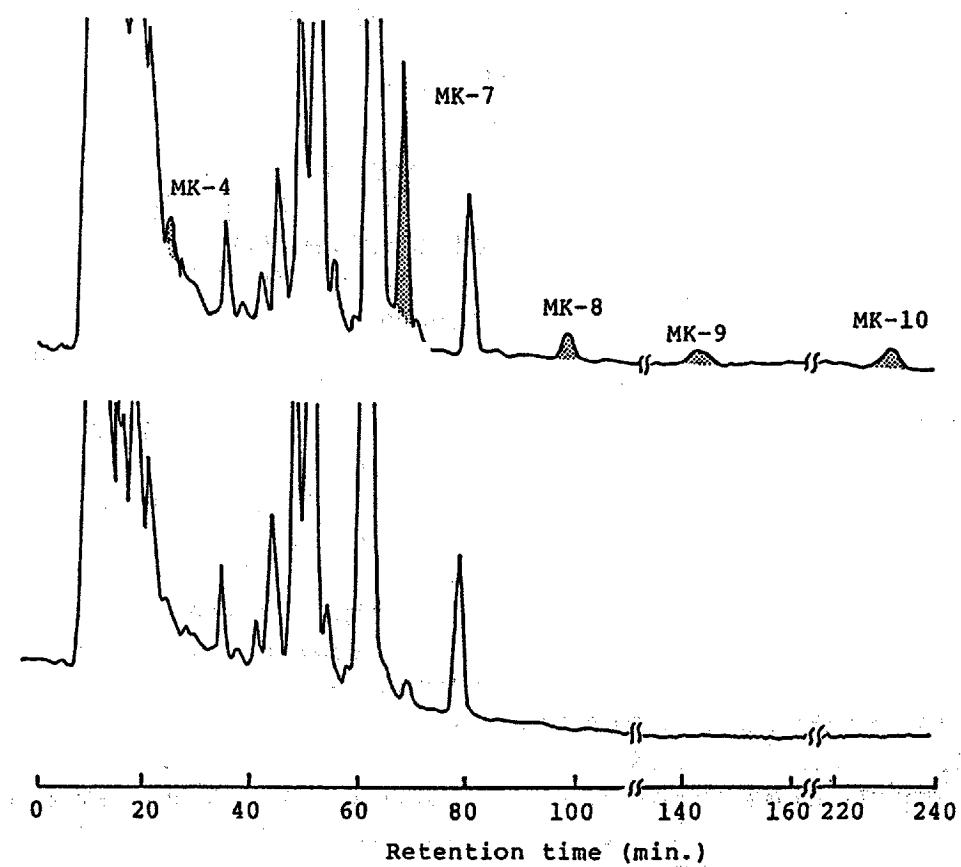


図2. 肝臓中のビタミンK同族体分離パターン(乳児)



## 検索用テキスト OCR(光学的文字符号認識)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



### 目的

ビタミン K(以下 V.K)依存性凝固因子(第 I, 第 II, 第 VII, 第 IX 因子)と凝固阻害因子(プロテイン C, プロテイン S)はいずれも肝で産生されるので, V.K の肝における局在とその変動を検索する意義は大きい。われわれは, HPLC と螢光分光光度計を組み合わせた高感度測定法を確立し, 血液, 尿, 粪便, 羊水などの生体試料中の V.K 含量を測定し, 報告してきたが, 血液, 尿, 粪便などの試料に比べて, 肝組織中には夾雑物質が多いため, 従来のわれわれの抽出方法では V.K の分離定量が不可能であった。そこで D'Uuccio らの方法に準じて, 夾雑物質を除去するための抽出方法を検討した。