

生体試料中（胎盤・母体及び臍帯血漿）
のビタミンK類の濃度分布

平池秀和，関根健二，木村美恵子，糸川嘉則

（京都大学医学部衛生学教室^{*}）

Endogenous Concentrations of K Vitamins in Human Placenta
and in Maternal and Umbilical Cord Plasma

Hidekazu HIRAIKE, Kenji SEKINE, Mieko KIMURA, Yoshinori ITOKAWA

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University

Endogenous concentrations of K vitamins(VKs) in human placenta and in paired samples of maternal and umbilical cord plasma were detected and identified by high-performance liquid chromatography(HPLC) with fluorometric detection using post-column reduction.

Pyloquinone(K1) and menaquinones(K2:MK-4, 6, 7) were found in placentae and maternal plasma. K1 and MK-4 were found in umbilical cord plasma. (Table 1.)

The experimental subjects were (A) thirteen pregnant women with normal diet and (B) two pregnant women with diet addition of fermented soybeans (Natto) about 30g on alternate days for 1 month before delivery. As MK-7 is abundant in fermented soybeans, the placenta and maternal plasma of group (B) contained higher concentrations of MK-7 than group (A). But MK-7 was not found in umbilical cord plasma of any of the subjects.

These results may be helpful to elucidate the cause of neonatal hemorrhagic disease occurring a few days after birth which appears to be at least in part responsive to vitamin K therapy.

*所在地：〒606 京都市左京区吉田近衛町

血液凝固系に關与するビタミンK類¹⁾〔主として vitamin K1 (phyloquinone, K1 と略す), と vitamin K2 (menaquinones family の側鎖数 n により MK- n と略す)〕, は欠乏すると出血性疾患をきたし, 特に新生児, 乳児期には欠乏しやすく, 新生児消化管出血や乳児頭蓋内出血をきたす。²⁾ しかも患児は母乳栄養児に多く³⁾, このことが母乳栄養推進にとっての一つの障害となっており, その病因論は不明である。

ビタミンK類 (VKs と略す) のうち現在薬剤としては, ビタミンK1 と, ビタミンK2 のうちで側鎖数 4 の MK-4 が使われている。しかし, この予防のために投与すべき VKs の種類, 投与量, 投与方法等が未だに確立されていない⁴⁾, このような混乱した状況にある背景として VKs の微量測定が困難で, 報告者により生体内濃度の値がまちまちであることが挙げられる。そのために必要最少量すらまだ確立されておらず, また VKs が脂溶性ビタミンであることを考えると, 過剰投与により蓄積されやすいので, 副作用の検討と最大許容量の確立も, 早急に解明されなければならない問題点である。

今回私達は高速液体クロマトグラフィー (HPLC と略す) を用いて, 胎盤組織中 VKs 濃度をはじめて測定し, さらに母体と臍帯の血漿中濃度をも測定し比較検討を加えた。

対 象 と 方 法

1. 対象

昭和 60 年 6 月から 12 月の間に神戸市須磨区愛育産婦人科にて, 妊娠分娩経過に異常のなかった 15 例を対象とした。

15 例の妊婦の平均年齢は 27 歳 (22-35 歳), 新生児の平均体重は 3020 g (2710-3500 g), 平均在胎週数は 39 週 (37-41 週), 平均アプガール・スコアは 9.2 点 (8-10 点), 全例経膣頭位分娩であり新生児にも異常は認められなかった。

試料採取に際しては前もって患者に説明し了解の得られた症例に限った。そのうちの 2 名の妊婦には分娩予定日 1 ケ月前から MK-7 を豊富に含む納豆⁵⁾ を隔日毎に約 30 g 摂取させた。なお, これら妊婦の住む地域には, 食生活面で東日本方面によくみられるような, 納豆を日常一般に摂取する習慣はない。

2. 胎盤中 VKs の測定方法

胎盤試料の前処理とその HPLC 条件を図 1 に示す。標準品の溶出パターンを図 2-a に示すように MK-4, K1, MK-6, 7 の順に完全に分離溶出した。各 MK- n の側鎖数とその保持容量 k' の $\log$ 値との間には図 2-b に示すような, 相関係数 0.999 の直線関係が成立するので,

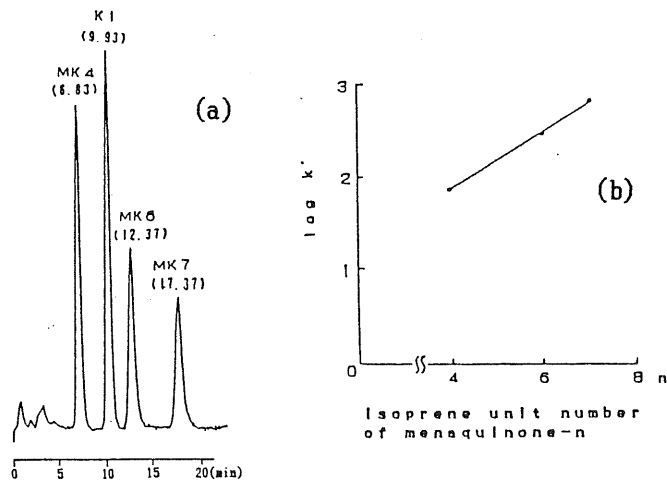


Fig. 2.

- (a) Elution profiles for a standard solution of K1, MK-4, MK-6 and MK-7.
 (b) Relationship between the common logarithm of the Capacity Ratio (k') and isoprene unit number of menaquinone- n .

他のMK- n の確認に役立つ。

胎盤中VKsの溶出パターンを図3-aに示すように、この例ではMK-4, K1, MK-7が検出された。図3-bは胎盤試料に標準品を添加したもので、各々の標準品は胎盤試料中のVKsと完全に一致した。図3-cはより多くの標準品を添加したもので、各々のピーク面積は添加量に応じて拡大した。図3-dはcのサンプルを還元反応試薬の混合停止した時の溶出パターンであり、各々のVKsピークは消失した。

本法の回収率はK1=67%, MK-4=69%, MK-6=66%, MK-7=64%であった。標準品K1, MK-4の定量限界は50 pgで、MK-6, 7は100 pgである。胎盤試料g当たりの検出限界は各々0.1 ngと0.2 ngである。

3. 血漿中VKsの測定方法

採血方法は児が娩出してから、臍帯血は臍帯を結紮切断した後に胎盤側の臍帯静脈よりヘパリン添加にて15 mlを採血し、同時に母体の肘静脈からも5 mlを同様に採血し、直ちに遠沈し血漿部分を採取し試料とした。

血漿試料の前処理とそのHPLC条件を図4に示す⁶⁾。血漿中には胎盤中よりも盲蛍光物質が少いためにTLC操作を省くことができるが、VKs含有量も少いために微量定量を可能

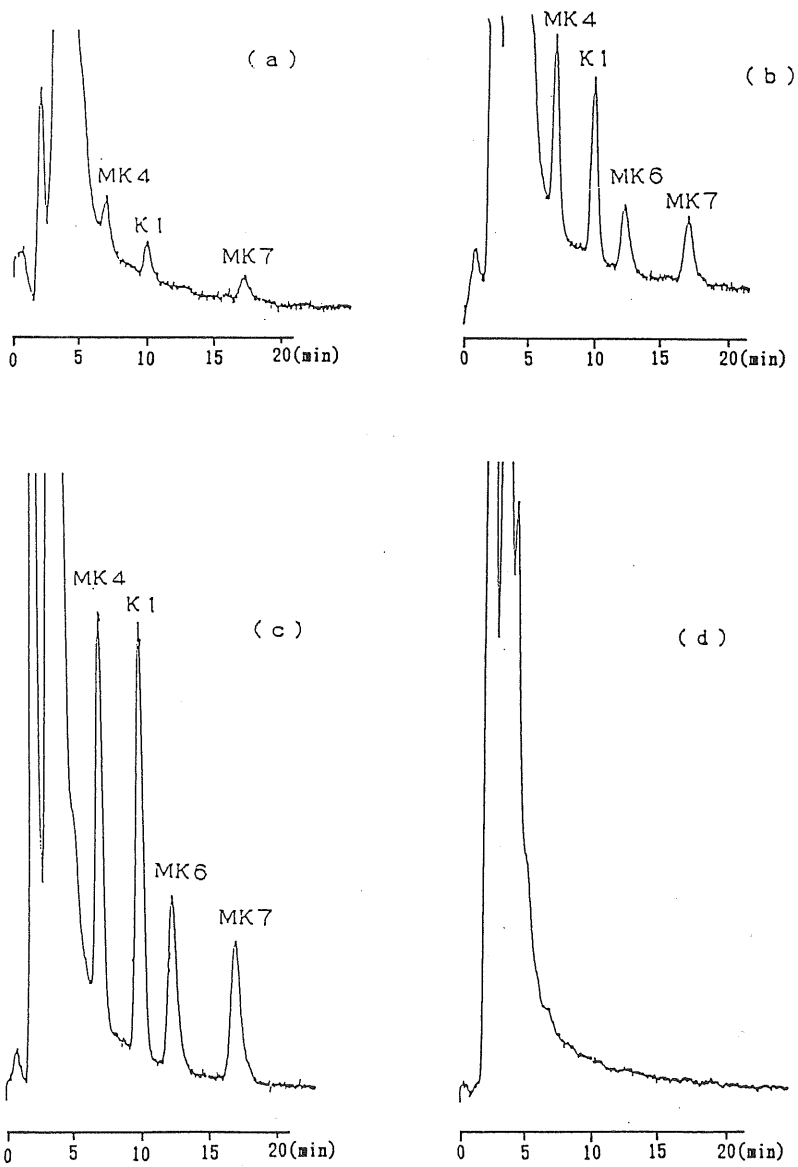
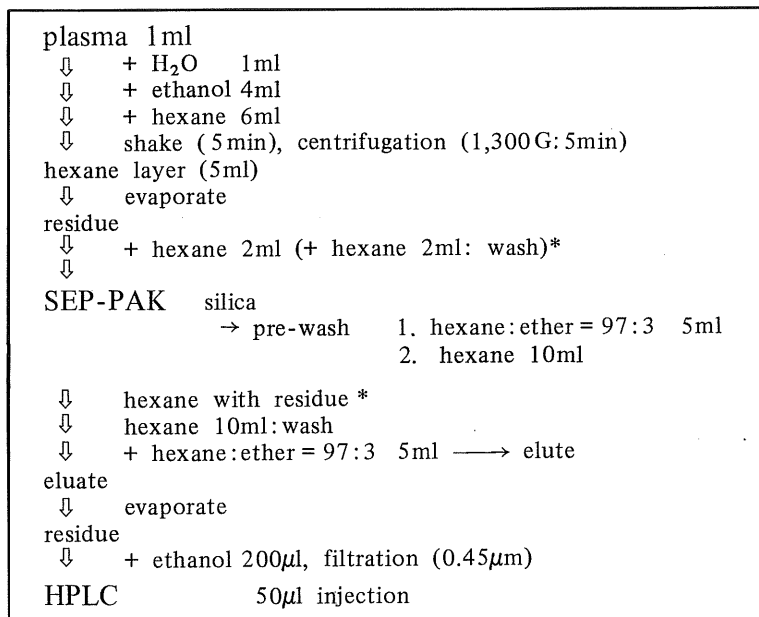


Fig. 3.
 Elution profiles for K vitamins of placenta
 (a) : not added
 (b), (c) : added
 (d) : on reduction of the sample (c)



HPLC Conditions

1. Mobil phase: 92.5% ethanol, containing 0.25% NaClO₄
Ar gas bubbling
- ↓
2. Guard cell: potential -1.0V
- ↓
3. Pump: flow rate 1ml/min
- ↓
4. Injection: sample 50μl
- ↓
5. Column: Nucleosil 5C-18, (15cm × 4.6mm I.D.)
- ↓
6. Coulochem: reduction potential
electrode (1) +0.25V
electrode (2) -0.55V (*electrochemical reduction)
- ↓
7. Fluorometer: detect
Excitation 320nm
Emission 430nm
- ↓
8. Recorder: peak area

Fig. 4. Assay procedure for k vitamins in plasma

とすべく、従来のNaBH₄を加える化学的還元法を用いずに、電圧を負荷して電気化学的に還元した。これにより本法の定量限界は標準品のK1とMK-4で5pgとなった。それでもなお臍帯血漿では非検出となることが多かったので、母体血漿の1mlに比べより多くの臍帯血漿(5ml)を使用した。図5に溶出パターンを示す。本法により血漿1mlに0.3から3ngのK1とMK4を添加して求めた回収率はほぼ100%と定量的であった。

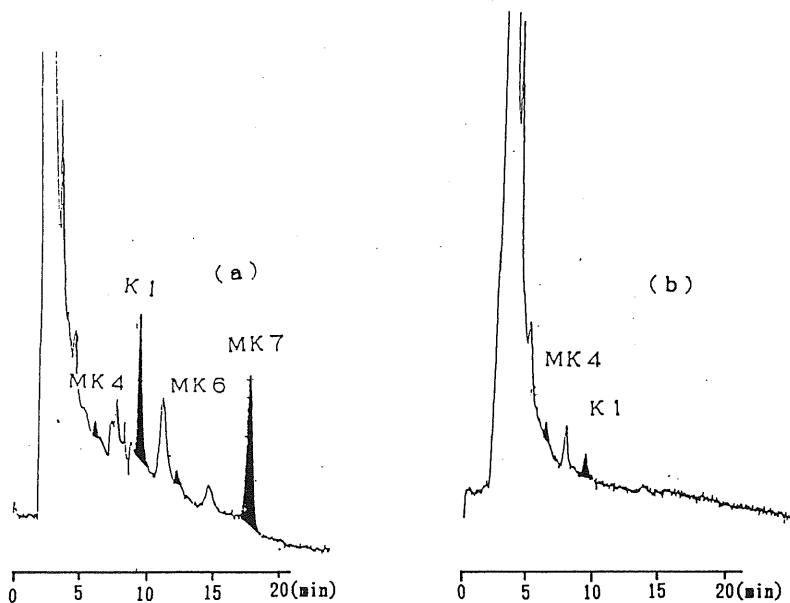


Fig. 5.
Elution profiles for K vitamins of plasma
(a) : maternal plasma, 1 ml
(b) : umbilical cord plasma, 5 ml

結 果 と 考 察

胎盤組織中 VKs 濃度と母体と臍帯の血漿中 VKs 濃度を表 1 に示す。

- (1) 胎盤中に初めて VKs の内, K1, MK-4, 7 の存在がすべての例に確認できた。MK-6 は 15 例中 4 例に確認できた。
- (2) 母体血漿中にも VKs の内, K1, MK-4, 6, 7 を測定した。
- (3) 納豆を積極的に摂取した B 群の 2 例には, 胎盤と母体血漿中に有意に高濃度の MK-7 を認め, これから血漿中 VKs 濃度は食事の影響を敏感に受けていると考えられる。
- (4) 臍帯血漿中から VKs の内, K1 と MK-4 を初めて確認した。K1 は母体の約 10 %, MK-4 は母体よりも高濃度の例があった。K1 と MK-4 は各々分子量が 451 と 445 でほぼ等しく, この 2 つが重要な生理作用を担っていると考えられる。胎児に必要な量だけを何らかのコントロールの下に, 母体から胎児側へ移行させていると思われ, 今後これらの事柄について検討を要する。
- (5) 納豆を摂取しても臍帯血漿中には MK-7 を検出することができなかった。しかし, 納豆

摂取量の多い東日本に乳児頭蓋内出血の頻度が低いことから、MK-7等の側鎖の長い K2 は、食物あるいは腸内細菌から吸収されて、酵素等によって側鎖が切られてより有効な MK-4 として使われるのかも知れない。

- (6) 胎盤中の平均 MK-4 は母体血漿中の 20 倍以上の高濃度で、全ての例で母体よりも高濃度であった。これから、MK-4 が胎盤に蓄えられていると仮定すると、一般にヒト以外のホ乳

Table 1. Endogenous concentrations of K vitamins in human placenta and in paired samples of maternal and umbilical cord plasma.

A Group : with normal diet.

B Group : with diet addition of fermented soybeans(Natto) on alternate days for 1 month before delivery.

	Sub. no.	Placenta (ng/g)				Maternal (ng/ml)				Cord (ng/ml)	
		K1	MK-4	MK-6	MK-7	K1	MK-4	MK-6	MK-7	K1	MK-4
A	1	1.82	1.98	0.51	0.86	3.81	0.09	0.56	n.d.	0.07	0.04
	2	0.66	0.93	0.51	0.36	3.64	0.05	0.99	1.41	0.10	0.05
	3	1.25	0.38	0.61	1.92	2.64	0.10	0.94	n.d.′	0.05	0.02
	4	1.35	1.49	n.d.	0.74	2.41	0.05	n.d.′	0.14	0.21	0.07
	5	1.13	0.38	n.d.	0.64	1.63	n.d.′	0.14	0.49	0.26	0.02
	6	1.46	1.47	n.d.	0.44	1.47	0.05	0.14	1.41	0.05	0.02
	7	1.25	1.17	n.d.	0.79	1.28	0.05	0.12	0.98	0.10	0.07
	8	1.85	0.59	n.d.	1.78	1.12	n.d.′	n.d.	0.98	0.08	n.d.″
	9	1.50	2.04	n.d.	1.36	0.60	n.d.′	n.d.′	0.84	0.05	0.05
	10	1.30	1.56	n.d.	2.13	0.35	n.d.′	n.d.′	1.97	0.03	0.02
	11	0.85	0.67	n.d.	1.35	0.32	n.d.′	0.19	0.84	0.07	0.03
	12	0.92	1.10	n.d.	1.24	0.27	0.09	n.d.′	n.d.′	0.11	0.06
	13	0.64	0.81	n.d.	0.48	0.25	0.10	n.d.′	n.d.′	n.d.″	0.05
	Mean	1.23	1.12	0.13	1.08	1.52	0.04	0.24	0.70	0.10	0.04
B	14	0.94	0.53	n.d.	6.69*	1.77	0.09	0.10	2.95*	0.11	0.02
	15	2.24	2.55	0.38	14.95*	1.47	0.06	0.14	4.15*	0.24	0.03
	Mean	1.59	1.54	0.19	10.82*	1.62	0.07	0.12	3.55*	0.18	0.03
Total											
Mean		1.28	1.18	0.13	2.38	1.54	0.05	0.22	1.08	0.11	0.04

n.d. = not detected ($< 0.20\text{ng/g}$, $' < 0.05\text{ng/ml}$, $'' < 0.01\text{ng/ml}$)

* Significant difference ($p < 0.001$) as compared to group A.

類では児娩出後に母親が胎盤を食することが知られており,再び母乳として胎盤中の MK-4 が経口的に新生児へ移行するというサイクルが存在すると考えると, ヒトではこのサイクルが断たれたことが, 母乳栄養児に VKs 欠乏性の出血症が多いことの病因論の解明の一つの原因になるのではないかと考えられる。

以上の推論を立証するには, 羊水, 胎便, 母乳中の VKs の測定と由来など, 胎児と乳児をとりまく全環境での VKs の動的な移行の研究が必要と考えられる。

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, p. 245-270, (1983).
2. 馬場一雄 (1982), 周産期医学, 12:1017
3. SAVAGE, O., J. LINDENBAUM: Clinical and experimental human vitamin K deficiency. (edited by Lindenbaum J. : Nutrition in hematology), Churchill Livingstone, New York, p. 271-350, (1983).
4. 長尾 大 (1986), 周産期医学, 16:573
5. 平内三政, 坂野俊行: 食物中のビタミン K 類の測定, 第 38 回日本ビタミン学会, 1986. 5. 8-9
6. HIRAUCHI, K., T. SAKANO and A. MORIMOTO (1986) Chem. Pharm. Bull. 34:845