

ラット精巣におけるビタミン K₁ 及びメナキノロン - 4 投与後の ビタミン K 類の動態について

肥後 匡子¹⁾・平池 秀和²⁾・木村 美恵子¹⁾・糸川 嘉則¹⁾

(¹⁾京都大学医学部衛生学教室*, (²⁾鈴鹿医療科学技術大学医療栄養**)

Dynamics of K vitamins in Rats Testis After Giving Phylloquinone or Menaquinone-4

Kyoko HIGO¹⁾, Hidekazu HIRAIKE²⁾, Mieko KIMURA¹⁾ and Yoshinori ITOKAWA¹⁾

¹⁾Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University,

²⁾Department of Clinical Nutrition, Faculty of Health Science,

Suzuka University of Medical Science and Technology

The investigation of vitamin K analogues (VKs) in animal body is difficult because of its low concentration. Recently we found that rat testis contains considerable high concentration of VKs. There are consisted with small quantity of phylloquinone (K₁), menaquinone (MK)-6 and large quantity of MK-4 (20.70±5.05ng/g). In this study, the chronological changes in the amount of VKs in the testes of rats by oral administration of K₁ or MK-4 (1×10⁻⁵mol/kg body weight) were measured. In K₁ administered group, the amount of K₁ increased at first, followed by K₁ decrease and MK-4 increase. In MK-4 administered group, the amount of K₁ does not change, keeping the same small amount as the control group, but only the MK-4 amount increased. These results indicate that K₁ is rapidly changed to MK-4, so that MK-4 may be the biological form in the body.

ビタミン K 類 (VKs) はその生理学的機能として、血液凝固系や骨代謝系に関与していることが知られており、現在我国でも術後の患者や新生児・乳児に対し止血剤或は出血予防剤として使用されている。しかし、VKs は、その定量的な分析の困難さから、生体内分布や代謝回路を含む詳細な生理的・薬理的解明が遅れたまま使用されているのが現状で、例えば、最低摂取必要量が確立されておらず、脂溶性ビタミンであるための、過剰投与に対する懸念や投与の必要性を疑問視する報告もある¹⁾。また、

*所在地：京都市左京区吉田近衛町 (〒606)

**所在地：三重県鈴鹿市岸岡町1001-1 (〒510-02)

生物活性に関しては、メナキノン (MK)-4 が速効性に優れているとの報告があるものの、生体内活性型は解明されないまま、 K_1 と MK-4 の両者が製剤として市販・使用されている。当研究室では、これまでにラットの血漿及び脳組織において、投与された K_1 が MK-4 に変換されることを明らかにしてきた²⁾。本実験では、摂取された VKs, 特に K_1 と MK-4 の精巣における変換について検討した。

実験方法

動物は、8週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。ラット60匹を24時間絶食後30匹ずつ2群に分け、一群には K_1 を、他群には MK-4 を、各々 1×10^{-5} mol/kg body weight 経口投与した。投与後15, 30分, 1, 3, 6, 12時間と経時的に各群5匹ずつネブタール麻酔下で採血・脱血した後、精巣を摘出して試料とした。対照群としては生理食塩水投与の5匹を用いた。VKs は平内らの方法³⁾、すなわち、3倍量の66%イソプロパノールでホモジナイズの後ヘキサンで抽出し、SEP-PAK CILICA 処理にて精製、サンプルとした。検出には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 白金カラム還元蛍光法を用い、蛍光性ヒドロビタミン K として検出・定量した⁴⁾。また、白金カラムによる還元反応を省略すること (no reduction) で VKs のピークを消失させ、VKs が否かの確認をとった。尚、本実験での検出限界は、10pg/ml であり、VKs の回収率は、 $K_1=90.4\%$ 、MK-4=82.1%、MK-6=78.2%であった。データの統計処理には Hotelling の T^2 検定法を用いた。

結果と考察

上記 HPLC はシステムによるクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す。a は精巣試料のもので K_1 、MK-4、MK-6 が検出された。b は a に標準品を添加したもので、 K_1 、MK-4、MK-6 のピークは精巣試料中の各 VKs と一致していた。c は a のサンプルを no reduction で検出したもので、VKs のピークは消失した。対照群及び VKs 投与群の精巣中 VKs 濃度は Table 1 に示した。対照群では、MK-4 が 4.6×10^{-2} nmol/g と最も高かった。これは、ラットの脳中の 5.5×10^{-3} nmol/g や血漿中の検出限界 ($< 5 \times 10^{-4}$ nmol/ml) 以下²⁾、ヒトの胎盤組織中の 2.5×10^{-3} nmol/g や母体血漿・臍帯血漿中の 9.0×10^{-5} nmol/ml⁵⁾ に比して約10~500倍であった。また、MK-6 が 5.5×10^{-4} nmol/g 存在し、ラット生体内で初めて MK-6 が検出された。 K_1 投与群では、 K_1 は投与15分後より緩やかに増加し始め、6時間でピークに達した後12時間で減少したが、MK-4 は投与していないにもかかわらず、投与後3時間より増加し始め、12時間後まで増加し続けた (Fig. 2)。MK-4 投与群では、MK-4 は投与後1時間で増加し始め12時間まで上昇し続けたが、 K_1 は経時時間別で有意な差は認められず、対照群のものと同様に少量であった (Fig. 3)。以上のことから、投与された K_1 は MK-4 へと変換するが、MK-4 は K_1 に変換されることはないと考えられる。更に、 K_1 投与群と MK-4 投与群における MK-4 濃度の経時変化には、有意差はなく、取り込まれた K_1 は速やかに MK-4 へと変換されることが示唆される。一方、MK-6 についても、MK-4 投与群の投与後6時間を除いて、両投与群とも対照群に比してやや高くなっているものの、投与群間や経時時間別で有意な差は認められなかった。

ラット精巣において、かなり高濃度な MK-4 が存在すること、血漿や脳と同様に K_1 から MK-4 への

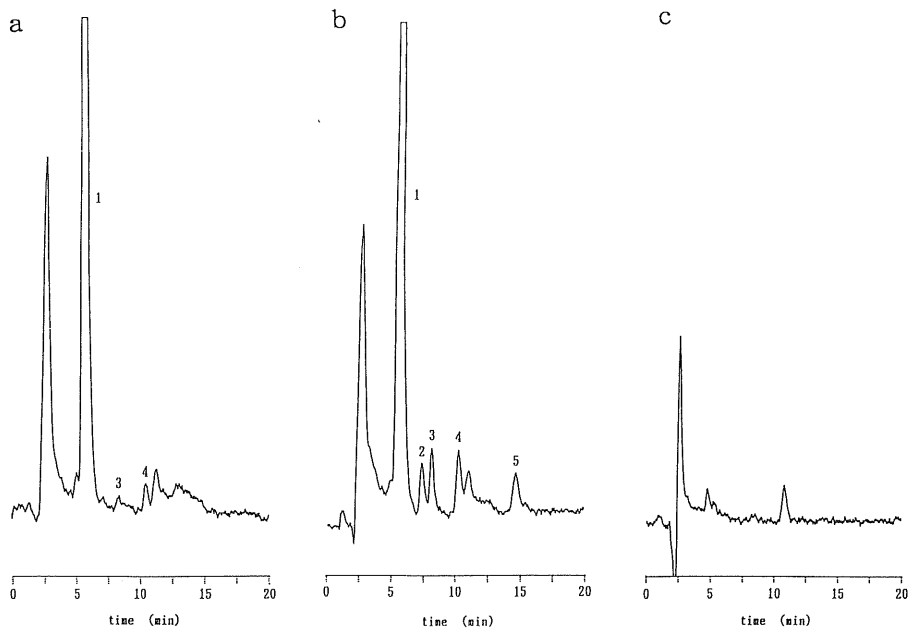


Fig. 1. Chromatograms of K vitamins in rat testis.

a : not added standard

b : added standard

c : no reduction of sample a

Peaks : 1 = MK-4, 2 = MK-5, 3 = K₁, 4 = MK-6, 5 = MK-7

Table 1. Concentration of K vitamins rat testis (ng/g).

time (hr)	MK-4	K ₁	MK-6
K ₁ administered group.			
0.25	24.38±5.78	0.97±0.92	1.24±0.50
0.5	18.29±1.51	1.30±0.79	0.71±0.36
1	21.58±3.43	4.71±2.59	1.89±1.19
3	33.87±3.56	13.13±3.17	1.02±0.38
6	48.19±6.55	19.13±2.36	1.15±0.54
12	74.37±5.92	9.55±3.15	1.01±0.54
MK-4 administered group.			
0.25	21.95±3.65	0.35±0.22	0.90±0.41
0.5	21.34±3.89	0.48±0.10	0.65±0.44
1	26.23±2.89	0.23±0.12	1.27±0.74
3	46.83±7.08	0.31±0.11	0.88±0.53
6	40.59±3.76	0.32±0.05	0.10±0.30
12	51.28±13.91	0.33±0.17	0.84±0.60
Control group			
	20.70±5.05	0.30±0.05	0.32±0.44
nM/g	4.6×10 ⁻²	6.7×10 ⁻⁴	5.5×10 ⁻⁴

Values are mean ± SD.

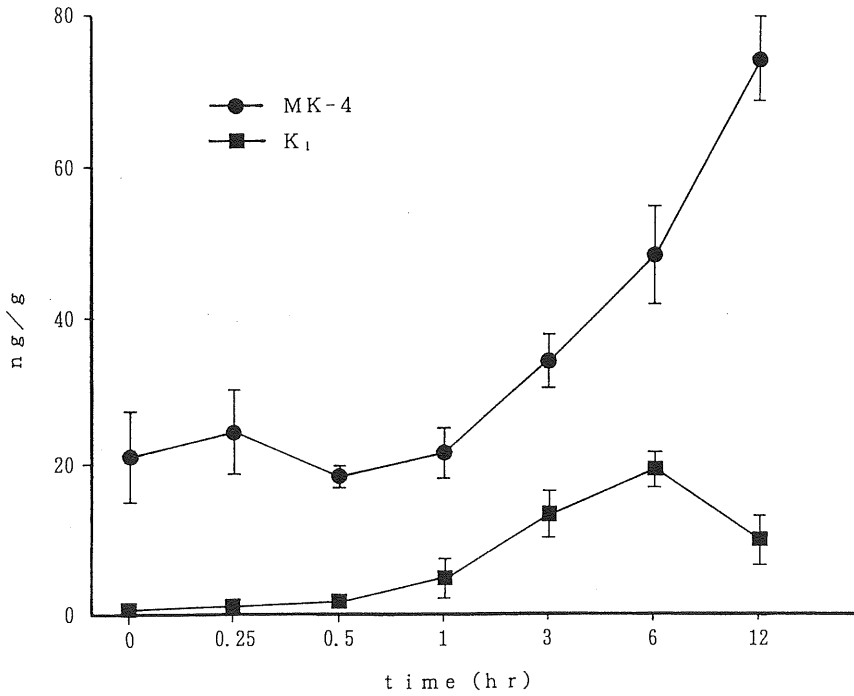


Fig. 2. Concentrations of K₁ and MK-4 in K₁ administered rat testis. Values are mean ± SD.

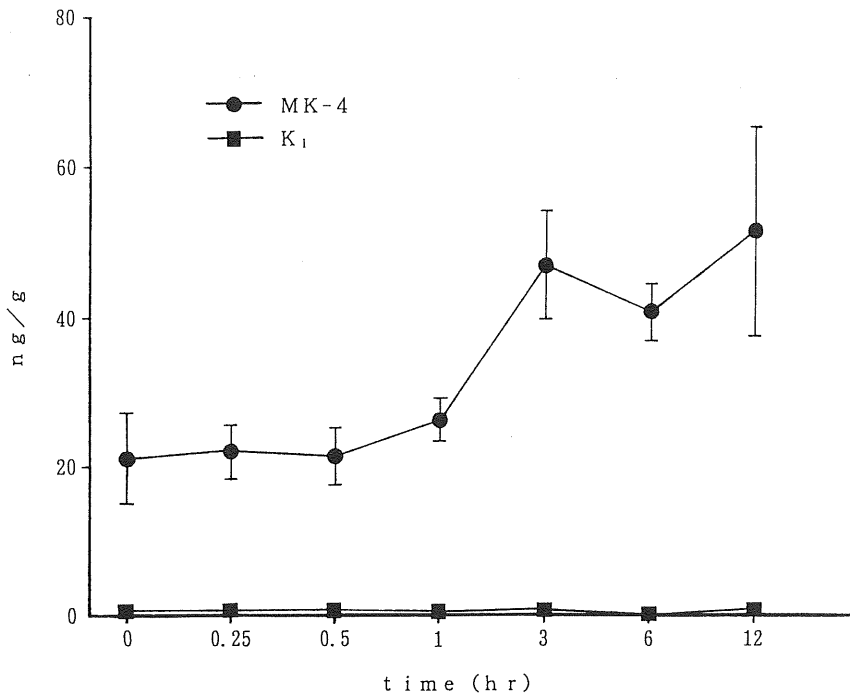


Fig. 3. Concentrations of K₁ and MK-4 in MK-4 administered rat testis. Values are mean ± SD.

変換が確認されたが、MK-4 から K₁ への変換は認められなかったことから、MK-4 が生体内活性型である可能性が示唆される。また、個体によっては検出されないこともあったが、MK-6 も微量に検出されており、K₁ から MK-4 への変換を含めたその他の VKs 代謝回路の検討も、今後の課題と考えられる。一方、ヒト血清に存在する protein S は VKs 依存性血液凝固因子の1つであることが知られているが、このタンパク質は、アンドロゲン（男性ホルモン）binding protein と同じ C 末端構造をもっているという Baker⁶⁾ や Gershagen⁷⁾ の報告があり、現在精巢に存在する高濃度な VKs の存在理由や作用機序等について検討中である。

文 献

- 1) 小代正隆, 竹乃下満, 年永隆一, 島津久明 (1992) 日本外科学会誌 93 : 3
- 2) 三浦みどり, 平池秀和, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1990) ビタミン 64 : 459
- 3) 平内三政, 板野俊行, 野津本茂, 長岡忠義, 森本厚, 藤本恭子, 増田佐智子, 鈴木由紀子 (1991) ビタミン 65 : 13
- 4) HIRAIKE, H., M. KIMURA and Y. ITOKAWA (1988) J. Chromato. 430 : 143
- 5) 平池秀和, 関根健二, 木村美恵子, 糸川嘉則, 微量栄養素研究 3 : 175
- 6) BAKER, M.E., F.S. FRENCH and D.R. JOSEPH (1987) J. Biochem. 243 : 293
- 7) GERSHAGEN, S., P. FERNLUND and A. LUNDWALL (1987) FEBS Lett. 220 : 129