

ビタミン K₃ の定量化へ向けた計測システムの開発

Development of the experimental setup to assess the Vitamin K₃'s fluorescent characteristics

○ 澤田 滯（芝工大） 須原 義智（芝工大） 渡邊 宣夫（芝工大）

Mio Sawada, Yoshitomo Suhara, Nobuo Watanabe
Shibaura Institute of Technology University

Abstract: Vitamin K₃ (VK₃) is believed to play an important role in the body. However, we do not know about the role of the VK₃ in vivo. VK₃ is highly volatile and easily oxidized substance. For this reason it is difficult to measure the VK₃. That's why its research has not ever been enough progressed. Therefore, we thought it possible to quantify the VK₃ by the fluorescence measurement using the VK₃'s auto-fluorescence. Consequently, the purpose of this study is to quantify the relationship between VK₃ concentration and fluorescence amount. In order to achieve our aim, we constructed special experimental setup. Preliminary study showed slight noise. Further modification of setup was performed incorporating a chamber with a non-fluorescent glass for better experimental reproducibility.

Key Words: Vitamin K₃, Fluorescence detection, Quantification

1. 研究背景

ビタミン K 類（以下 VK）は天然には VK₁ と VK₂ の二種類が存在している。一方、VK₃ は合成品であり天然の VK の側鎖部分を持たない化学構造をしている。近年の研究で、VK₂ の一つであるメナキノン-4（以下 MK-4）は体内で重要な役割を担っている⁽¹⁾ことが明らかになった。また、食事から摂取された VK は MK-4 に変換され⁽²⁾、体内の様々な組織内に蓄積されることも解明⁽³⁾されている。VK₃ はその変換反応の中間体である。このことはすでにいくつかの疫学研究⁽⁴⁾から、VK₁ や VK₂ の血中濃度を調べることにより明らかにされている。もし血中の VK₃ 濃度を測定することができれば、従来知られていない新たな疾病との関連性が明らかになると思われる。しかしながら、VK₃ は体内に数 [pmol/L] しか存在していないと考えられているが、測定が困難で研究は未だ行われていない。このような背景のもとに、本研究において我々は高感度で安定して血中の VK₃ 濃度を測定する方法の開発を目指すことにした。

先行研究調査の結果、VK 類の計測法として、蛍光検出法が用いられている⁽⁵⁾ことが判明した。蛍光検出法では、VK が還元されるとヒドロキノン体になり、蛍光特性を持つことを利用している。しかしながら、VK₃ はすぐ酸化してしまうこと、そして揮発性が非常に高いことから従来の計測機器では正確な蛍光量測定が行われていない。従って、VK₃ 含有量と蛍光量の関係性は未だ知られていない。以上から、我々はヒドロキノンの蛍光特性に着目し、VK₃ 濃度と蛍光特性の相関性を評価するための実験システムを構築する事を本研究の目的とした。

この目的を達成するために、我々はまず一般的に使用されているソーダ石灰ガラスよりも紫外線透過率が高いパイレックスを使用した毛細管を用意した。このパイレックス管に、還元された VK₃ を溶かしたメタノール溶液を封入した。このサンプルに励起光である紫外線を照射し、VK₃ の蛍光を光子カウンティングし計測を行った。その結果、VK₃ 濃度が 0.001% まで計測可能となった⁽⁶⁾。しかしながら、先行研究⁽⁷⁾では高速液体クロマトグラフィ (HPLC) と蛍光光度計を用いて 0.0001% まで計測されている。さらに計測精度を向上させ、低濃度の VK₃ を計測するためには、ノイズを低減させる必要がある。このノイズの原因として、パイレックス管による光の反射や蛍光の影響があると考えた。そこで、本研究において我々は光がほぼ反射しない無蛍光

ガラスを用いた新たな実験システムの構築を試みた。

2. 方法

2.1 実験システムの概要

VK₃ の還元体であるヒドロキノンの蛍光量測定を可能にする実験システムを構築した。その実験システムの概要図を Fig.1 に示す。システムに使用した機器は、パルス分解能が 20[ns]・計測感度ピークが 400[nm] の光子カウンティングヘッド（浜松ホトニクス，H10682-210，以下 PTM）と倒立顕微鏡（OLYMPUS，IX71），蛍光ミラーユニット（OLYMPUS，U-MWU2），光源として水銀ランプである。薬品はメタノール（和光，試薬特級）とビタミン K₃（和光，和光特級）を還元したものを使用した。

VK₃ の計測では、ヒドロキノンによる蛍光量が微小だと想定されるため、より励起光・蛍光を集光できる顕微鏡を用いた。顕微鏡に C マウントで PTM を接続し、PC 上に光子数を出力させた。その際、PTM に外部光が入射しないよう、暗幕下で光を遮断した。顕微鏡に励起フィルター 330～385[nm]，吸収フィルター 410[nm]，C マウント接続部に 430[nm] のローパスフィルターをいれた。また、対物レンズは 60 倍を使用し、C マウント接続部に 0.5 倍レンズを接続した。以上が実験システムの概要である。

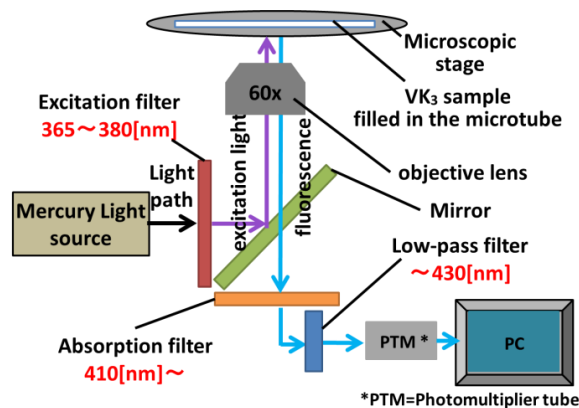


Fig. 1 Schematic drawing of our experimental system to quantify the VK₃ concentration through the fluorescent microscopy

2.2 新チャンバーの製作

次に VK_3 溶液が酸化・揮発しないように密閉型のオリジナルチャンバーを製作した。このチャンバーにおける観察面には無蛍光ガラスを用いてノイズ等の削減を目指した。Fig.2 にその概略図を示す。上下からアルミ材で無蛍光ガラス(松浪硝子, S-0313)を挟み込み圧着させる。上のアルミ板には細い流路を深さ 0.7[mm]，幅 1.0[mm]，長さ 35[mm] の寸法で設け，そこに VK_3 のサンプルを流入可能にした。また下のアルミ板には観察用の窓を設け，そこから流路観察および蛍光特性評価ができるようにした。実際の装置を Fig.3 に示す。

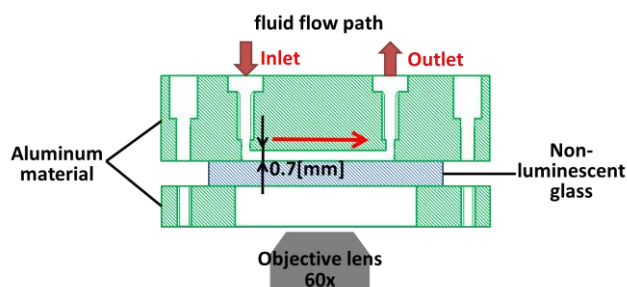


Fig.2 Newly prototyped flow chamber containing the non-luminescent glass plate and the aluminum metal plate for the microscopic evaluation

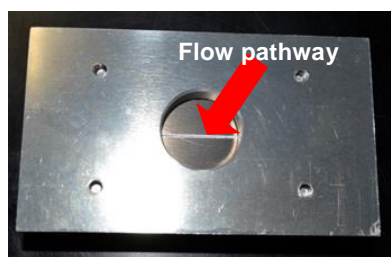


Fig.3 Bottom view of the flow chamber

2.3 ネガティブコントロール実験

上記の装置を用いて，将来的にメタノール溶液中の VK_3 濃度を測定することを想定し，ネガティブコントロール実験を行った。使用したガラスはソーダ石灰ガラス板(松浪硝子, S9213)，パイレックス管，無蛍光ガラスの三種類である。ソーダ石灰ガラス板では，板の上にメタノールを 40[μ L] 滴下し，その上からカバーガラスをかけて計測した。パイレックス管では管の中にメタノールを充填し，管の先端に粘土で封をし計測をした。そして無蛍光ガラスは新チャン

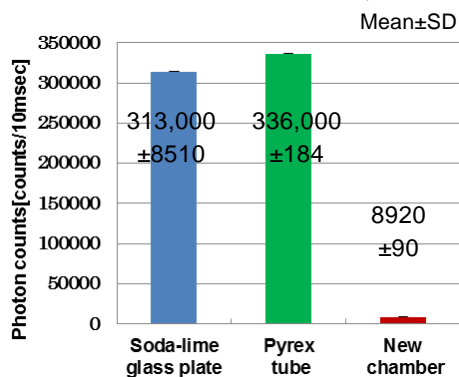


Fig.4 Result of negative control studies as shown by the detected fluorescence within 10 milliseconds

ンバーに挟み，流路にメタノールを充填させ計測した。今までのデータと比較するために流れは生じさせず行った。その結果を Fig.4 に示す。この図はソーダ石灰ガラス板とパイレックス管と無蛍光ガラスを用いた新チャンバー，それぞれの蛍光量を 10[msec]毎に計測した結果を Mean \pm SD で示したグラフである。ソーダ石灰ガラス板は標準偏差が 8510[counts/10msec]と非常に高く，データ毎に差が生じた。パイレックス管は標準偏差 184[counts/10msec]とソーダ石灰ガラス板よりも低くなったが，平均で約 33 万 [counts/10msec]以上の値が出力された。一方新チャンバーでは平均 8920[counts/10msec]，標準偏差 90[counts/10msec]と最小値となった。

2.4 考察

Fig.4 のネガティブコントロール実験結果から，新チャンバーで無蛍光ガラスを用い計測を行うと，計測値は 8920[counts/10msec]となった。今までのソーダ石灰ガラス板やパイレックス管は計測値が約 32 万 [counts/10msec]であったの為，約 92.2%のノイズを低減できた。また計測結果の SD 値も同様に，ソーダ石灰ガラス板よりも新チャンバーは約 94.6%低減出来た。これは計測毎のデータの変化が小さくなり，より安定した計測が新チャンバーで可能となったと考えられる。パイレックス管よりも計測値がはるかに下がった理由として，励起光の反射が考えられる。パイレックス管は円形状になっている為光が反射しやすく，計測値が大きくなった。一方，新チャンバーは板状であり，反射率が低いと考えられる。よって，この新チャンバーで VK_3 の濃度計測がより高精度で可能になると予想する。

3. まとめ

本研究において，我々は VK_3 濃度計測のため無蛍光ガラスを用いた新たな実験システムを構築した。その結果，従来のパイレックス管を用いたシステムよりもノイズを 90%以上低減することに成功した。

謝辞

本研究は，2015 年度公益財団法人精密測定技術振興財団から研究助成を頂いた。また，松浪硝子工業株式会社より無蛍光ガラス等無償でご提供頂いた。ここに深く感謝申し上げる。

参考文献

- (1) M. Yaguchi, K. Miyazawa, M. Otawa, T. Katagiri, J. Nishimaki, Y.Uchida, O.Iwase, A.Gotoh, Y. Kawanishi & K.Toyama: Leukemia, Vol.12, pp.1392, 1998
- (2) M. Billeter, W. Bolliger & C. Martius : Biochem. Z, Vol. 340, pp.390, 1964
- (3) K. Nakagawa, Y. Hirota, N. Sawada, N. Yuge, M. Watanabe, Y. Uchino, N. Okuda, Y. Shimomura, Y. Suhara & T. Okano: Nature, Vol. 468, pp.117-121, 2010
- (4) A. M. Huber, K. W. Davidson, M. E. O'Brien-Morse & J. A. Sadowski: J. Nutr., Vol. 129, pp.1039, 1999
- (5) W. V. Taggart & J. T. Matschiner : Biochemistry, Vol. 8, pp.1141-1146, 1969
- (6) M. Sawada, Y. Suhara, & N. Watanabe : 10th SEATUC Symposium, pp.69, 2015, ISSN 1882-5796
- (7) Zhao.C.Z, LI Ying, DU Hong, XU H.J, & JIAO Kui : Chemical Research in Chinese Universities, Vol. 26, No. 5, pp.742-745, 2010