

**Action Mechanism of Anticoagulant-Type Rodenticides, with Special Reference to Deficiencies of Vitamin K-Dependent Clotting Factors.** Tyuzi KUSANO (Faculty of Agriculture, Tottori Univ., Tottori).

抗血液凝固性殺鼠剤の作用機構、特にビタミンK依存性血液凝固因子の減少について 草野忠治(鳥取大学農学部)

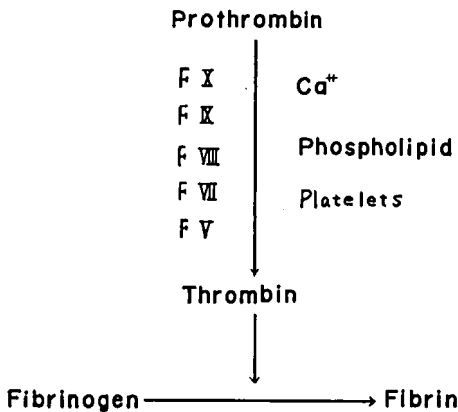
ネズミを駆除する主要な手段は殺鼠剤であるが、殺鼠剤に比べてその開発研究は遅れている。その主要な原因は農薬や防疫薬剤に占める殺鼠剤の比重が小さいことに起因するかもしれない。新殺鼠剤の開発、殺鼠剤の効力増進には合成、製剤化などの化学的、物理的な研究、ネズミ自体の分類、生態などの生物学的研究の必要なことは言うまでもないが、作用機構の研究もまた大切である。偶然の機会に見えられた天然の毒素の化学構造、作用機構の研究結果から、系統的な生理活性物質の合成が行なわれ、天然物よりも効力が優れ、量産化できる新活性物質が創製された例は枚挙にいとまがない。抗凝固性殺鼠剤もまたその良い一例である。生化学、薬理学、生理学の各分野の科学者達が生物の生命現象を解明する一手段として、また殺鼠剤として用いられる化合物が医薬品として用いられている関係上、医療薬剤の薬理を究明する目的から、さらに衛生上の見地から殺鼠用毒物の研究が行なわれている。しかし、ネズミを駆除する見地から殺鼠剤の作用機構を

究明する研究は少ない。

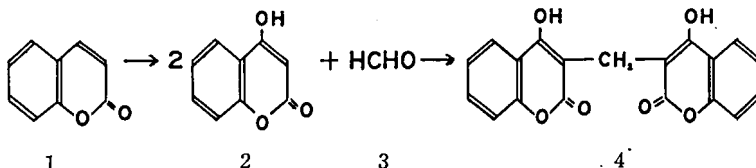
抗凝固性殺鼠剤(クマリン系、インダンジオン系などの化合物のようにビタミンK依存性凝血因子を生成する生体内の作用点を介して凝血障害をひき起こすもの)は周知のように戦後内外で広く使用されている遅効性の殺鼠剤であるが、その作用機構についてはまだ十分確立されていない。この殺鼠剤の主要な作用は血液凝固障害とそれに伴う出血であるが、この血液凝固障害はビタミンK依存性凝血因子(第1図)であるプロトロンビン、第7(FVII)、第9(FIX)、第10(FX)因子の減少によることが知られている<sup>1,2)</sup>。これらの凝血因子群の中で、中毒初期から著しい減少を示すものはFVIIで、次でプロトロンビンが顕著に減少する<sup>4,5)</sup>。このプロトロンビン、FVIIの生体内の合成を阻止する機構について現在までいくつかの推論や仮説が提出されている。本報告はクマリン系などの抗凝固化合物がどのような機構で血液凝固成分の生成を阻害するかに重点を置いてその作用機構について述べたものである。この綜説が殺鼠剤の発展に何らかの役に立てば幸いである。

1. 抗凝固性殺鼠剤の発見

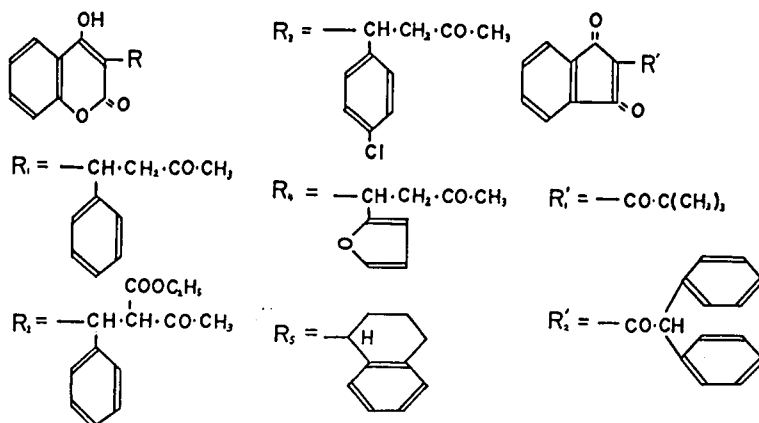
1930年代の初頭カナダのアルバータ州、アメリカのノースダコタ州などの草原地帯で牛の出血性奇病が時々発生していた。これは腐敗したスウィートクローバー中に形成されたダイクマロールによることをLinkらが1933年より約10年間の研究により明らかにした。すなわちスウィートクローバー中に含まれるクマリンが4-ヒドロキシクマリンに酸化され、これがフォルムアルデヒドと縮合して生成される<sup>6)</sup>(第2図)。このダイクマロールの合成に成功してから、多数のクマリン誘導体が合成され、それらの抗凝固活性が家兎で検定された。これらの化合物の中でダイクマロールが最も強い抗凝血作用を示すことが明らかとなった。ところでドイツのR. Anschütz(1903)<sup>17)</sup>により既にダイ



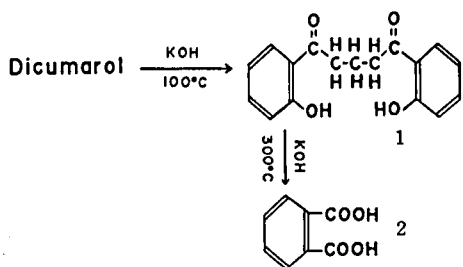
第1図 血液凝固の模式図。Prothrombin, FVII, IX, XはビタミンK依存性血液凝固因子



第2図 クマリンよりダイクマロールの生成。1: coumarin, 2: 4-hydroxycoumarin, 3: formaldehyde, 4: dicoumarol (Link, 1943)



第3図 抗血液凝固性殺鼠剤。R<sub>1</sub>:ワルファリン, R<sub>2</sub>:ネオクマラン, R<sub>3</sub>:トモリン, R<sub>4</sub>:ファミリン, R<sub>5</sub>:エンドロサイド, R'<sub>1</sub>:ピバール, R'<sub>2</sub>:ダイファシノン



第4図 *in vitro* におけるダイクマロールよりサリチル酸の生成。1:1,3-disalicylylpropane, 2:サリチル酸 (Link, 1943)

クマロールの合成法が明らかにされていた。

腐敗したクローバーの乾燥重量の 0.003% (最高) までダイクマロールを含むことがあるが、これだけのダイクマロールを得るのにクマリン0.0026%が必要である。ところで腐敗した乾草の最終のクマリン含量は0.75~1.58%であるので、全クマリン量の内の少量の部分ダイクマロールに転換されることになるという<sup>6)</sup>。

ダイクマロールに対する動物の感受性は種により、異なり、ネズミ、マウスは最も感受性で、次に猫および犬で、最も感受性の低いのは兎、牛、鶏であった。そこで1942年に Link らは野外でネズミ駆除の試験を行ない、有効ではないという結論に達した。しかし1948年にイギリスの O'Conner はダイクマロールをネズミ駆除に利用できることを示唆した<sup>9)</sup>。1946~1948年にネズミ、マウスを生物検定の材料としたとき、No. 63, No. 42 がダイクマロールよりも抗凝血活性の大きいことを知った。そこで1948年にNo. 42 を用いて野外試験を行ない、それがネズミの駆除に有効であることが明らかになった。そこで Link が所属しているウイスコンシン大学の Wisconsin Alumni Research

Foundation の頭文字と Coumarin の “arin” を用いてワルファリン, Warfarin という名前が No. 42 につけられた。そして No. 63 は医薬品として血栓防止などに用いた方がよいことになった<sup>7)</sup>。ワルファリンに類似した作用型式を示す抗凝固系殺鼠剤としてファミリン、ネオクマラン、トモリン、ピバール、ダイファシノン、クマテトラリルなどがある (第3図)。

## 2. サリチル酸転換説

ネズミにダイクマロールを投与したときのプロトロンビンタイムの消長とサリチル酸を投与したときのプロトロンビンタイムの消長が類似していること、投薬後、低プロトロンビン効果の現われるのに12~24時間かかること、ダイクマロールの一次変成物はサリチル酸であること、クマリン化合物の中で硝子管内で化学処理によりサリチル酸またはオルトハイドロキシベンゾイックアシド誘導体を生成する (第4図) もののみが抗凝血活性を示すこと、サリチル酸塩に抗凝血活性のあることから、ダイクマロールは生体内でサリチル酸塩に転化されて低プロトロンビン血症をひき起こすのではないかと考えられた<sup>8,7,9)</sup>。しかし動物の尿からサリチル酸塩やサリチル酸とグルクロン酸の抱合物などが検出されないこと、サリチル酸の抗凝血活性はダイクマロールの約1/2であることから、ダイクマロールの作用機序は生体内でのサリチル酸転換のみで説明できない<sup>10,11)</sup>。家庭にサリチル酸ソーダを経口投与するとプロトロンビンタイムは延長するが、それを静注またはサルファキシジンのソーダ塩 (抗菌作用) と共に経口投与するとプロトロンビンタイムの増加が認められない。一方ダイクマロールは経口、静注により共にプロトロンビンタイムが延長する。このことからサリチル酸ソーダは腸内細菌によりダイクマロールまたはそれに類似した物質に変化してプロトロンビンタイムを延長させることを Jaques and Lepp (1947) は示

峻した。これと全く反対の結果が Meunier (1947) により報告されている。またネズミにダイクマロールと同時にアセチルサリチル酸を投与すると、ダイクマロール単用よりも生存日数は大となり、プロトロンビンタイムの延長の程度もやや低くなり、ダイクマロールの腸管よりの吸収がサリチル酸塩で阻止される可能性があるが Field (1953) は推測した。大量のサリチル酸ソーダは少量のビタミン  $K_3$  に拮抗し、少量のダイクマロールは大量のビタミン  $K_3$  と拮抗することをネズミで Overman ら (1942) は明らかにした。アセチルサリチル酸の低プロトロンビン効果はメナダイオン (ビタミン  $K_3$ ) により阻止される (Field, 未発表<sup>6)</sup>) が、ダイクマロールの低プロトロンビン効果はメナダイオンで抑制されない<sup>16)</sup>。このようにビタミン K とサリチル酸塩との間の関係はビタミン K とダイクマロールの関係と異なっていることは明白である。

ダイクマロール処理家兎の肝臓を乾燥して正常家兎に与えただけでも、プロトロンビンタイムの延長は認められず、尿中にダイクマロールが検出されなかったことから、ダイクマロールは体内で代謝されて非活性なものに変化すると Bayerle and Marx (1948) は結論した。しかし放射性ダイクマロールを投与したネズミの尿からダイクマロールが検出されたが、サリチル酸は検出されていない<sup>18,19)</sup>。ワルファリンのソーダ塩を投与したマウスのプロトロンビンタイム、生存日数はサリチル酸ソーダの経口投与によりなら影響を受けないことを草野 (1956) が明らかにした。更にワルファリン中毒マウスの肝臓の磨砕液の上清あるいは沈澱物を正常マウスに経口投与したが、血液プロトロンビンタイムになんらの異常も起こらない<sup>21)</sup>。これらの事実からクマリン化合物が生体内でサリチル酸に転化されて、抗血液凝固活性を示すことを裏づける資料に極めて乏しいことがわかる。

### 3. 肝臓実質細胞あるいは細網内皮系細胞におけるプロトロンビン、FVII の生成とそれに対する抗凝血化合物の効果

血液凝固因子の生成部位を明らかにすることは抗凝血化合物の作用機構を確立するために重要なことである。ネズミの肝臓の部分切除<sup>22)</sup>、犬の肝臓の全摘出<sup>23)</sup>でプロトロンビンの減少することが明らかにされたが、その後肝臓の全摘出でプロトロンビンのみならず、FV, FVII, フィブリノーゲンも減少することが明白となった<sup>24-27)</sup>。また肝臓実質細胞に障害を与えるクロロホルム<sup>28)</sup>、4塩化炭素<sup>29)</sup>、黄リン<sup>30)</sup>中毒により血液のプロトロンビン、FV の減少することが明らかとなった。またネズミ、猫で肝臓を損傷しないで循環系よりとり除くだけでプロトロンビンタイムの延長することが Urnas (1942) により明らかにされた。ダイクマ

ロール処理ネズミの血液で正常ネズミの肝臓を灌流すると灌流液のプロトロンビン活性度の増加することから、肝臓はプロトロンビンの合成の場であると Lupton (1947) は主張した。その後臓器灌流に基づく実験よりビタミン K 依存性の凝固因子群は肝臓のみならず脾臓、腎臓でも生成されるという<sup>33,34)</sup>。また肝臓細胞の懸濁液が FVII を生成する能力の最も高いことを Prydz は初めて明らかにしたが、更に肝臓のミクロゾーム分割が強いプロトロンビン活性を持ち、ミトコンドリアにはプロトロンビン活性の認められないことが知られている<sup>35-38)</sup>。

犬の脾臓、モルモットの肝臓を灌流すると灌流液に少量のプロトロンビンが現われるに過ぎないが、犬の骨髄を灌流すると、灌流液に顕著なプロトロンビン活性の認められることから、プロトロンビンは骨髄いで生成されると Drinker and Drinker (1916) は主張した。ダイクマロール処理ネズミの肝臓を摘出し、ビタミン  $K_1$  を静注すると、プロトロンビン、FVII の活性が著しく回復すること<sup>40)</sup>、ダイクマロール処理ネズミに肝臓実質細胞の障害 (4塩化炭素) および細網内皮系細胞の填塞 (トリパンブラウ、ソロトラスト) を与えると、ダイクマロール単独処理のときよりも血液凝固障害が著しく、これを回復させるビタミン  $K_1$  量をより多く必要とする<sup>41,42)</sup> ことから、凝固因子は肝臓を含めた細網内皮系細胞で生成されると考えられた。この他にも血液凝固因子の形成が細網内皮系細胞で行なわれることを示唆する資料<sup>43-45)</sup> やまたこれを否定する資料<sup>46-49)</sup> がある。

Barnhart and Anderson (1962) は免疫組織学的方法、蛍光抗体法で犬の肝臓細胞におけるプロトロンビン生成の研究を進めた。そしてワルファリンによる血しょうプロトロンビン値の減少と肝臓実質細胞のプロトロンビンと結合した蛍光度の減少とが一致し、ビタミン  $K_1$  を静注すると、血しょうプロトロンビン値、肝臓実質細胞の蛍光が増大した。そこでプロトロンビンは肝臓実質細胞で生成され、ワルファリンはプロトロンビン合成のある過程を阻止すると彼等は主張している。

### 4. 作用点におけるダイクマロールとビタミン K との競合

ダイクマロール誘導体とビタミン K 型のキノンとの間に化学構造上の類似性があることから、ダイクマロールの抗凝血活性がビタミン K により抑制されるということはある酵素に対する両者の直接の競合に基づくものであると Woolley (1947) は主張した。Witts (1942) はダイクマロールがビタミン K の肝臓における利用を阻止することにより抗凝血活性を遂行し、これは両者の構造の類似性に基づくものであると推論した。

5. プロトロンビン合成酵素の活性原子団としての  
ビタミンKと抗血液凝固剤との関係

ビタミンK欠乏、クマリン系抗凝固物質によるプロトロンビンなどの血液凝固因子の減少はビタミンKの投与で回復するので、ビタミンKはプロトロンビンの構成成分の一部分（あるいは活性基）となり、それをクマリン誘導体が阻止するのではないかと推測された<sup>53,54</sup>が、これは否定されている<sup>55,56</sup>。Quick ら (1951) はビタミンKがプロトロンビン分子の一部分となって作用するのではなく、プロトロンビンを合成する酵素の一部分となるという作業仮説をたてた。そしてプロトロンビン合成能力がプロトロンビンの代謝的消費をはるかに超えるとき、血液プロトロンビン値が維持できるので、プロトロンビンの合成を制御するなんらかの機構が働いていると仮定した。ビタミンKとダイクマロールを1:100の割合で同時静脈注射しても、ビタミンK欠乏犬の血しょうプロトロンビン値に変化のないことから、両化合物は同一の作用点あるいは作用機構に因与していると推測した。すなわちダイクマロールがビタミンKの結合するアポ酵素に対して親和性をもち、ビタミンKとそれとの結合を阻止するという主張である<sup>58</sup>。更にプロトロンビンには活性型と不活性型とがあり、阻害剤がプロトロンビンと結合して非活性型（プロトロンビノーゲン）となっていると仮定し、この不活性型プロトロンビンを活性型に移行させるY因子が存在すると Quick ら (1955) は主張している。

ビタミンKの減少あるいはビタミンKの作用が抑制されると、プロトロンビンの前駆物質プレプロトロンビンは過剰に生成されるが、プロトロンビン量への転換が少ないために、血液凝固障害が起こるという考えもある<sup>60</sup>。しかしビタミンK欠乏、ダイクマロール中

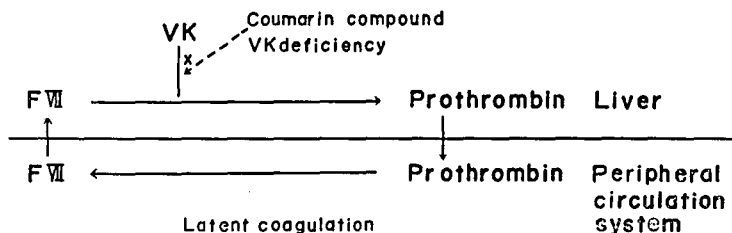
- (1)  $AE + VK \rightarrow AEK$
- (2)  $AEK + D \rightleftharpoons AED + K$
- (3)  $Prothrombin\ X + Y \rightleftharpoons Prothrombin + XY$   
(Prothrombinogen) (Active)

第5図 Quick の学説。AE: Apo 酵素, D: ダイクマロール (Quick ら 1951, 1955)

毒、正常ヒナを用いた実験で上述の考えを支持し得る資料を Losito (1965) は得ることができなかった。

6. 潜在血液凝固説と抗凝血系剤との関係

肝臓のミトコンドリア、ビタミンK<sub>1</sub>、FVIIの混合物からプロトロンビンが生成され、このプロトロンビンの生合成はワルファリン、マルクマール（クマリン系抗凝血剤）により阻止されるが、ダイクマロールにより阻止されない。しかしダイクマロールを多量添加したネズミの肝臓のミトコンドリアにはプロトロンビン生成力が認められない。更にネズミの肝臓のミトコンドリアとプロトロンビンおよびFVIIを除去した血清との混合物よりFVIIが生成され、この際ビタミンKを必要としない。また心臓、腎臓、脾臓、脳、骨髄、肺臓から分離したミトコンドリアにはFVII、プロトロンビンを生成する能力がない。ダイクマロール中毒ネズミの肝臓ミトコンドリアにはFVIIを正常に合成する能力があり、*in vitro*でもFVIIの生合成がマルクマールで阻止されない。血しょうから分離したプロトロンビンを凍結乾燥後融解させ室温に放置するとFVII活性が増加し、凝固後の血清中のFVIIの活性度が增加する。このような実験結果に基づいて、Lasch and Roka (1953, 1954) は次のような潜在血液凝固説を提唱した。肝臓でミトコンドリアを媒体として生成されたFVIIは更にビタミンKを用いてプロトロンビンに転化され、これが血液中に遊離される。血液中ではプロトロンビンは絶えずFVII、トロンビンに転化され、このようにしてできたFVIIが血しょうFVII値を現わすことになる。トロンビンは急速に不活性化されるが、このトロンビンにより少量のフィブリノーゲンがフィブリンに転化される。形成されたフィブリンは血管壁上に薄い膜として層状に重ねられ、血管透過性を制御する。フィブリンの厚さは常に生成されるフィブリノリンにより、一定に保持されている。そして潜在性血液凝固により減少するプロトロンビンは肝臓でFVIIがプロトロンビンに転化されて補充されている。更に猫で血液が肝臓を通過するとプロトロンビン値は上昇し、FVIIは低下する。また過循環（輸血、アドレナリンの注射、過度の体温）では動



第6図 潜在血液凝固説。(Lasch and Roka, 1953, 1954)

静脈間のプロトロンビン値、FVII 値の差異が減少し、緩循環（出血処置など）では増加することから上記の説を彼等は強く主張した（第6図）<sup>64-67</sup>。しかし肺を除きすべての器官の動脈血、静脈血中のプロトロンビン量は同一であることが知られている<sup>68</sup>。犬で門脈血と肝静脈血のFVII、プロトロンビン値は同じ水準であり、Lasch and Roka の行なった方法でプロトロンビンが生成されなかったと Pool and Robinson (1959) は述べている。

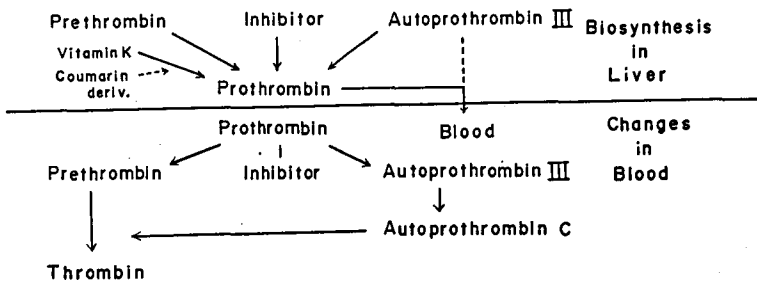
7. プロトロンビン複合体説と抗凝血薬剤との関係  
血液中でプロトロンビンは自己触媒的に活性化されてプレトロンビンとアウトプロトロンビン III に転化される。アウトプロトロンビン III は血小板因子や組織トロンボプラスチンによりアウトプロトロンビン C に転化される。プレトロンビンはこのアウトプロトロンビンや Ac-グロブリン、血小板因子、Ca イオンによりトロンビンに転化され、これによりフィブリノーゲンはフィブリンに転化される。従来血液凝固因子として知られている凝固因子はすべてプロトロンビンの分解物であり、血友病や類似の血液疾患は夫々の凝固因子の欠乏症ではなく、プロトロンビン自体からそれらの因子が生成される能力を先天的に欠いているものであり、それらは凝固因子欠乏症というよりもむしろ分子病であろうという説を Seegers ら (1955, 1967, 1969)<sup>70-73</sup> は主張した（第7図）。更にプロトロンビンはビタミンKの助力により肝臓で合成され、ビタミンKの作用点はリボゾームの段階であり、したがって蛋白合成のほん訳段階の近辺であると主張している。

そしてクマリン系などの抗凝血剤は肝臓でのプロトロンビン合成の段階に作用する。Hjort ら (1961) は純粋なプロトロンビンを用いて Seegers らの行なったようなプロトロンビン転換実験を再現することはできなかった。この両者の矛盾は純粋なプロトロンビン標品にFVIIを含むことにあると Soulier (1959) は指摘している。

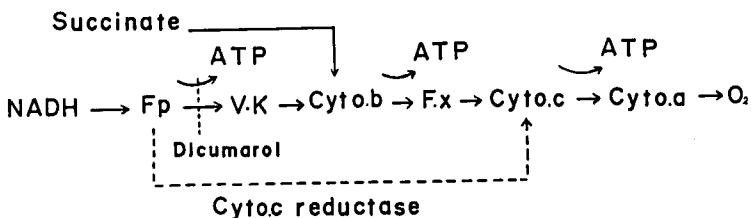
浅田 (1968) はプロトロンビンの開裂によりトロンビン、マスク蛋白が生成されることを明らかにした。生化学的な視野からいえば、血液凝固は特異な蛋白分解酵素が特異的な基質蛋白質の一部分を切断することによってひき起こされる連鎖反応と見なしている。Seegers らのプロトロンビン複合体説のグループに入れられるであろう。

8. 酸化的リン酸化阻害説

ビタミン K<sub>1</sub> が酸化的リン酸化に関与していることを豚の心筋から抽出したミトコンドリアを用いて Martius (1954) が発見し、更にダイクマロールなどのクマリン系抗凝血剤がこの酸化的リン酸化の強力なアンカプラーであることを *in vitro* の実験で明らかにした<sup>78,79</sup>。すなわち NADH からビタミン K<sub>1</sub> を経てサイトクローム C に到る電子伝達系がダイクマロール、ワルフェリン、トロメキサソンのクマリン系抗凝血剤により阻害されると、別のルートでサイトクローム C に到達するため、酸化は正常に行なわれるが、リン酸化の能率が低下する。したがってエネルギーとなる ATP の生成が減少し、凝固蛋白の生成に関与する代謝系も含めて肝臓実質細胞の一般的な蛋白代謝が低下す



第7図 プロトロンビン複合体説。(Berghans and Seegers, 1967)



第8図 酸化的リン酸化阻害説。(Martius, 1959)

る。このようなメカニズムが血液凝固蛋白の減少の主因であると Martius (1967) は主張している (第8図)。そしてビタミンK欠乏ヒナの肝臓から取り出したミトコンドリアの酸化リン酸化は正常な肝臓のそれよりも低下しており<sup>81)</sup>、ビタミンK<sub>1</sub>を *in vitro* でそれに添加すると、酸化リン酸化の活性は上昇し、正常となる<sup>82)</sup>事実が酸化リン酸化阻害説の主張の根拠となっている。更に Martius (1961)<sup>83)</sup> はビタミンK還元酵素を純粋に分離し、これがダイクマロールで阻害され、この酵素は脊椎動物の肝臓、腎臓、心筋に最も豊富に含まれていることを明らかにした。このビタミンK還元酵素は Wosilait (1960) により分離されている。

紫外線をネズミの肝臓ミトコンドリアに照射すると酸化リン酸化は非共役され、これにビタミンK<sub>1</sub>を添加すると、それはほとんど完全に回復したが、紫外線を照射したビタミンK<sub>1</sub>をそれに添加しても、その回復は認められない。また還元サイトクロームCより末端への酸化リン酸化は紫外線の照射でなんら影響を受けないことから、NADHとサイトクロームCとの間の1つあるいは2つの段階にビタミンK<sub>1</sub>が関与していると考えられている<sup>85-88)</sup>。

ビタミンK欠乏ヒナ<sup>89,90)</sup>、ビタミンK欠乏ネズミ<sup>90)</sup>、無菌飼育でビタミンK欠乏をひき起こしたネズミ<sup>91)</sup>の肝臓ミトコンドリアの酸化リン酸化は正常であり、プロトンピンタイムの延長とそれとは無関係であることが明らかにされている。

Green ら (1955) はビタミンK欠乏ヒナ、ダイクマロール処理ネズミの肝臓切片の呼吸、肝臓サクシノオキシゲナーゼ、NADH-サイトクロームC還元酵素は正常であることを明らかにした。更にダイクマロールは *in vitro* でネズミの肝臓ミトコンドリアの酸化リン酸化を阻止するが、*in vivo* でこれが認められないことから、*in vitro* でのダイクマロールの効果は非特異的なものかもしれないと彼は述べている。*in vitro* でミトコンドリアと結合したダイクマロールは洗滌により容易に除去される可能性があることを Green ら (1957) は示唆したが、Wosilait (1968) はこれを否定している。Parmar and Lowenthal (1962) はクロロフィロキノン中毒ネズミで、プロトンピン活性は低下するが、このようなネズミの肝臓ミトコンドリアの酸化リン酸化は正常であることを明らかにしている。またダイクマロール中毒ネズミの肝臓ミトコンドリアの ATP アーゼ<sup>92)</sup>ならびに ATP 量<sup>93)</sup>は正常であるという。

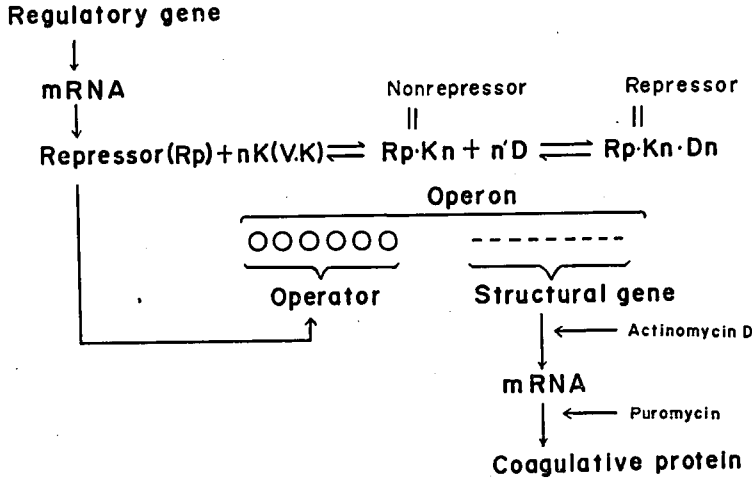
クマリン系抗凝血化合物の *in vitro* での効果が *in vivo* で必ずしも再現できないことは次の事例からもわかる。クマリン化合物は *in vitro* でネズミの肝臓での蛋白合成を阻止するが<sup>96,97)</sup>、*in vivo* では正常

なネズミの肝臓と抗凝血剤処理、ビタミンK欠乏ネズミの肝臓での蛋白の合成能力になんらの差異も認められない<sup>98,99,100)</sup>。Lowenthal and Birnbaum (1969) は次のことを明らかにした。*in vivo* で血しょう FVII の生成を抑制する濃度のワルファリンは *in vitro* (肝臓切片) での FVII の生成を抑制することができない。しかしそれよりもはるかに高い濃度のワルファリンは FVII の *in vitro* での生成を抑制することができる。この場合放射性ロイシンの蛋白への取り込みは抑制されない。したがってワルファリンは蛋白合成を阻害することなしに FVII の遊離を阻害するものと考えられる。また FVII の生成は肝臓での全蛋白合成の中のわずかな部分を占めるので、従来の方法により全蛋白合成量を測定して FVII の生成の減少を検出することができないのかもしれないと彼等は考えている。

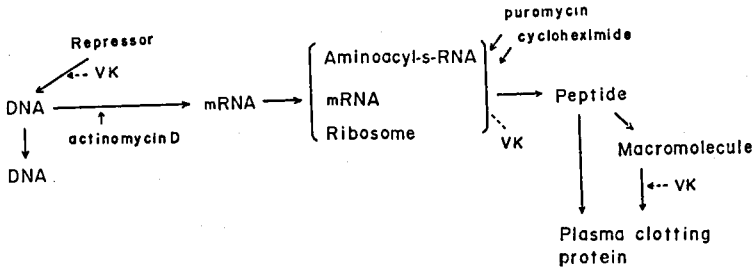
これまで述べたことより、Martius の提唱した学説の真实性は一歩後退した感がある。

### 9. オペロン説

Olson ら (1964~1970)<sup>99,101-110)</sup> はビタミンK欠乏ヒナ、ダイクマロール処理ネズミでビタミンK<sub>3</sub>の投与前にアクチノマイシンD (蛋白合成阻害剤) を投与しておく、ビタミンK<sub>3</sub>の可逆作用 (延長した凝固時間の回復) は完全に阻止され、アクチノマイシンDの投薬量の増大と共に肝臓 RNA の合成も著しく低下する。ビタミンE、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンKによる蛋白合成の制御は遺伝的レベルで行なわれていると推測し、Monod and Jacob (1961) のオペロン説を借用して次のようなビタミンKの作用機構を主張した (第9図)。すなわち、mRNA から作られたレプレッサー蛋白 (抑制因子) はビタミンKと結合してノンレプレッサー (非抑制因子) となる。そのためにオペロン (蛋白質合成の単位でオペレーターと構造遺伝子よりなる) 内のオペレーターはレプレッサーによる拘束から解放され、オペロン内の構造遺伝子もオペレーターの指令により活動を始め、夫々のmRNAを生成し、相応の血液凝固蛋白が生成される。そしてビタミンKの欠如しているとき、レプレッサーはオペロンのオペレーターと結合して、オペロンの血液凝固蛋白生成活動を阻止する。またダイクマロールなどのクマリン化合物はノンレプレッサーと結合して、レプレッサーとなるため、オペロンの活動は阻止され、ビタミンK欠乏に類似した状態になる。ビタミンKはレプレッサーとアロステリックな結合 (蛋白の形状を変える結合) をすることにより、それをノンレプレッサーに変える働きがあるという。またダイクマロールを投与したネズミで血清アルブミンへの放射性ロイシンの取り込みは阻止されず、一般的蛋白合成は阻止されない。したがってビタミンKはDNAの転写の段階で



第9図 オペロン説. D:ダイクマロール. (Olson, 1966)



第10図 血液凝固蛋白の生成過程とビタミンKの作用点. (Olson, 1970)

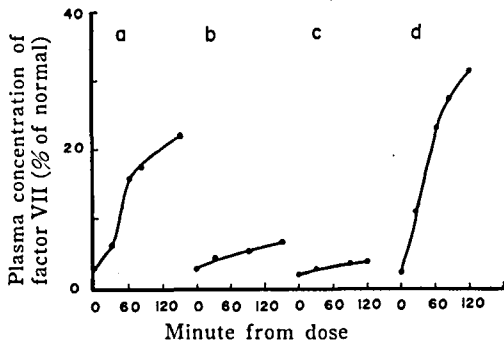
遺伝的レベルで作用し、この作用点にワルファリンなどのクマリン系化合物も作用すると Olson ら<sup>101,102,105)</sup>は考えた。その後の研究でリボソーム段階で mRNA のほん訳を阻止する作用のあるピュロマイシンがネズミの分離灌流肝臓、ネズミの肝臓切片でビタミンKによるプロトロンビン、FVII の生成を阻止し、放射性ロイシンのプロトロンビンへの取り込みが阻止されることを Olson ら<sup>99,104,108-110)</sup>は明らかにした。そこでビタミンKはリボソームの段階でも働き、この場所でのプロトロンビンの *de novo* (初めからの) 合成を刺激すると主張した(第10図)。またポリソームの段階で蛋白合成を阻止する作用のあるシクロヘキシミドはリボソームでのプロトロンビン合成の場でビタミンKと競合することを暗示する資料を Kipfer ら(1970)は得ている。ところが、ビタミンK欠乏ネズミ、同ネズミの分離灌流肝臓、肝臓切片を用いた実験で、ビタミンK<sub>1</sub>によるプロトロンビン、FVII の生成はアクチノマイシンDにより阻止されないという報告がある<sup>98,112-115)</sup>。

ビタミンK<sub>1</sub>によるプロトロンビン、FVII の生成

がピュロマイシンにより阻止されることは多くの研究者により認められているが<sup>98,110,112,116,117)</sup>、Babior (1966) はネズミの肝臓切片で FVII の生成はピュロマイシンにより全く阻止されなかったと報告している。プロトロンビン合成に関与するビタミンKの作用はシクロヘキシミドで完全に阻止されないことが知られている<sup>98,113,115,119)</sup>。更に正常ネズミ、ビタミンK欠乏ネズミ、ビタミンK含有飼料を与えたビタミンK欠乏ネズミで、血しょうのプロトロンビンに取り込まれる放射性アミノ酸の量に差異のないことから、ビタミンK欠乏ネズミではビタミンKにより賦活される不活性なプロトロンビンが存在し、しかもプロトロンビンほん訳後のペプチド結合の形成の段階にビタミンKが作用すると Ranhotra and Johnson (1970) は考えた。プロトロンビン前駆物質がプロトロンビンに転化されるという考えは他の研究者達<sup>98,115,118,148)</sup>によっても主張されている。Suttie (1969) はワルファリン処理で低プロトロンビン血症となった犬にビタミンKと放射性アミノ酸を投与すると、後者が新しく形成されたプロトロンビンへ多く取り込まれることを明らかにしたが、

ビタミンKはリボソームでのプロトロンビンの *de novo* 合成を行なう部位に作用するという Olson らの前述の主張と一致する。したがってビタミンKがプロトロンビン形成のリボソームの場で作用していることについては多くの研究者の意見は一致するが、*de novo* のプロトロンビン合成の段階あるいはプロトロンビンはん訳後の前駆プロトロンビンからプロトロンビンへの転化の場に作用するかどうかについては研究者の考えはまだ一致点を見出していない。Olson らはクマリン系化合物は DNA の mRNA への転写の段階で作用すると考えているが、他の多くの研究者達はリボソームでのプロトロンビン合成の場に作用すると考えている。

Barnhart ら (1964) はワルファリン処理犬の肝臓を電子顕微鏡で観察し、蛍光抗体法で標識されたプロトロンビンと結合したリボソームが正常犬の場合よりも減少していることを明らかにした。Suttie (1969) はワルファリン処理ネズミの肝臓のリボソーム RNA の量、リボソームが網状の小胞体の膜に結合する程度、リボソームのパターンになら変化のないことを明ら

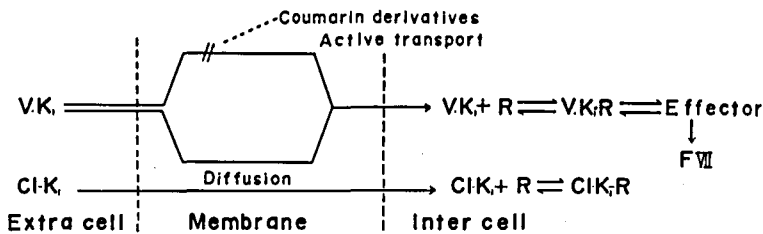


第11図 ビタミンK欠乏ネズミの血しょう FVII 値に対するビタミン K<sub>1</sub>(V. K<sub>1</sub>)とワルファリン(W)を同一比で投薬量を増加した場合の効果。 V. K<sub>1</sub>と W の投薬比—1: 10, a—V. K<sub>1</sub>0.5μg/100g, W5μg/100g, b—V. K<sub>1</sub>2.5μg/100g, W25μg/100g, c—V. K<sub>1</sub>5μg/100g, W50μg/100g, d—V. K<sub>1</sub>50μg/100g, W500μg/100g (Lowenthal & MacFarlane, 1964)

かにしたが、これは Barnhart らの上述の観察と一致しない。

10. 2 ルート説

*Bacillus megatherium* の生長中に形成されるビタミン B<sub>12</sub> の量は 1,2-dimethyl-4, 5-diaminobenzene の添加により増大するが、そのメチル基を塩素原子で置換した 1,2-dichloro-4,5-diaminobenzene を添加した場合にはビタミン B<sub>12</sub> およびリボフラビンの生成を抑制することが Woohley (1950) により明らかにされた。これにヒントを得た Lowenthal ら (1960) はビタミン K<sub>1</sub> の 2 位のメチル基を塩素原子で置換した 2-chloro-3-phytyl-1: 4-naphthoquinone (クロルビタミンK<sub>1</sub>) を合成し、ワルファリン処理家兎でのビタミン K<sub>1</sub> による凝固時間の回復はクロルビタミン K<sub>1</sub> で完全に阻止されることが明らかとなった。更に Lowenthal and MacFarlane (1964) は次の事を明らかにした。ビタミンK欠乏ネズミ、ワルファリン処理ネズミの低下した血しょうプロトロンビンおよび FVII 値はビタミン K<sub>1</sub> の静脈注射で増加し、ビタミンK欠乏ネズミでは0.016~0.5μg/100gの範囲で、ワルファリン処理ネズミでは10~40μg/100gの範囲で血しょう FVII 値の増加量がビタミン K<sub>1</sub> の投与量に比例する。ビタミンK欠乏ネズミで0.5μg/100gのビタミン K<sub>1</sub> と5~25μg/100gのワルファリンを同時静注したとき、ビタミン K<sub>1</sub> に対する血しょう FVII 値の反応は阻止される。そこでビタミンK<sub>1</sub>のワルファリンに対する投薬比はビタミン K<sub>1</sub> の作用を部分的に阻止する程度のもので(1: 10, 1: 20), 投薬量を増大 (5~1000倍) したとき、10倍に増加した場合ではビタミン K<sub>1</sub> の可逆作用 (血しょう FVII 値の増加) は阻止されたが、40倍でビタミン K<sub>1</sub> の可逆作用が再び現われ始め、100, 1000倍に増加したときでは同時静脈注射によるワルファリンの阻止作用は完全に消失した (第11図)。そしてビタミン K<sub>1</sub> とワルファリンとの投薬比に関係なく、同時に静脈注射したワルファリンの作用を消失させるのに必要なビタミン K<sub>1</sub> の薬量は 40~50μg/100g で一定である。またワルファリン処理ネズミでは 40μg/100g のビタミン K<sub>1</sub> の静脈注射で血しょう

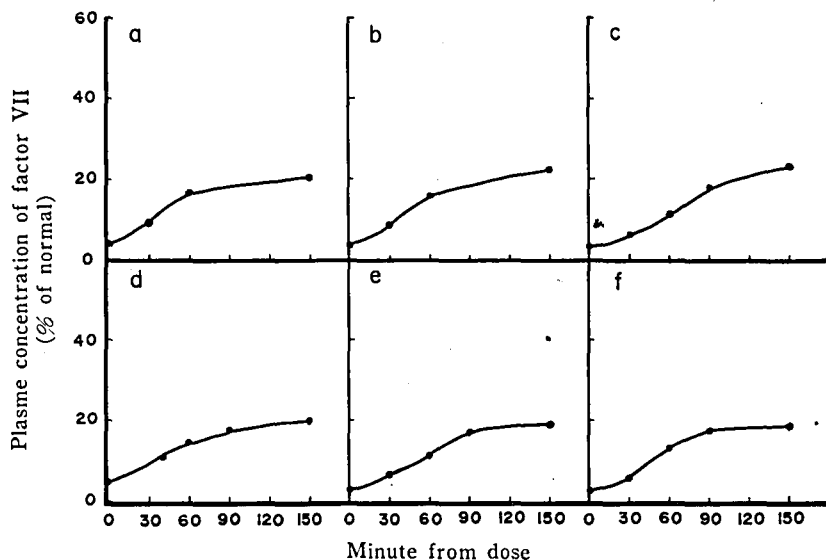


第12図 2ルート説。(Lowenthal & MacFarlane, 1964)

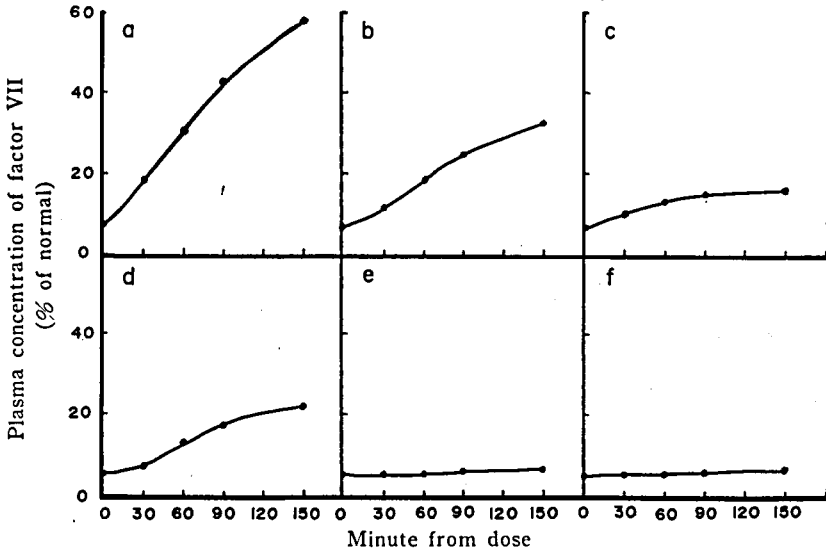


FVII 値は正常値に回復し、またワルファリン処理ネズミにワルファリン 20 mg/100g + ビタミン K<sub>1</sub> 40 μg/100g を静脈注射した場合の血しょう FVII 値の増加はビタミン K<sub>1</sub> 40 μg/100g のみを静脈注射したときと同様であることが明らかとなった。そこで彼はビタミン K<sub>1</sub> が 2 種のルートを通して作用点に到達するものと考えた (第12図)。ビタミン K 欠乏ネズミでは一定の正常なルート (能働輸送路) を通って作用点に到達しそのルートの許容限界量は 0.5 μg/100g である。ところがこのビタミン K 欠乏ネズミにワルファリンを投与するとこのルートが特異的に阻害されるため、別のルート (拡散路) を通って作用点に到達することができる。このルートはクマリン化合物に対して非感受性で、40 μg/100g 以上の薬量でビタミン K<sub>1</sub> はこのルートを利用することができる。このような現象はビタミン K 欠乏ネズミ、正常ネズミの肝臓切片を用いた *in vitro* での FVII 生成実験でも認められる<sup>100)</sup>。Lowenthal and MacFarlane (1967) はまた次の実験を行なった。ワルファリン処理ネズミで、ビタミン K<sub>1</sub> の投薬量 (100 μg/100g) を一定にしてクロルビタミン K<sub>1</sub> の投薬量を増加させてゆくとビタミン K<sub>1</sub> による FVII の生成は完全に阻止される。またビタミン K 欠乏ネズミでビタミン K<sub>1</sub> の投薬量を一定 (0.5 μg/100g) にして

クロルビタミン K<sub>1</sub> の投薬量を増大してゆくと、同様に FVII の生成は完全に阻止される。次にワルファリン処理ネズミでビタミン K<sub>1</sub> とクロルビタミン K<sub>1</sub> の投薬比を 2:1 (出発点での投薬量: V. K<sub>1</sub>-100 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub>-50 μg/100g) として、両投薬量を増加させると FVII の生成の阻害度はほぼ同一で、両薬剤間に競合的拮抗が認められる (第13図)。ビタミン K 欠乏ネズミでもビタミン K<sub>1</sub> とクロルビタミン K<sub>1</sub> の投薬比を 2:1 (出発点での投薬量: V. K<sub>1</sub>-0.5 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub>-0.25 μg/100g) として両投薬量を 100 倍以上に増加しても FVII の生成は出発時と同様の部分的阻害 (競合的拮抗) を示すに過ぎない。ところが、ビタミン K 欠乏ネズミでビタミン K<sub>1</sub> とクロルビタミン K<sub>1</sub> との投薬比を 1:20 (出発点での両者の投薬量: V. K<sub>1</sub>-0.5 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub>-10 μg/100g) あるいは 1:30 (V. K<sub>1</sub>-0.5 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub>-15 μg/100g) として投薬量を増大してゆくと、出発点ではビタミン K<sub>1</sub> による FVII の生成はなんら阻止されないが、両投薬量の増大に伴って FVII の生成は阻止されてゆく (第14図)。このような現象は次のように考えれば合理的に説明できる。ワルファリン処理ネズミではビタミン K<sub>1</sub>、クロルビタミン K<sub>1</sub> 共に拡散のルートを経て作用点に到達し、作用点における両者の相対的濃度比が同



第13図 ワルファリン処理ネズミの血しょう FVII 値に対するビタミン K<sub>1</sub> (V. K<sub>1</sub>) とクロルビタミン K<sub>1</sub> (Cl-V. K<sub>1</sub>) を同一比で投薬量を増加した場合の効果。V. K<sub>1</sub> と Cl-V. K<sub>1</sub> の投薬比—2:1, a-V. K<sub>1</sub> 100 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 50 μg/100g, b-V. K<sub>1</sub> 200 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 100 μg/100g, c-V. K<sub>1</sub> 400 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 200 μg/100g, d-V. K<sub>1</sub> 800 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 400 μg/100g, e-V. K<sub>1</sub> 1600 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 800 μg/100g, f-V. K<sub>1</sub> 3200 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 1600 μg/100g (Lowenthal & MacFarlane, 1967)



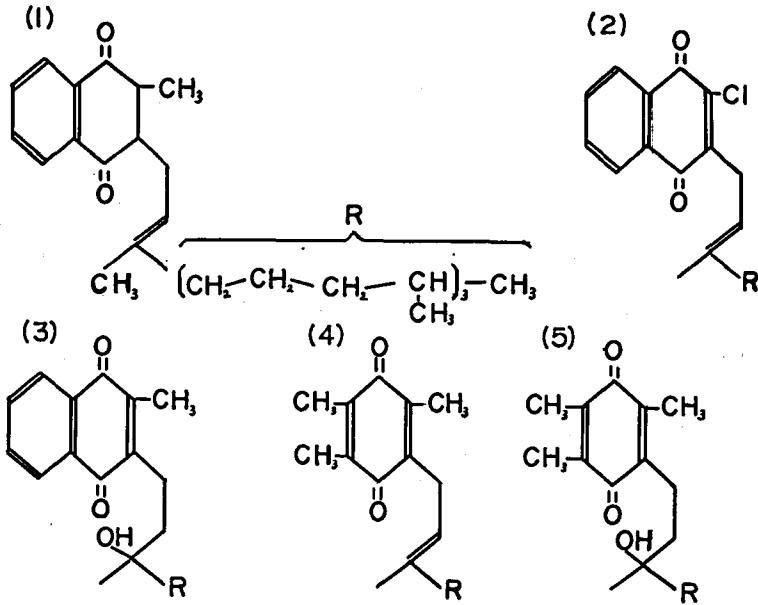
第14図 ビタミンK欠乏ネズミの血しょう FVII 値に対するビタミン K<sub>1</sub>(V. K<sub>1</sub>) とクロルビタミン K<sub>1</sub>(Cl-V. K<sub>1</sub>) を同一比で投薬量を増加した場合の効果 V. K<sub>1</sub> と Cl-V. K<sub>1</sub> の投薬比が1: 20の場合 a-V. K<sub>1</sub> 0.5μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 10μg/100g, b-V. K<sub>1</sub> 4.0μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 80μg/100g, c-V. K<sub>1</sub> 16 μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 320μg/100g, 両者の投薬比が1: 30の場合 d-V. K<sub>1</sub> 0.5μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 15μg/100g, e-V. K<sub>1</sub> 40μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 125 μg/100g, f-V. K<sub>1</sub> 32μg/100g, Cl-V. K<sub>1</sub> 960μg/100g (Lowenthal & MacFarlane, 1967)

じであるため両者の間に競合的拮抗が起る。ビタミン K欠乏ネズミでは、出発点でクロルビタミンKの作用が現われなくても（投薬量が拡散路の閾以下であるため）、クロルビタミン K<sub>1</sub> は拡散路を経て作用点に到達し、ビタミン K<sub>1</sub> は両ルートを通して作用点に到達し、作用点での両者の相対的濃度が投薬量を増大してもほぼ一定であるため同程度の FVII 生成の部分的阻害を示すに過ぎない。しかし両ビタミンの投薬比が1: 20あるいは1: 30のように大きい場合には、投薬比が一定でも投薬量を増すと作用点での両者の濃度差が著しく増大し、クロルビタミン K<sub>1</sub> の阻害効果が現われる。ワルファリン処理、ビタミンK欠乏ネズミでビタミン K<sub>1</sub> の投薬量を一定にしてクロルビタミン K<sub>1</sub> の投薬量を増加した場合では、作用点での両者の濃度差が増大し、クロルビタミン K<sub>1</sub> の阻害効果が現われることになる。そして能働輸送路、拡散路のビタミン K<sub>1</sub> の最小有効閾は夫々 0.1 μg/100g, 10 μg/100g であり、クロルビタミン K<sub>1</sub> の拡散路に対するそれは 15 μg/100g であると彼等は推測している。クロルビタミン K<sub>1</sub> を予め投与して血液凝固をある程度低下した状態にしておいて、ビタミン K<sub>1</sub> とワルファリンの投薬比を一定 (1:10) にして、投薬量を増大させたとき、ビ

タミン K<sub>1</sub> による FVII の生成は一時低下するが、次第に再び増加してくる。つまり出発点ではビタミン K<sub>1</sub> はワルファリンとの同時投与のため、特異的な径路（能働輸送路）は利用できず、別の非特異的な径路から作用点に到達するが、その量が少ないために、FVII の生成量は少ないことになる。しかし投薬量の増大と共に非特異的な径路を通過して作用点に到達するビタミン K<sub>1</sub> の薬量が増大し、FVII の生成が回復してくるものと彼等は解釈している。

上述のビタミン K<sub>1</sub> とクロルビタミン K<sub>1</sub> との間に認められるような関係は 2,5,6-trimethyl-3-phytyl-1,4-benzoquinone (弱いビタミンK様活性, 第15図の(4)) と 2-chloro-5,6-dimethyl-3-phytyl-1,4-benzoquinone (クロルビタミン K<sub>1</sub> 様活性) との間においても認められる<sup>129)</sup>。

またワルファリン処理ネズミでビタミン K<sub>1</sub> とそれに構造の極めて類似したガンマヒドロキシビタミン K<sub>1</sub> (第15図) との血しょう FVII 値に対する効力差は極めてわずかであるが、ビタミンK欠乏ネズミでは前者は後者よりも60倍も効力が大である。これはガンマヒドロキシビタミン K<sub>1</sub> がビタミン K<sub>1</sub> と異なり拡散路のみを利用できるという2ルート説で十分説明で



第15図 ビタミンK誘導体。(1): ビタミン K<sub>1</sub>, (2): クロルビタミン K<sub>1</sub>, (3): ガンマヒドロキシビタミン K<sub>1</sub>, (4): ベンゾキノン, (5): ガンマヒドロキシトコフェロールキノン

きる<sup>127)</sup>。またガンマヒドロキシトコフェロールキノン (第15図) はアンチビタミンKの活性があり、これをネズミに投与すると血しょう FVII 値が軽度減少する。ワルファリン処理ネズミ、ビタミンK欠乏ネズミにおけるビタミン K<sub>1</sub> およびガンマヒドロキシビタミン K<sub>1</sub> の解毒効果はこのトコフェロールキノンにより阻止され、しかもビタミン K<sub>1</sub> とクロルビタミン K<sub>1</sub> との場合 (可逆的拮抗) と異なり不可逆的なものであることも明らかとなっている<sup>128)</sup> がこれも2ルート説に適合した事実である。2ルート説はビタミンK類が作用点に到達する前の過程を対象としたものであることはいうまでもない。

#### 11. クマリン系化合物およびビタミンKの蛋白結合性

多くの薬剤は血しょう蛋白に結合し、この結合分割は薬理活性をもたないことが一般に認められている。アルブミン上のその結合点から結合しているある薬剤を他の薬剤により置換することはその薬理学的効果を増進させるものと当然考えられる。

ダイクマロールが血しょうアルブミンと結合し易いことが知られている<sup>11,149)</sup>。O'Reilly ら (1962) によると血液中のワルファリンの97%は蛋白と結合し、ダイクマロールでは100%結合している。またワルファリンの血しょうアルブミン分割との結合は、ワルファリンの作用点への接近、排出、代謝を妨げているが、

血しょう中のワルファリンの長い半減期、生物学的効果とこの血しょうアルブミンに対する結合性ととの間に相関が認められる。ワルファリンは人血しょうアルブミンとの結合性が強く非極性であるが、ワルファリンを投与した人尿より検出される6あるいは7あるいは8-ヒドロキシワルファリンは人血しょうアルブミンとの結合性は低く極性がある。このことからワルファリンと血しょうアルブミンとの相互作用と作用点とワルファリンとの間の相互作用との間に相関関係があるのではないかと O'Reilly (1969) は推測している。

Solomon and Schrogie (1967) により次のことが明らかにされている。ワルファリンはアルブミンと結合し易いが、フェニルブタゾンによりそれが競合的に妨害されると、ワルファリンの効力が増大する。クロロフェノキシイソブチリックアシド (CPIB) はアルブミンに対するワルファリン結合の非競合的阻害剤であり、ワルファリンの効力を増大することを明らかにした (両者はアルブミン上の異なった受容器に結合する)。またフェニラミドはワルファリンのアルブミン結合を阻止する能力は低いが、ワルファリンの抗凝血効果を増大し、これはワルファリンが無毒なものに代謝されるのを阻止することによるものと推測される。サイロキシンもワルファリンのアルブミン結合を阻止する能力は低いけれどもワルファリンの抗凝血効果を増大させる。これは抗血液凝固剤の作用点の受容器に対

する親和性を増大させることに基づくものであるらしい。フェニルブタゾン、フェニラミドル、CPIBがワルファリンの抗凝血効果を増大することは他の研究者によっても報告されている<sup>132,133)</sup>。

12. ビタミンK, クマリン系化合物の生体内の分布  
 ダイクマロールは投与量の10~20%が肝臓で固定する。合成ビタミンK<sub>3</sub>を投与するとダイクマロールの最高に達する時間、完全にその消失する時間はビタミンKにより影響されないが、肝臓よりその消失する速度が急速であるという<sup>14,134)</sup>。しかしGreenら(1956)はダイクマロールの組織分布に対するビタミンKの影響を明らかにすることができなかった。湯山(1953)はワルファリン中毒死前24時間とみられるシロネズミの血しょう中のワルファリン値を測定したが、これが中毒死とどのような関係にあるかは何も論じていない。荒木ら(1955)はワルファリンを摂食させたシロネズミの血中濃度を測定し、投薬回数が増加してもワルファリンは血液中に漸次蓄積される傾向は認められず、血中濃度と致死作用の機構とを結びつけることはできないと述べている。Jaquesら(1957)は種々の動物に放射性ダイクマロールを静注し、それが肝臓に滞留する時間は、マウス、ネズミ、ハムスター、ニワトリのヒナでは約18時間、家兎、犬では72時間であることが明らかとなった。また血しょう低プロトロンビン値を持続する期間はマウス4日、ネズミ2日、家兎9日、犬5日、ハムスター0日であった。そして、血しょうプロトロンビン値の増加している期間は正確に肝臓における滞留時間に相応させることはできないが、プロトロンビンタイムと経過時間により形成される曲線の面積が大きければ肝臓におけるダイクマロールの量と滞留時間とにより形成される面積もより大きくなる。ワルファリンをシロネズミに静脈注射すると全身に急速に分布するが、最も多く検出されるのは肝臓である<sup>14)</sup>。またビタミンK<sub>1</sub>はリンパ管を経て一般循環に入り、ビタミンK<sub>3</sub>は門脈、肝臓を経て一般循環に入ることから、ビタミンK<sub>3</sub>は肝臓で作用するがビタミンK<sub>1</sub>は肝臓外で作用すると考えられている<sup>142)</sup>。しかしビタミンK<sub>1</sub>はビタミンK<sub>3</sub>よりも24倍も肝臓で検出され前者が後者よりもより高い治療効果を示すのは前者がより多く肝臓に貯蔵されるためであると推測されている<sup>143,144)</sup>。

ビタミンKの細胞内分布についての興味ある報告がある。ヒナ検定法で牛の肝臓分画のビタミンK量をGreenら(1956)は測定したが45%は核および細胞残渣に、25%はミトコンドリア分画に、30%はマイクロソームおよび可溶分画にある。また放射性ビタミンK<sub>3</sub>の醋酸塩をヒナに与えると放射能のほとんどは肝臓、心臓、腎臓の細胞の核、ミトコンドリア分画に含まれ

る<sup>140)</sup>。しかしBell and Matschiner (1969)は放射性ビタミンK<sub>1</sub>をネズミに投与し、肝臓のマイクロソーム分画に高い放射能を検出した。更にワルファリン、クロルビタミンK<sub>1</sub>を投与したネズミの細胞内におけるビタミンK<sub>1</sub>の分布が正常であったことは興味ある事実である。

### 13. クマリン系抗凝固剤の代謝物

Christensen (1966)はダイクマロールを投与したネズミの尿、糞から7-ハイドロキシダイクマロール、7-メトキシダイクマロールを検出した。Barkerら(1970)は放射性ワルファリンをネズミの腹腔内に注射し、投薬後1週間にわたって排出された尿から次のものを検出している：ワルファリン(6.6%)、7-ハイドロキシワルファリン(35%)、4'-ハイドロキシワルファリン(21%)、6-ハイドロキシワルファリン(15.4%)、8-ハイドロキシワルファリン(8.9%)、7-ハイドロキシワルファリンのグルクロン酸抱合物(3.9%)、2,3-dihydro-2-methyl-4-phenyl-5-oxo- $\gamma$ -pyrano(3,2-c)(1) benzopyran(6.6%)。糞の中でも尿と同じ代謝物が含まれている。4'-ハイドロキシワルファリンはワルファリンの $\gamma$ の抗凝固活性をもっているが、他の代謝物にはいずれも抗凝固活性が認められない。Lewis and Trager (1970)はワルファリンを投与した人間の尿抽出物からワルファリンアルコール類、6-あるいは7-ハイドロキシワルファリンを得ている。

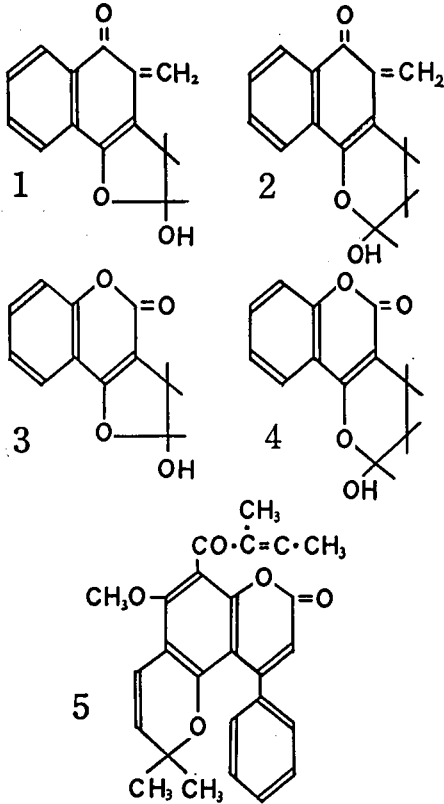
### 14. 環状構造作用説

ビタミンK活性をもつ2-メチルナフトキノン類は第16図の1, 2のような環状キノンメタイドに代謝転換されて有効な働きをすることをChmielewska and Ciésłak (1958)は示唆した。更に3位置換4-ハイドロキシクマリンやダイクマロールも第16図の3あるいは4の抗凝固物を形成し、これらの化合物は同一の酵素作用点で競合すると考えた。Arora and Mathur (1963)によるとキャロフィロライド(第16図5)は環状構造をもち、ダイクマロールに準ずる低プロトロンビン効果をもっており、この事実は前述の説と一致する。

### 15. クマリン系殺鼠剤に対するネズミの抵抗性

この項についてはすでに筆者が綜説を書いているので<sup>140)</sup>、その後の研究成果について記したい。

Hermudsonら(1969)はクマリン系殺鼠剤に対する抵抗性ネズミについて次のことを明らかにした。抵抗性、正常ネズミに放射性ワルファリンを投与し、両系のネズミの尿抽出物にほぼ同じ割合で未変化のワルファリンおよび6種の代謝物を検出した。また抵抗性、正常ネズミにビタミンK欠乏食を摂食させると、正常なものよりも抵抗性ネズミのプロトロンビンの減少はやや多く、その回復に必要なビタミンK量では抵抗性ネズミの方が正常ネズミよりもより多くのビタミンK



第16図 環状構造作用説。(Chmielewska & Ciésłak, 1958, Arora & Mathur, 1963)

を必要とする。そこでビタミンKとワルファリンが競合的に作用するビタミンK依存性凝固因子の生成の場が突然変異により変形し、ビタミンKとワルファリンに対する親和性が低下することによりワルファリンに対して抵抗性を示すことになる。更に抵抗性、正常ネズミに放射性ビタミンKを投与しても細胞内のビタミンKの分布の差が小さく<sup>158,157</sup>、このような差異を抵抗性ネズミのビタミンKの必要性の増大に結びつけることはできない。

クマテトラリル (別名エンドックス) はワルファリンに代り得る薬剤であるが、これに対して交差抵抗性を示すネズミの出現が、野外試験、室内試験の成績から推測される<sup>158,159</sup>。またワルファリンにサルファキノキサリン、メチルテストステロン、フェニルブタゾン、鮫油を添加したものはワルファリン抵抗性ネズミに有効ではなかったという<sup>160</sup>。

### 16. むすび

抗血液凝固性化合物の抗血液凝固作用のメカニズムについてこれまで述べたように、いくつかの説があり、

定説がないと言っても過言ではない。Dam (1935) によりビタミンKが発見されて以来、30年以上経過しているが、その生体内の作用機序はまだ明らかにされていない。クマリン系などの抗血液凝固性化合物の抗凝血機序はビタミンKの機能と密接な関係があり、両者を切り離して考えることはできない。抗凝血性殺鼠剤中毒ネズミでの凝血障害と出血との関係、出血機序、その用法についての基礎的諸問題については次の機会にゆずりたい。

### 文 献

- 1) Alexander, B. and S. Wessler: *Circulation*, 24, 123 (1961).
- 2) Hoak, J. C., W. E. Connor, E. D. Warner and J. R. Carter: *Ann. Int. Med.*, 54, 73 (1961).
- 3) 佐竹清人: 最新医学, 17, 2537 (1962).
- 4) Denson, K. W.: *Brit. Med. J.*, 1, 1205 (1961).
- 5) 草野忠治: 応動昆誌, 2, 271 (1958).
- 6) Link, K. P.: *Hervey Lecture*, 39, 162 (1943).
- 7) Link, K. P.: *Circulation*, 19, 97 (1959).
- 8) Link, K. P., R. S. Overman, W. R. Sullivan, C. F. Huebner and L. D. Scheel: *J. Biol. Chem.*, 147, 463 (1943).
- 9) Overman, R. S., M. A. Stahmann, C. F. Huebner, W. R. Sullivan, L. Sapero, D. G. Doherty, M. Ikawa, L. Graf, S. Roseman and K. P. Link: *J. Biol. Chem.*, 153, 5 (1944).
- 10) Lester, D.: *J. Biol. Chem.*, 154, 305 (1944).
- 11) Weiner, M., S. Shapiro, J. Axelrod, J. R. Cooper and B. B. Brodie: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 99, 409 (1950).
- 12) Jaques, L. B. and E. Lepp: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 66, 178 (1947).
- 13) Meunier, P., C. Mentzer and J. Lajudic: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 29, 977 (1947).
- 14) Field, J. B.: *Science*, 117, 499 (1953).
- 15) Overman, R. S., J. B. Field, C. A. Bauman and K. P. Link: *J. Nut.*, 23, 589 (1942).
- 16) Boyd, E. J. and E. D. Warner: *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 1431 (1948).
- 17) Bayerle, H. and R. Marx: *Biochem. Z.*, 319, 397 (1948).
- 18) Hausner, E. P., C. L. Shafer, M. Corson, O. Johnson, T. Trujillo and W. Langham: *Circulation*, 3, 171 (1951).
- 19) Christensen, F.: *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 24, 232 (1966).
- 20) 草野忠治: 衛生動物, 7, 214 (1956).

- 21) 草野忠治: 防虫科学, 23, 230 (1958).
- 22) Warner, E. D.: *J. Exp. Med.*, 68, 831 (1938).
- 23) Warren, R. and J. Rhoads: *Am. J. M. Sci.*, 198, 193 (1939).
- 24) Andrus, W. D., J. W. Lord and R. A. Moore: *Surgery*, 6, 899 (1939).
- 25) Lord, J. W., W. D. Andrus and R. A. Moore: *Arch. Surg.*, 3, 41 (1940).
- 26) Munro, F. L., E. R. Hart and M. P. Munro: *Am. J. Physiol.*, 145, 206 (1945).
- 27) Mann, F. D., E. S. Shonyo and F. C. Mann: *Am. J. Physiol.*, 164, 111 (1951).
- 28) Warner, E. D., K. M. Brinkhous and H. P. Smith: *Am. J. Physiol.*, 114, 667 (1936).
- 29) Bollman, J. L., H. R. Butt and A. M. Snell: *J. Am. M. Ass.*, 115, 1087 (1940).
- 30) 草野忠治: 衛生動物, 7, 208 (1956).
- 31) Urnas, B.: *Acta Physiol. Scand.*, 3, 97 (1942).
- 32) Lupton, A. M.: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 89, 306 (1947).
- 33) Kazmier, F. J., J. A. Spittell, Jr., E. J. W. Bowie, J. H. Thompson, Jr. and C. A. Owen, Jr.: *Am. J. Physiol.*, 214, 919 (1968).
- 34) Dodds, W. J. and K. D. Miller: *Fed. Proc.*, 27, 373 (1968).
- 35) Prydz, H.: *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 16, 540 (1964).
- 36) Goswami, P. and H. N. Munro: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 410 (1962).
- 37) Gaarder, A. and H. Prydz: *Biochim. Biophys. Acta*, 140, 545 (1967).
- 38) Hill, R. B., S. Gaetani, A. M. Paolucci, P. B. RamaRao, R. Alden, G. S. Ranhotra, D. V. Shah, V. K. Shah, V. K. Shah and B. C. Johnson: *J. Biol. Chem.*, 243, 3930 (1968).
- 39) Drinker, C. K. and K. R. Drinker: *Am. J. Physiol.*, 4, 5 (1916).
- 40) Jürgens, R.: *Acta Haematol.*, 7, 143 (1952).
- 41) Jürgens, R. and A. Studer: *Schweiz. Med. Wsch.*, 82, 1119 (1952).
- 42) Slätis, P.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10, Suppl., 33, 9 (1958).
- 43) Heppich, E. and J. Schmid: *Wiener Z. Inn. Med.*, 29, 195 (1948).
- 44) Witte, S. and P. Dirnberger: *Klin. Wsch.*, 31, 936 (1953).
- 45) 保田宗裕: 三重医学, 12, 91 (1968).
- 46) Pechet, L., G. S. Pechet and R. A. MacDon-ald: *Thromb. Diath. Haem.*, 22, 508 (1969).
- 47) Gordin, R.: *Acta Haematol.*, 19, 341 (1958).
- 48) 荒井一郎: 東北医誌 46, 53 (1951).
- 49) 山形敏一: 細網内皮系統と肝機能: 医学書院 (1954).
- 50) Barnhart, M. I. and G. F. Anderson: *Biochem. Pharmacol.*, 9, 23 (1962).
- 51) Wolley, D. W.: *Physiol. Rev.*, 27, 308 (1947).
- 52) Witts, L. J.: *Glasgo Med. J.*, 19, 57 (1942).
- 53) Dam, H.: *Nature*, 135, 652 (1935).
- 54) Dam, H., F. Schønheyder and E. Tage-Hansen: *Biochem. J.*, 30, 1075 (1936).
- 55) Ray, G., N. N. Chakravarty and S. C. Roy: *Ann. Biochem. Exp. Med. (Calcutta)*, 22, 317 (1962).
- 56) Seegers, W. H.: *Prothrombin*: Harvard Univ. Press (1962).
- 57) Quick, A. J. and G. E. Collentine: *Am. J. Physiol.*, 164, 716 (1951).
- 58) Collentine, G. E. and A. J. Quick: *Am. J. Med. Sci.*, 222, 7 (1951).
- 59) Quick, A. J., A. V. Pissciotta and C. V. Hussey: *Arch. Intern. Med.*, 95, 2 (1955).
- 60) Hemker, H. C., J. J. Veltkamp, A. Hensen and E. A. Loeliger: *Nature*, 200, 589 (1963).
- 61) Losito, R.: *Acta Chem. Scand.*, 19, 2229 (1965).
- 62) Lasch, H. G. and L. Roka: *Hoppe-Seyler's Zeit. Physiol. Chemie*, 291, 30 (1953).
- 63) Lasch, H. G. and L. Roka: *Klin. Wschr.*, 32, 460 (1954).
- 64) Lasch, H. G., I. Pfisterer and K. Schimpf: *Acta Haematol.*, 17, 280 (1957).
- 65) Lasch, H. G., K. Mechelke and E. Nusser: *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 204, 1 (1957).
- 66) Lasch, H. G., K. Mechelke, E. Nusser and H. H. Sessner: *Dtsch. Ges. Bluttransfusion: Koln* (1957).
- 67) Lasch, H. G., K. Mechelke, E. Nusser and H. H. Sessner: *Z. Ges. Exp. Med.*, 129, 484 (1958).
- 68) Andrus, W., J. W. Lord, Jr. and J. J. Kauer: *Science*, 91, 48 (1940).
- 69) Pool, J. G. and J. Robinson: *Am. J. Physiol.*, 196, 423 (1959).
- 70) Alkjaersig, N. and W. H. Seegers: *Am. J. Physiol.*, 183, 111 (1955).
- 71) Seegers, W. H.: *Blood Clotting Enzymology*,

- p. 1: Academic Press (1967).
- 72) Seegers, W. H.: *Annu. Rev. Physiol.*, 31, 269 (1969).
  - 73) Berghans, G. M. and W. H. Seegers: *Thromb. Diath. Haem.*, 17, 707 (1967).
  - 74) Hjort, P. F. and R. Hasselback: *Thromb. Diath. Haem.*, 6, 580 (1961).
  - 75) Soulier, J. P.: *Rev. Hémat.*, 14, 26 (1959).
  - 76) 浅田敏雄: 日血会誌, 31, 665 (1968).
  - 77) Martius, C.: *Biochem. Z.*, 326, 26 (1954).
  - 78) Martius, C. and D. Nitz-Litzow: *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 134 (1953).
  - 79) Martius, C. and D. Nitz-Litzow: *Biochem. Z.*, 327, 1 (1955).
  - 80) Martius, C.: *Blood Clotting Enzymology*, p. 551 (Ed. W. H. Seegers): Academic Press (1967).
  - 81) Martius, C. and D. Nitz-Litzow: *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 152 (1954a).
  - 82) Martius, C. and D. Nitz-Litzow: *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 289 (1954b).
  - 83) Brodie, A. F.: *Biochemistry Of Quinones*, p. 355 (Ed. R. A. Morton), Academic Press (1965).
  - 84) Wosilait, W. D.: *J. Biol. Chem.*, 235, 1196 (1960).
  - 85) Dallam, R. D. and W. W. Anderson: *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 439 (1957).
  - 86) Anderson, W. W. and R. D. Dallam: *J. Biol. Chem.*, 234, 409 (1959).
  - 87) Cooper, C. and A. L. Lehninger: *J. Biol. Chem.*, 219, 519 (1956).
  - 88) Beyer, R. E.: *J. Biol. Chem.*, 234, 688 (1959).
  - 89) Beyer, R. E. and R. D. Kennison: *Arch. Biochem. Biophys.*, 84, 63 (1959).
  - 90) Paolucci, A. M., P. B. RamaRao and B. C. Johnson: *J. Nut.*, 81, 17 (1963).
  - 91) Westman, B. S., P. L. Knight, L. L. Keely and D. F. Kan: *Fed. Proc.*, 22, 120 (1963).
  - 92) Green, J. P., E. Søndergaard and H. Dam: *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 11, 79 (1955).
  - 93) Green, J. P., E. Søndergaard and H. Dam: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 119, 12 (1957).
  - 94) Wosilait, W. D.: *Biochem. Pharmacol.*, 17, 429 (1968).
  - 95) Parmar, S. S. and J. Lowenthal: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8, 107 (1962).
  - 96) Couri, D. and W. D. Wosilait: *Biochem. Pharmacol.*, 15, 1349 (1966).
  - 97) Ranhotra, G. S. and B. C. Johnson: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 132, 509 (1969).
  - 98) Pool, J. G. and G. F. Borchgrevink: *Am. J. Physiol.*, 206, 229 (1964).
  - 99) Olson, R. E.: *Nutr. Rev.*, 28, 171 (1970).
  - 100) Lowenthal, J. and H. Birnbaum: *Science*, 164, 181 (1969).
  - 101) Olson, R. E.: *Science*, 145, 926 (1964).
  - 102) Olson, R. E.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 145, 1565 (1965a).
  - 103) Olson, R. E.: *Fed. Proc.*, 24, 623 (1965b).
  - 104) Olson, R. E.: *Advances In Enzyme Regulation*, 4, 181 (1966).
  - 105) Olson, R. E., L. F. Li, G. Philipps, E. Berry and E. Ryland: *Fed. Proc.*, 26, 698 (1967).
  - 106) Olson, R. E., G. Philipps and N. T. Wang: *Advances In Enzyme Regulation*, 6, 213 (1967).
  - 107) Olson, R. E., L. F. Li, G. Philipps and R. K. Kipfer: *Thromb. Diath. Haem.*, 19, 611 (1968).
  - 108) Olson, R. E., R. K. Kipfer and L. F. Li: *Advances In Enzyme Regulation*, 7, 83 (1969).
  - 109) Li, L. F., J. Block, R. K. Kipfer and R. E. Olson: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 133, 168 (1970).
  - 110) Kipfer, R. K. and R. E. Olson: *Biochim. Biophys. Acta*, 38, 1041 (1970).
  - 111) Jacob, F. and J. Monod: *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961).
  - 112) Suttie, J. W.: *Arch. Biochem. and Biophys.*, 118, 166 (1967).
  - 113) Suttie, J. W.: *Fed. Proc.*, 28, 1696 (1969).
  - 114) Lowenthal, J. and E. L. Simmons: *Experientia*, 23, 421 (1967).
  - 115) Bell, R. G. and J. T. Matschiner: *Arch. Biochem. and Biophys.*, 135, 152 (1969).
  - 116) Olson, J. P., L. L. Miller and S. B. Troup: *J. Clin. Invest.*, 45, 690 (1966).
  - 117) Ranhotra, G. S. and B. C. Johnson: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 132, 509 (1969).
  - 118) Babior, B. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 123, 606 (1966).
  - 119) Johnson, B. C., R. B. Hill, R. Alden and G. S. Ranhotra: *Life Sci.*, 5, 385 (1966).
  - 120) Ranhotra, G. S. and B. C. Johnson: *Life Sci.*, 9, 79 (1970).

- 121) Barnhart, M. I., G. F. Anderson and M. H. Bernstein: *Fed. Proc.*, 23, 520 (1964).
- 122) Woolley, D. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 75, 745 (1950).
- 123) Lowenthal, J., J. A. MacFarlane and K. M. McDonald: *Experientia*, 16, 428 (1960).
- 124) Lowenthal, J. and J. A. MacFarlane: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 143, 273 (1964).
- 125) Lowenthal, J. and J. A. MacFarlane: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 157, 672 (1967).
- 126) Lowenthal, J. and J. A. MacFarlane: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 147, 130 (1965).
- 127) 草野忠治・J. Lowenthal: 昭和44年度応動昆大会講演 (1969).
- 128) 草野忠治・J. Lowenthal: 未発表.
- 129) O'Reilly, R. A., P. M. Aggeler, M. S. Hoag and L. Leong: *Thromb. Diath. Haem.*, 8, 82 (1962).
- 130) O'Reilly, R. A.: *J. Clin. Invest.*, 48, 193 (1969).
- 131) Solomon, H. M. and J. J. Schrogie: *Biochem. Pharmacol.*, 16, 1219 (1967).
- 132) Eisen, M. J.: *J. Am. Med. Assoc.*, 189, 64 (1964).
- 133) Carter, S. A.: *New Engl. J. Med.*, 273, 423 (1965).
- 134) Pyörälä, K., P. Ristola and G. Myllylä: *Ann. Med. Int. Fenn.*, 75, 157 (1968).
- 135) O'Reilly, R. A. and P. M. Aggeler: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 128, 1080 (1968).
- 136) Lee, C. C., L. F. Trevoy, J. W. T. Spinks and L. B. Jaques: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 74, 151 (1950).
- 137) Green, J. P., E. Sjøndergaard and R. H. Dam: *Proc. Soc. Biol. and Med.*, 92, 449 (1956).
- 138) 湯山章: 岩手大農報, 1, 187 (1953).
- 139) 荒木俊枝・大平昌男・長岡良一・村本明・浜中節郎: 大阪市立大医誌, 4, 96 (1955).
- 140) Jaques, L. B., E. L. Froese, R. O'Toole and J. W. T. Spinks: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 111, 478 (1957).
- 141) Anderson, G. F.: *Thromb. Diath. Haem.*, 18, 754 (1967).
- 142) Jaques, L. B., G. J. Millar and J. W. T. Spinks: *Schweiz. Med. Wschr.*, 84, 792 (1954).
- 143) Taylor, J. D., G. J. Millar, L. B. Jaques and J. W. T. Spinks: *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34, 1143 (1956).
- 144) Losito, R., C. A. Owen, Jr. and E. V. Flock: *Thromb. Diath. Haem.*, 19, 383 (1968).
- 145) Green, J. P., E. Sjøndergaard and H. Dam.: *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 182 (1956).
- 146) Martius, C.: *Biochem. Z.*, 327, 407 (1956).
- 147) Bell, R. G. and J. T. Matschiner: *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 597 (1969).
- 148) Babior, B. M. and R. S. Kipner: *Biochem.*, 9, 2564 (1970).
- 149) O'Reilly, R. A.: *J. Clin. Invest.*, 46, 829 (1967).
- 150) Barker, W. M., M. A. Hermodson and K. P. Link: *J. Pharm. and Exp. Therap.*, 171, 307 (1970).
- 151) Lewis, R. J. and W. F. Trager: *J. Clin. Invest.*, 49, 907 (1970).
- 152) Chmielewska, I. and J. Ciésłak: *Tetrahedron*, 4, 135 (1958).
- 153) Arora, R. B. and C. N. Mathur: *Brit. J. Pharmacol.*, 20, 29 (1963).
- 154) 草野忠治: 植物防疫, 24, 13 (1970).
- 155) Hermodson, M. A., J. W. Suttie and K. P. Link: *Am. J. Physiol.*, 217, 1316 (1969).
- 156) Thierry, M. J. and J. W. Suttie: *Fed. Proc.*, 28, 385 (1969).
- 157) Thierry, M. J., M. A. Hermodson and J. W. Suttie: *Am. J. Physiol.*, 219, 854 (1970).
- 158) Rowe, F. P. and R. Redfern: *Ann. Appl. Biol.*, 62, 355 (1968).
- 159) Greaves, J. H. and P. Ayres: *J. Hyg.*, 67, 311 (1969).
- 160) Drummond, D. C.: *New Scientist*, June 23, 771 (1966).