

The Influence of Warfarin on the Several Physiological Functions in Mice. Poison Action of New Rodenticides (Coumarin Derivatives). X. Tyuzi KUSANO (Laboratory of Applied Zoology, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education, Tokyo, Japan). Received Oct. 24. 1958. *Botyu-Kagaku* 23, 230, 1958 (with English résumé, 239).

42. 二三の生理機能に対する Warfarin の影響 クマリン系新殺鼠剤の毒作用 第10報* 草野忠治 (東京教育大学 農学部 応用動物学研究室) 33. 10. 24 受理

筆者はすでに Warfarin による出血は凝血障害と毛細血管抵抗減弱によることと、さらにその凝血障害の機構を明らかにした。今回は出血時間、二三の肝機能、心臓、血管、腸管運動などに対する Warfarin の影響について調査しその作用機構について論述した。

三坂・草野¹⁾はマウス、ラットで投薬量・投薬型式・死亡率などと prothrombin time (PT) との関係を調査し、大部分の供試鼠は、その PT が300秒以上に延長し、その状態でさらに2~3日経過すれば死亡することを明らかにした。そして一定薬量以上多く投薬しても殺鼠効果ならびに PT 値にほとんど差異がなく、また連続投薬が4回に達しない場合には、PT は一度増加するけれども、投薬を中止するとふたたび正常値に回復することから、Warfarin の毒作用は体内で漸次蓄積されるものであると示唆した。その後、筆者が本剤の抗凝血作用に関する研究から^{6, 7, 9-11)}, stable factor (SF) と prothrombin の減少により凝固時間および PT が延長することが明らかになった。そして出血と密接な関係がある諸要因と PT の変化との関係について詳細に調査した結果⁹⁾, 本剤による出血は凝血障害と毛細血管抵抗減弱によるものであり、肺に出血が著しい場合には窒息死、他の諸組織に著しい出血がある場合には貧血または機能障害によるショック死のおこることが推測された。本報は出血時間、二三の肝機能、心臓、血管、腸管運動などに対する Warfarin の影響について調査し、これまで行って来た研究結果をとりまとめ Warfarin の作用機構について論述する。

本研究を行うにあたり終始御指導を賜った当研究室三坂教授、および本研究の推進にあたり御助言を載いた東京大学助教授山崎輝男氏、ならびに橋橋敏夫氏に対し謝意を表する。

実験材料および方法

供試動物はマウス、ヒキガエル、トノサマガエルを使用した。使用薬剤は Na-Warfarin、黄磷剤、クロホルムである。また Warfarin の心臓、血管、腸管運動に関する実験にはビタミン K₃, K₄, C, Rutin,

adrenalin (Ad), atropin (At), eserine (Es), acetylcholin (Ach), BaCl₂, グロン酸, メチオニン, サングリーン (葉緑素), ニコチン酸アミドを使用した。投薬はカテーテルによる胃内注入、毒餌投与、皮下注射の方法によった。

測定方法は次に示す通りである。

1. prothrombin time (PT) は第2報¹⁶⁾に述べた加藤式微量測定法の変法による。
2. Haemoglobin (Hb) 量は Sahli 法⁵⁾の変法による。
3. 出血時間は Duke 法⁵⁾による (尾静脈で実験)。
4. 全血および血漿の catalase の活性度は山形法²⁹⁾の変法による。
5. 血清 cholinesterase (ChE) の活性度は高橋・柴田法²⁹⁾の変法による。
6. Haematocrit (Ht) 値は加藤法⁵⁾による。
7. 肺出血度は水および benzol に対する各肺葉の沈下率であらわした⁹⁾。
8. 墨丸磨砕液の皮内拡散作用 100 mg の墨丸に 2cc の 0.9% NaCl を加えて磨砕しその上清と india ink の等量混合液 0.05 cc をマウスの皮内に注射し、3時間後に注射部位の皮膚をはいで拡散面積を測定した。
9. 血清の皮内拡散作用 被検血清 (採血後3時間) と india ink の等量混合液 0.05 cc をマウスの皮内に注射し、拡散面積を測定した。
10. 赤血球数は Hyem 液を使用して測定した⁹⁾。
11. 中毒死鼠は 5% formalin で固定し、haematoxylin-eosin 染色、Van Gisson 染色を行い、組織の観察を行った。
12. カエルの心臓に対する Warfarin の影響は Engelmann (トノサマガエルを使用), Straub (ヒキガエルを使用) 法による⁹⁾。

* 本論文は昆虫生理学談話会 (1957, 2月), 衛生動物東日本支部大会 (1956, 1957), 衛生動物学会 (1957, 1958) にて発表したものである。

Table 1. Effect of Warfarin against bleeding time and haemoglobin quantity. Continuous administration of Warfarin (0.25 mg) at every 24 hours.

Collection time of blood after administration	PT (sec.)	Numbers of erythrocyte (million/mm ³)	Haemoglobin quantity (%)	Bleeding time (min.)
Before administration	10.6	900—1030	75—80	2—4
24th hour after 1st ad.	80.4—174.8	970—987	73—85	5—15
24th, after 2nd ad.	>300	431—914	47—81	12—20
24th, after 3rd ad.	〃	405—605	39—42	>20
24th, after 4th ad.	〃	428—528	28—44	〃
24th, after 5th ad.	〃	497—532	23—38	〃

13. トノサマガエル の血管に対する影響は薬物の皮下または滴下後の蹼膜および腸間膜血管の口径の変化を顕微鏡下で観察することによる。

14. マウスの腸管運動に対する影響は Magnus 法による⁹。

実験結果

1. 出血時間、Hb 量に対する影響： Warfarin 1 回投与後24時間で出血時間は投与前の2倍に延長し、2～3回投与後24時間でそれは著しく延長した。また赤血球数、Hb 量は2～3回投与後24時間後より減少し始め、中毒末期には正常値の1/2以下になった(第1表)。

2. 出血型と Hb 量との関係： Warfarin 0.0025—1.25 mg を2週間連続投与(24時間毎に)した場合、薬量と死亡率との間に第2表に示すような関係が得られた。すなわち投薬量が多くても死亡までの日数に余り変化が認められない。そして 0.0025—1.25 mg の連続投与で生存した個体の PT は、0.25 mg 投与の場合では300秒以上に延長しているが、0.025—0.125 mg 投与の場合では300秒以上に延長するものと、軽度の延長(13.3—33.4秒)を示すものがある。そして 0.0025, 0.0125 mg 投与の場合では、PT の延長は軽度(10.4—34.2秒)であった。

次に 0.0025—1.25 mg の連続投与で死亡した個体の出血型は出血の顕著な器官から分類して脳、消化

管、肺、胸腔、肺および胸腔、消化管および胸腔出血型、その他の型式の7型式となる。その他の型式は出血が非常に少いか、体内の各所に出血があって、どの出血箇所が死亡原因となっているか判然としないものである。そして死亡までの日数の長いものは出血がやや著しく、Hb 量、体重の減少が大きかった。しかし死亡までの日数の短いものは体重、Hb 量の減少は軽度で出血は非常に少なかった。肺および胸腔、消化管出血型では Hb 量の減少が最も顕著であり、脳出血型では Hb 量の減少は非常に少ない。肺、胸腔、胸腔および消化管出血型、その他のものでは Hb 量はかなり減少し前記2者の中間に位する。そして胸腔、胸腔および消化管、肺および胸腔出血型の場合には心臓に顕著な斑状出血が認められるのが特長である。また肺および胸腔出血型、その他の型式(死亡までの日数の長いもの)では体重の減少が顕著である。そして肺および胸腔、肺、消化管出血型とその他の型式の例数はかなり多いが、各出血型と死亡までの日数との間に顕著な差は認められない(第3表)。

薬量と各出血型式の例数の関係を調べると、1.25 mg 投与区では消化管(4/10)、肺および胸腔(3/10)出血型が多く、0.25 mg 投与区では肺(5/17)、肺および胸腔(4/17)出血型が多かった。また 0.125 mg 投与区では胸腔および肺(6/8)出血型が最も多かった。0.0125, 0.025 mg 投与区では例数が少く薬量と出血型式の例数との間に明確な関係が認められなかった。

3. 体温に対する影響： Warfarin 第1回投与後24時間では体温はほとんど減少しないが、第2～3回投与後体温はほぼ赤血球数の減少と平行して低下した。

4. catalase, cholinesterase に対する影響：

a) *in vitro* では全血の catalase 作用は Warfarin により影響をうけなかった。つぎに Warfarin 中毒血の catalase 作用は Ht 値にはほぼ平行して減少し、中毒末期には正常値の20～30%を示した(第4表)。しかし血漿の catalase 作用は減少しなかった。

b) *in vitro* では Warfarin は血清 0.1 cc に対し 0.5 mg 以上の薬量で血清 ChE 作用を抑制する(第5表)。

Table 2. Relation between dosage and mortality. Continuous administration of Warfarin at every 24 hours for two weeks.

Body weight (g)	Dosage (mg)	Days survived	Mice died/ Mice tested
16.4(13.6—19.6)	1.25	7.7(4—15)	10/10
16.5(13.3—20.4)	0.25	7.0(4—14)	17/20
17.7(14.8—24.9)	0.125	8.4(5.5—12.8)	8/10
16.1(13.8—18.2)	0.025	5.9(3.6—11.1)	5/10
17.9(14.7—22.7)	0.0125	6.9(4—9.8)	2/10
16.5(13.3—20.9)	0.0025		0/10

Table 3. Relation between haemorrhagic types and haemoglobin quantity. Continuous administration of Warfarin at every 24 hours.

Dosage (mg)	Days survived	Numbers of mouse	Haemorrhagic types	Degrees of pulmonary haemorrhage			Haemorrhagic condition of the other tissues	Haemoglobin quantity (%)	Decrease of body weight (%)
				Water	Benzol	Observation by naked eyes			
0.025—1.25	5.8 (3.6—12)	3	B. haemorrhagic type	1/15	3/15	Pe. : +— E. : 0—	D. (+—) B. (—) H. (0—)	76.5 (70—81)	7.3 (1—15)
0.025—1.25	8.3 (3.6—14)	8	D. haemorrhagic type	1/40	1/40	Pe. : +— E. : 0—	D. (—)	29.9 (17—55)	9.8 (1—25)
0.25—1.25	6.8 (4—8)	6	P. haemorrhagic type	5/30	14/30	Pe. : +— E. : +—	D. (+) T. (0—+)	52.2 (29—64)	6.6 (0—19)
0.0125—0.25	8.9 (7—10)	2	T. haemorrhagic type	0/10	0/10	Pe. : ++ E. : 0—+	D. (+—) T. (—) C. (+—)	48 (37—55)	8.7 (1—13)
0.0125—1.25	7.4 (4—11.3)	14	P. and T. haemorrhagic type	15/70	61/70	Pe. : +— E. : +—	D. (+—) T. (—) C. (—)	30.9 (19—73)	11.2 (1—22)
0.25	7.3 (6.5—8)	2	T. and D. haemorrhagic type	2/10	2/10	Pe. : ++ E. : 0—	D. (—) T. (—) C. (+)	40 (39—40)	5 (1—9)
0.025—1.25	7.2 (4—12.8)	7	The other type	0/35	1/35	Pe. : +— E. : 0—	D. (+—) T. (0—)	56 (32—82)	11.9 (1—18)

B. : Brain; D. : Digestive organ; H. : Hypodermic lesion; T. : Thoracic cavity; C. : Heart; P. : Pulmonary; Pe. : Petechia; E. : Ecchymosis.

Table 4. Effect of Warfarin on catalase activity. Continuous administration of Warfarin (0.25 mg) at every 24 hours.

Collection time of blood after administration	PT (sec.)	Catalase activity of blood (%)	Haematocrit value
24th hour after 1st—3rd administration	45.0—>300	92	48—50
24th, after 3rd ad.	>300	70	44
24th, after 4th ad.	〃	64	40
24th, after 5th ad.	〃	52	29
24th, after 5th ad.	〃	30	13
Normal		100	53—55

つぎに Warfarin 中毒血清では、0.25 mg 連投の場合、血清 ChE 活性度は正常値を示した。しかし 5, 10 mg を投与した場合には第1回投与24時間後にその活性度はやや低下した。

次に黄磷剤、クロロホルムを投与した場合は、中毒初期から血清 ChE の活性度は増加する(第6表)。

5. 肝臓機能に対する影響: a) *in vitro* で肝磨砕原液、2倍稀釈磨砕液は PT を延長せしめるが、4, 8倍稀釈磨砕液は PT に対し影響を与えなかった、しかし Warfarin 5 mg 含有の 0.9% NaCl による PT 値の増加は Warfarin 5 mg を含有する肝臓磨砕原液の添加の場合よりも多く、Warfarin 5 mg 含有の 2—8倍稀釈磨砕液よりも少い(第7表)。

次に正常肝磨砕液と Warfarin 混合溶液を混合直後

あるいは混合後3時間(いずれも1個体あたりの Warfarin 投与量は 0.25 mg) に投与すると第1回投与24時間後の PT 値は対照個体のそれよりもかなり低く、また前者は後者よりも PT の回復が早い(第1図)。しかし Warfarin 0.25 mg 投与1時間後に肝磨砕原液を投与した場合は、供試個体の半数は PT の回復が対照個体よりも早かった。しかし Warfarin と肝磨砕原液の混合液を連続投与した場合、Warfarin による PT の延長は肝磨砕液により抑制されなかった。

b) Warfarin 0.25 mg を 4—5 回連続投与24時間後のマウスの肝臓を 50° で1昼夜乾燥し、磨砕した粉末を正常マウスに投与したが、PT は延長しなかった。また Warfarin 0.25 mg を 4—5 回連続投与24時間後のマウスの肝臓を磨砕し、その上清、沈澱物を正常

Table 5. Effect of Warfarin on serum cholinesterase (*in vitro*).

Dosage (mg / 0.1 cc serum)	End time of reaction (min.)	Δ PH (45 min.)
10	>135	0.5
5	90—135	0.7—1.1
3	90	1.1
1	75	1.1
0.5	75	1.3
0.25	60	1.3

マウスに投与しても PT の延長が認められなかった。

6. 中毒マウスの睾丸磨砕液、血清の皮内拡散作用：Warfarin 0.25 mg を 3~4 回投与後 24 時間のマウスおよび正常マウスの睾丸磨砕液の皮内拡散作用には差異が認められなかった。

また中毒血清、正常血清、0.9% NaCl の皮内拡散作用にも差異が認められなかった。

7. Warfarin を皮下注した場合の死亡率：Warfarin 4—9 mg を 1 回皮下注した場合、14 g 以上の個体では LD₁₀₀, LD₅₀ は夫々 9, 6 mg 前後であり、5 mg では全然死亡しなかった。しかし 12—14 g のマウスでは 4 mg 投与で高い死亡率が得られた。そして Warfarin の皮下注により中毒症状は早くあらわれ、歩行変調後まもなく歩行困難におちいり、呼吸は急速に減少してマウスは死亡する。中毒末期の麻痺時間は非常に短い。また 5—8 mg 投与で回復した個体もかなりひどい中毒症状をあらわし、歩行困難の状態を長時間示した。

つぎに Warfarin 5—9 mg とビタミン C (2.5—5 mg) + Rutin (5—10 mg) を同時に皮下注した場合の死亡時間、死亡率は Warfarin 単独投与の場合と同様の値を示した。

8. 中毒死マウスの病理組織学的観察：a) 肝臓：中毒初期には肝臓に病理組織学的変化が認められな

Table 7. Effect of liver brei on prothrombin time (*in vitro*).

Kinds of additional substance	PT (sec.)
Liver brei+Na-Warfarin 5 mg	23.9
Liver brei	11.8
Liver brei diluted+Na-Warfarin 5 mg twofold	38.4
Liver brei diluted twofold	10.8
Liver brei diluted+Na-Warfarin 5 mg four fold	43.6
Liver brei diluted four fold	9.4
Liver brei diluted+Na-Warfarin 5mg eight fold	46.6
Liver brei diluted eight fold	9.4
0.9% NaCl+Na-Warfarin 5 mg	30.8
0.9% NaCl	9.6
Non	9.4

1 cc of saline and a little quantity of sea sand is added to 1 g of liver (mouse), liver is homogenized, centrifuged and its supernatant was used as liver brei. And the prothrombin time of liver brei+CaCl₂ (1/40M) + thromboplastin + normal plasma (each equal) was measured at 37°C.

った。しかし中毒末期では局所的に肝細胞の潤濁、融解が認められる。また核は膨化し、原形質の空胞化が著しい。さらにまた血管の拡張、局所的な内出血が認められた。

b) 心臓：局所的に心筋繊維の軽度の断裂がみられた。また心筋細胞の核はやゝ萎縮し、冠状血管の裂開、赤血球の血管外への遊出が認められた。

c) 肺臓：個体によりかなりの相異はあるが、多くの肺胞は赤血球で充満していた。さらに終末気管支に多数の赤血球が存在し、ときには細気管支、大気管支に赤血球の多数存在するのが認められた。そして小血管の裂開、赤血球の血管外への遊出が認められた。また

Table 6. Effects of yellow phosphorus and chloroform on serum cholinesterase.

Drugs	Dosage	Collection time of blood after administration (hours)	End time of reaction (min.)	Δ PH (45 min.)
Yellow phosphorus	40 (mg)	5	30—45	1.5
		6	45	1.5
		9	30—60	1.4—1.5
Chloroform	0.06 (cc)	3	60	1.4
		6	45—60	1.4—1.5
		12	45	1.5
Normal			60	1.4

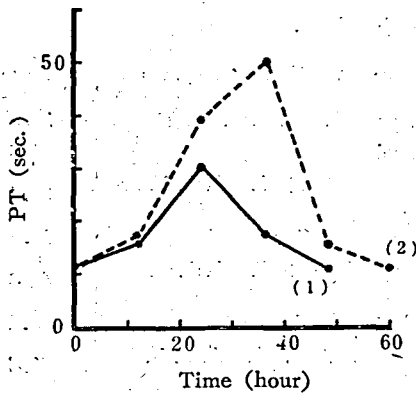


Fig. 1. Influence of liver brei on the anti-coagulation of Warfarin. 1): Liver brei + Warfarin (0.25 mg) 2): Warfarin (0.25 mg).

肺胞にリンパ球が多数認められた。

d) 腎臓：剖検で腎出血が認められたものは、糸球体部、曲尿細管、集合管に赤血球が多数認められた。また局部的に糸球体部の崩壊、膨化しているのが認められた。しかし剖検で腎出血していない個体の腎臓では著しい病理組織学的変化は認められなかった。

e) 腸管：じゅう毛組織の上皮細胞の融解、原形質の空胞化、核の膨化、小血管の裂開が認められた。

f) 腹腔動静脈：血管壁に病理組織学的変化が認められなかった。

9. 蛙の心臓に対する Warfarin の影響： a) Engelmann 法の場合：10, 8 mg の Warfarin を皮下注射すると最初から振幅、搏動数が減少した後搏動停止

するものと、最初搏動数のみ減少し、後に振幅も減少し、搏動停止するものがある。Warfarin 5 mg を皮下注射した場合は、搏動数が急速に減少後振幅も減少し搏動停止するものと、一時的に搏動数の減少後不完全ながら回復するものがある。0.5, 1 mg を皮下注射した場合は、搏動数は減少後回復の傾向を示すが、完全に回復しなかった。0.25 mg を皮下注射した場合は心臓の搏動に変化がみられなかった(第2図)。

つぎに Warfarin 5 mg と 0.05% Ad 0.5 cc を同時に皮下注射しても心臓の搏動数は急速に減少し停止した。そして Ad の投与量を増加すると、減少した搏動数はやゝ増加後急速に減少し停止した。また Warfarin 0.5 mg を皮下注射し、搏動数がやゝ減少したとき、0.1% Ad (3回)、0.1% At 0.5 cc を皮下注射しても回復せず、皮下注射前以下の搏動数を示した。

つぎに Warfarin 0.5 mg の皮下注射後 0.1% Ach 0.5 cc の皮下注射により搏動数は急速に減少するが、0.1% Ad, 0.1% At 0.5 cc の皮下注射により Ach の影響が除去され、搏動数はかなり回復した。

b) Straub 法の場合：摘出心臓に Warfarin 0.25, 0.5 mg を滴下すると、振幅は次第に増大し投与前の2~3倍に増大後次第に振幅は減少する。そしてかなり振幅が減少すると搏動数も減少し、まもなく停止する。振幅、搏動数の減少した時期に Ringer 液で洗滌し、0.1% Ad, At, Ach を 0.2 cc ずつ加えても変化なく、搏動は停止した。さらにまた Warfarin 0.25 mg を滴下し振幅増大期に 0.1% Ach 0.1 cc を滴下すると、急速に搏動は停止した。また Warfarin 0.25 mg + 0.1% Ach 0.1 cc を同時に投与しても、振幅は増

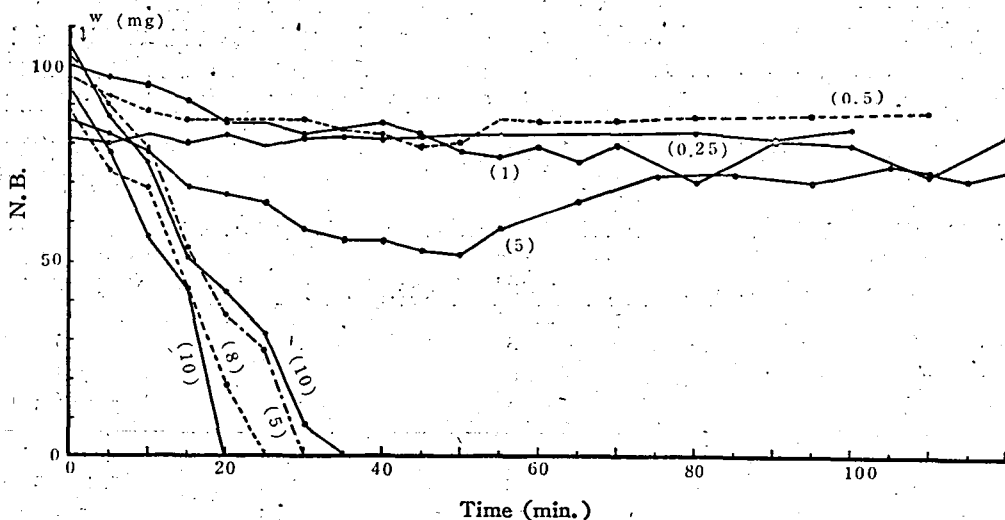


Fig. 2. Effect of Warfarin upon the frog's heart, (): Dose of Warfarin injected intracutaneously, N.B.: Numbers of beat (bats/min.)

大後減少し搏動数も減少した。

c) 蛙に Warfarin を皮下注した場合の心臓の搏動停止時間は 70~95 分であるが、Rutin + ビタミン C、ビタミン K₄ を同時に皮下注すると夫々 72~114, 100~155 分となり、搏動停止時間はやゝ延長する傾向を示した。そして毎分の搏動数の変化をみると、Warfarin 投与後搏動数がかなり減少したとき、Rutin + ビタミン C の皮下注によりそれは一過性の増加を示すが、ビタミン K₄ の投与によりこのような拮抗作用が認められなかった (第 3 図)。

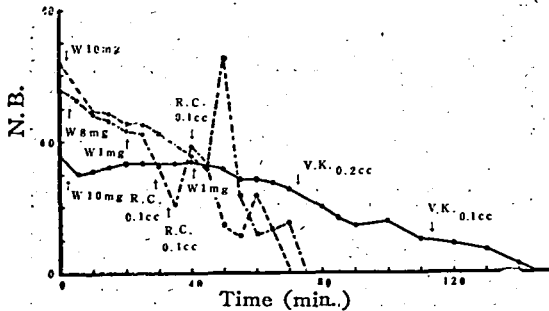


Fig. 3. Effect of Rutin-C and vitamin K upon the frog's heart poisoned with Warfarin. N.B.: Numbers of beat (mals/min.) ↓: Administration of drugs (injected intracutaneously)

10. 蛙の蹼膜、腸間膜血管に対する Warfarin の影響: Warfarin 5, 10 mg の皮下注により蹼膜血管は収縮後拡張するが、腸間膜血管は収縮後拡張するものと、最初から拡張するものとある。そして 0.5, 1 mg の皮下注では、蹼膜、腸間膜血管は最初から拡張した。また Warfarin による血管拡張は太い血管よりも細い血管に顕著であった。

Warfarin 1 mg の皮下注により腸間膜血管が拡張したとき 0.1% Ad 0.5 cc を皮下注すると血管は収縮し、ふたたび Warfarin 1 mg を皮下注するとまた拡張した。さらにまた Warfarin 1 mg の皮下注により腸間膜血管が拡張したとき 0.1% At 0.5 cc を皮下注

すると、また収縮後拡張し、ふたたび 0.1% At 0.5 cc を皮下注するとふたたび収縮後拡張した。また Warfarin 1 mg の皮下注により腸間膜血管が拡張したとき、0.1% Ad 0.5 cc を皮下注すると、収縮し、さらに 0.1% Ach 0.5 cc を皮下注すると、より一層収縮後次第に拡張した。

また Warfarin 1 mg の皮下注により腸間膜血管が拡張したとき 0.1% Ad, 0.1% Ach を各々 0.5 cc 皮下注すると収縮し、つぎに 0.1% At 0.5 cc を皮下注すると血管は拡張した (第 4 図)。

つぎに Warfarin 1 mg の皮下注または滴下による腸間膜血管の拡張は Rutin-C (rutin 5 mg, ビタミン C 10 mg), ビタミン K₄ (1 mg) の皮下注または滴下により抑制され、一過性の収縮を示した。

II. マウス腸管運動に対する影響: a) Warfarin (0.25—5 mg, 最終濃度 0.001~0.02%) によりマウス腸管運動の変化は 1) 振幅が次第に減少し麻痺する場合と、2) 振幅が減少または増大しながら tonus は増加後減少し、その後麻痺する場合とがある。そして腸管の運動麻痺後 Ringer 液での洗滌、あるいは At (10 mg, 終濃度 0.02%), Ad (5 mg, 終濃度 0.01%) を添加したが回復しなかった。また腸管の運動麻痺後 Ach (5—10 mg, 終濃度 0.01~0.02%), Es (2—6 mg, 終濃度 0.004~0.012%) を添加すると tonus がやゝ増大後麻痺した。さらに Ach, Es を添加しても tonus の増大が認められなかった。そして Warfarin の添加量が少いほど Ach, Es に対して強く反応を示し、tonus の増大が大きかった。また Warfarin による腸管運動麻痺後 BaCl₂ (2—10 mg, 終濃度 0.02~0.004%) を添加するとかなり大きな振幅、短い周期の運動がはじまるが、まもなく次第にそれらは減退し、Warfarin (0.5 mg) を添加すると運動は停止した。そして BaCl₂ (2 mg) を添加しても腸管運動はふたたびおこらなかった。

b) Ach, Es (5—10 mg, 終濃度 0.01~0.02%) を添加すると腸管の tonus は著しく増加するが、Warfarin (5—1 mg) の添加により tonus は次第に減少

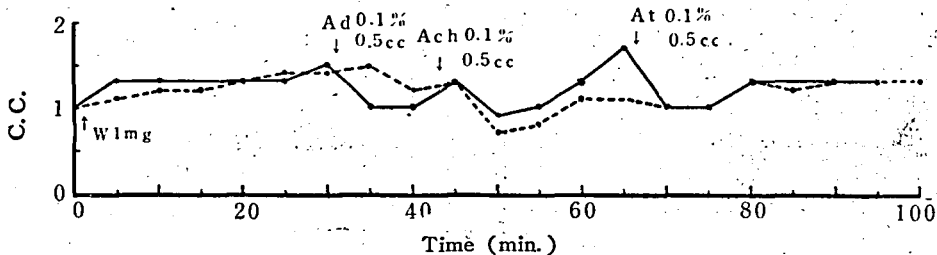


Fig. 4. Effect of Warfarin upon the blood capillary in frog's intestinal membrane. C.C.: Comparative coefficient of the capillary diameter, ↓: Administration of drugs (injected intracutaneously)

し運動は停止する。ふたたび Ach, Es を添加すると全く無反応か、一過性の僅少な緊張の増大が認められるだけであった。

つぎに At (5 mg, 終濃度 0.01%) による腸管運動麻痺後 Warfarin (2 mg) を添加しても全然反応を示さないが, BaCl₂ (4 mg, 終濃度 0.04%) の添加で一過性の運動がおこった。また At (5 mg) の添加により腸管運動が活潑になる場合があり, Warfarin (2—2.5 mg) を添加すると振幅は増大後小さくなるが運動を続ける。そしてふたたび At を添加すると振幅は次第に小さくなるが運動を続け, Ach (20 mg, 終濃度 0.04%) を添加してもなお微弱な運動を続けた後停止した。BaCl₂ (30 mg, 終濃度 0.06%) の添加により振幅, tonus は増大し, 運動は活潑になるが, Warfarin (2—5 mg) の添加により急速にそれらは減少し麻痺におちいった。

c) Warfarin (1.5—2 mg) による運動麻痺後, ビタミン C (15—30 mg, 終濃度 0.02—0.06%) を添加しても全然反応がおこらないが, Rutin (8 mg, 終濃度 0.016%) を添加すると一過性の運動がおこった。また Warfarin による運動麻痺後 Rutin—C (Rutin 5—50 mg, ビタミン C 10—100 mg) を添加すると運動がおこるが, Warfarin (0.5—1 mg) の添加により急速に振幅, 周期が減少し, 麻痺する。ふたたび Rutin—C を添加すると運動をはじめめるが, まもなく振幅, 周期が減少し停止した。しかし Warfarin により麻痺した腸管はビタミン K₃, K₄ およびニコチン酸アミド, メチオニン, グロン酸, サングリーンの添加により全然反応しなかった。

考 察

本実験で中毒死鼠の出血型式は出血の顕著な器官から7型式に分けたが, これは Warfarin による各器官の血管抵抗の減弱度が各器官によりかなり異なることを示すものである。そして消化管出血型では貧血によるショック死, 肺, 胸腔出血型では呼吸の減退による窒息死, 脳出血型では人間の卒中に類似した中毒死の経過をとるものと考えられる。また胸腔出血型のものでは心臓に大きな斑状出血が認められるので冠状血管の裂開により胸腔に大量の血液が流出するものと考えられる。その他の型式で中毒死したもののうち肺, 消化管等の各器官に中程度の出血が認められるものでは体重の減少が顕著であり死亡までの日数も長いが Hb 量の減少は著しくないで, その死因は生体内各器官における出血のために生理機能が低下し, 全身衰弱によるものと考えられる。また各器官に顕著な出血がなく中毒死したものは, 恐らく Warfarin に対する感

受性が高く, 心臓麻痺 (後で述べるように Warfarin の皮下注により心臓麻痺がおこることが推定されるので) により死亡するものと考えられる。

Warfarin を2週間連続投与してもなお生存した個体のうち, 投薬量の多い場合には, その PT は300秒以上に延長していた。これは PT が300秒以上に延長しても, 必ずしも血管障害がともなわず死亡しなかったものと思われる。また投薬量が少い場合には, PT はあまり延長しない。これは体内で Warfarin の蓄積が著しくなく, 回目の投薬による毒作用を増強するに至らないためと考えられる。

中毒がかなり亢進すると Ht 値, 赤血球数の減少に平行して体温および catalase 作用が低下した。これは中毒末期には内出血による貧血のために呼吸機能, その他の生理機能が著しく低下することを示すものである。

in vivo で少量の Warfarin 連投により1次的には血清 ChE は影響をうけないが, しかし大量ならばやや低下した。*in vitro* でも多量の Warfarin が血清 ChE の活性度を低下せしめることから, 血清 ChE の活性度の低下は Warfarin の直接作用によるものである。また黄磷剤, クロロホルム中毒では1次的に血清 ChE の活性度は増加した。血清 ChE は pseudo ChE であり, 肝実質細胞で生成されることが知られている²²⁾ ので, 黄磷剤, クロロホルムにより肝実質細胞の破壊, 変性がおこり, 血中に ChE が放出されたものと考えられる。そして筆者は黄磷, クロロホルムにより1次的に LF, SF, prothrombin が減少するが, Warfarin 中毒では1次的に prothrombin, SF が顕著に減少し, 中毒末期に LF, fibrinogen が僅かながら減少するものがあることを明らかにした⁶⁻¹¹⁾。さらに本実験で Warfarin 中毒初期には肝臓に著しい組織学的変化はみられないが, 中毒末期に顕著な変性が認められた。また正常肝磨砕液はいくらか Warfarin を無毒化する性質をもち, 中毒末期の鼠の肝磨砕液には PT 延長作用が認められなかった。また第6報⁹⁾ でビタミン K により Warfarin による PT 延長作用が抑制されることが明らかになったが, prothrombin と SF の性質がかなり類似していて両者の減少による疾患の PT はビタミン K によりかなり回復することが知られている¹⁴⁾。また prothrombin, SF, LF, fibrinogen は肝実質細胞で生成されることが知られている^{12-14, 25, 26, 28, 30)}。また Dicumarol は血中からすみやかに肝臓に移行し²⁷⁾, Warfarin でも血中濃度は投与後に急速な増大後減少することが明らかにされている²⁰⁾。したがって Warfarin の生体内の代謝は不明であるけれども, それは肝臓毒とことなり肝実質細胞に機能的に影響を与えることによりビタミン K の利

用を妨げ、肝実質細胞の prothrombin, SF の生成を抑制するといえる。

本実験で多量の Warfarin を皮下注した場合では、中毒症状が非常に早くあらわれ、死亡までの時間が非常に短かく、また蛙に多量の Warfarin を皮下注すると心臓の搏動は急速に衰え、短時間で停止することが明らかになった。したがって多量の Warfarin をマウスに皮下注した場合の死因は心臓麻痺によるものと推察される。そして多量の Warfarin を鼠に経口的に投与した場合には¹⁷⁾、皮下注した場合とことなり（出血死）、心臓の搏動を停止するのに十分な薬量が短時間で血中に蓄積されないものと考えられる。

Warfarin 中毒マウスの辜丸磨砕液の皮内拡散作用は正常値と差異がなく、また中毒血清には皮内拡散作用が認められなかった。辜丸磨砕液の皮内拡散作用は主として hyaluronidase の作用によることが知られている²⁰⁾。したがって Warfarin 中毒による血管抵抗の減弱は hyaluronidase に関係がないといえる。

病理所見から心臓、肺の小血管が裂開して赤血球が血管外に遊出しているのが観察されたが、腹腔大動脈に著変を認めなかった。また投薬回数増加とともに PT、出血時間は延長し、これは生体内で出血がおこると止血がおこりがたく、著しい内出血を生ずることを示すものである。

Warfarin の皮下注により蛙の心臓の搏動は次第に衰え、停止し（Engelmann 法）、また摘出心臓（Straub 法）では、振幅は増大後減少し、搏動が停止した。そして Warfarin の心臓に対する作用は自律神経毒の影響をほとんどうけなかった。Ad は交感神経節を刺激することにより、At は副交感神経節を麻痺することにより心筋を亢奮せしめ、Es, Ach は副交感神経節を刺激することにより心筋に麻痺的に作用することが知られている²¹⁾。したがって Warfarin は心筋自体に作用し、心筋の亢奮→麻痺作用または麻痺作用を示すといえる。そして摘出心臓では Warfarin の刺激作用が明確に認められるが、Engelmann 法では麻痺作用のみがあらわれるものと考えられる。

Warfarin の皮下注により蛙の蹼膜血管は収縮→拡張または拡張し、腸間膜血管では拡張した。そして Warfarin により拡張した血管は Ad, Ach, At の投与により多少収縮するが、まもなく著しく拡張した。またマウスの腸管運動は Warfarin により運動亢進→麻痺または麻痺し、Ach, Es および筋自体に刺激的に作用する BaCl₂ の添加により一過性の僅少な tonus の増加が認められたにすぎなかった。そして Ach, Es, BaCl₂ の添加により腸管の tonus、振幅が増大したとき Warfarin を添加するとまもなくそれは減退し麻痺

した。Ad は交感神経節を刺激、At は副交感神経節を麻痺することにより血管は収縮し、腸管運動は麻痺し、Ach, Es は副交感神経節を刺激することにより血管は拡張し、腸管運動は活潑になることが知られている²²⁾。したがって Warfarin による血管の収縮→拡張または拡張、腸管運動の亢進→麻痺または麻痺は自律神経毒および BaCl₂ により多少拮抗作用をうけるが、心臓に対する作用から血管および腸管の筋自体の亢奮→麻痺または麻痺によるものといえる。そして Ach による血管の収縮は心臓機能の低下によるものと思われる。

Coumarin は蛙、家兎の心臓、家兎の腸管に対して麻痺作用を示し、蛙の血管（後肢灌流）、家兎の耳鼓血管、冠状血管を拡張する作用があり、これらの Coumarin の作用は心筋、血管、腸管の筋自体の麻痺によることが明らかにされている¹⁹⁾。したがって Warfarin と Coumarin の薬理学的性質はかなり類似しているといえる。

Table 8. Relation among prothrombin time, major haemorrhagic causes and several physiological functions.

	Prothrombin time	
	300 sec. >	> 300 sec.
Benzidin reaction of feces	+ → ++ ○	+ ~ ++
Benzidin reaction of urine	○	○, + ~ ++
Haematocrit value	} + → -	≡
Erythrocytes		
Erythrocyte resistance	○	○, -
Blood catalase activity	} ○ → -	= ~ ≡
Haemoglobin quantity		
Sedimentation velocity of erythrocyte	○ → +	+ ~ ++
Blood platelets	+, - → -	-
Leucocytes	〃	〃
Eosinophils	〃	≡
Degree of pulmonary haemorrhages	+ → ++	++ ~ ++
Pulmonary capillary resistance	- → =	= ~ ≡
Skin capillary resistance	〃	〃
Bleeding time	+ → ++	++
Tissue thromboplastin	○ → ○, -	=
Total serum protein	○, -	
Plasma amylase activity	○	+ ~ ++
Serum cholinesterase activity	○	○
Body temperature	○ → -	= ~ ≡
Intracutaneous diffusion of hyaluronidase	+ → ++	++ ~ ++

+ : increase, - : decrease, ○ : normal

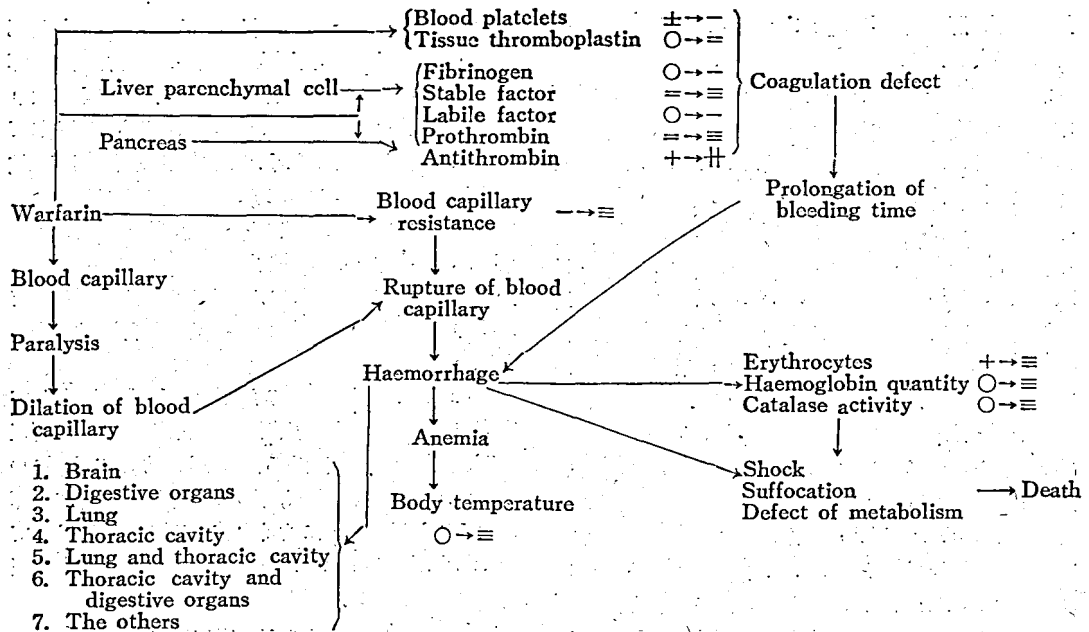


Fig. 5. Toxicological action of Warfarin. + : increase, - : decrease, O : normal

すでに多量の Warfarin を経口的に 1 回投与するよりも、薬量の多少にかかわらず毎日連続投与することにより 4~5 日後に大部分の鼠が死亡することが明らかにされている^{16, 17)}。そして 1 回投与では血管抵抗の減弱は著しくないが、連続投与すると、投薬回数の増加、凝血障害の亢進に平行して血管抵抗が著しく減弱した⁹⁾。さらに各回投与 24 時間後の血中の Warfarin 濃度はほぼ同一であることが知られている²⁰⁾ので、一定の薬量が一定の期間血中に存在することにより持続的に Warfarin が血管に影響を与え血管抵抗の減弱をもたらすものと考えられる。また本実験で中毒血清に血管透過性亢進因子の如き物質の増加が認められず、血管透過性因子である hyaluronidase は Warfarin による血管障害と関係がないことが明らかになった。さらに Warfarin は蛙の血管に直接作用して拡張せしめ、小血管ほど拡張が著しいことが明らかになった。以上のことから Warfarin の血管拡張作用が血管抵抗減弱の主要な原因であると考えられる。

Warfarin の皮下注によるマウスの死亡時間は Rutin-C の同時投与により影響をうけなかったが、蛙の心臓停止時間は Rutin-C またはビタミン K₄ の同時投与によりやや延長の傾向を示した。また Warfarin による蛙の蹠膜、腸間膜血管の拡張および腸管運動の麻痺は Rutin-C、ビタミン K₄ の投与により一時的に抑制された。草野²¹⁾は Warfarin による PT の延長および死亡までの日数はビタミン K₄, K₃, C, Rutin により影響をうけないが、これらのビタミンを

投与した中毒死鼠の諸組織の出血程度は Warfarin 単独投与のものよりもやや軽度であることを明らかにした。これはこれらのビタミンの投与により Warfarin による血管抵抗減弱が抑制されたことによるものと考えられる。

結 論

1. Warfarin は肝臓毒と異なり、肝実質細胞に機能的に影響を与え、prothrombin, SF を減少せしめるといえる。

2. Warfarin 中毒の際の PT と出血性要因および生理機能との間に第 8 表のような関係がある。すなわち PT の延長と平行して血管抵抗は減弱し、中毒初期から主として肺、胃腸管に出血がおこってくる。PT 値が 300 秒以上に増大すると出血時間は延長し、組織 thromboplastin の活性度が低下し、同時に赤血球数、Ht 値、Hb 量は激減する。そして肺、胃腸管の内出血は著しくなり、心臓、肝臓等の諸組織にも出血が認められるようになる。また赤血球数、Ht 値の減少に平行して血液 catalase 作用、Hb 量は減少し体温は低下する。そして血管抵抗の減弱は器官によりことなり、肺、胸腔に出血が著しい場合には窒息死、他の諸組織の場合では貧血によるショック死の経過をとるものと考えられる。

3. 一定量の Warfarin が一定の期間血中に存在することにより持続的に血管に影響を与え血管抵抗の減弱がおこるものと考えられる。

4. Warfarinの血管拡張作用が血管抵抗減弱の主要な原因であると考えられる。そして現在までに行ってきた研究の結果 Warfarin による中毒死の機構は第5図に示すようになる。

文 献

- 1) Galeone, A. & A. Romagnolo: Minerva Med. **39**, 169 (1948).
- 2) 福原武: 生理学実験法 南山堂 (1956).
- 3) Jaques, L. B. & J. W. T. Spinks: Conf. on Blood Clotting and Allied Problems **3**, 68 (1950).
- 4) Kapp, E. M. & A. F. Coburn: J. Biol. Chem. **145**, 549 (1942).
- 5) 加藤勝治: 血液学研究法 南山堂 (1948).
- 6) 草野忠治: 応動 **21**, 173 (1956).
- 7) —: 衛動 **7**, 208 (1956).
- 8) —: — **7**, 214 (1956).
- 9) —: — **8**, 20 (1957).
- 10) —: 応動 **2**, 78 (1958).
- 11) —: — (投稿中).
- 12) Munro, F. L., E. R. Hart, M. P. Munro & A. A. Walkling: Am. J. Physiol. **145**, 206 (1945).
- 13) Mann, F. D., N. W. Barker & M. Hurn: Blood **6**, 838 (1951).
- 14) Mann, F. D. & M. H. Hurn: Am. J. Physiol. **164**, 105 (1951).
- 15) 三坂和英: 応動 **18**, 39 (1954).
- 16) —: 草野忠治: — **20**, 56 (1955).
- 17) —: —: — **21**, 120 (1956).
- 18) 小沢光・奥田朝晴: 薬学 **3**, 264 (1949).
- 19) 頼其禄: 日薬物雑 **21**, 86 (1935).
- 20) 梶原作: ビアルロニダーゼと臨床 医学書院 (1951).
- 21) 柴田進: 臨床化学の実際 金芳堂 (1951).
- 22) —: 総合医学 **12**, 986 (1955).
- 23) 高橋浩・柴田進: 医学と生物学 **20**, 96 (1951).
- 24) 田中英雄・荒木俊枝: 衛動 **5**, 56 (1954).
- 25) Urnas, B.: Acta Physiol. Scandinav. **3**, 97 (1942).
- 26) Warren, R. & J. E. Rhoads: Am. J. Med. Sci. **195**, 193 (1939).
- 27) Weiner, M., S. Shapiro, J. Axelrod, J. R. Cooper & B. B. Brodie: J. Pharm. Exptl. Therap. **99**, 409 (1950).
- 28) 吉本利文: 日血会誌 **14**, 32 (1951).
- 29) Yamagata, S., S. Seino & T. Nakao: Toho-

ku J. Exptl. Med. **57**, 85 (1952).

- 30) 山形敬一: 細網内皮系統と肝機能 医学書院 (1954).

Résumé

The effects of Warfarin on the several physiological functions of mice have been examined, and the following results were obtained.

1. By continuous administrations of Warfarin, prothrombin time and bleeding time were prolonged at the initial stage of poisoning, and afterwards the number of erythrocytes and haemoglobin quantity decreased according as the both times were prolonged.

2. Continuous administrations of the Warfarin bait (0.0025—1.25 mg) for two weeks resulted in a LD₅₀ of about 0.025 mg. Killed mice could be classified into seven types based upon the organ that haemorrhaged remarkably: 1) brain haemorrhagic type, 2) digestive organ haemorrhagic type, 3) lung haemorrhagic type, 4) thoracic cavity haemorrhagic type, 5) lung and thoracic cavity haemorrhagic type, 6) digestive organ and thoracic cavity haemorrhagic type, 7) the other type. Among these types, the lung and thoracic cavity, and the digestive organ haemorrhagic types were predominated. The decreases of haemoglobin quantity and body weight in these types were remarkable.

3. In the initial stage of Warfarin poisoning body temperature was normal, whereas it was lowered in parallel with the decrease in the number of erythrocytes according as the poisoning developed.

4. Blood catalase activity was not affected by Warfarin *in vitro*.

In the mice poisoned by Warfarin, when erythrocytes decreased in number considerably, blood catalase activity decreased.

5. Serum cholinesterase was inactivated by the doses of more than 0.5 mg of Warfarin *in vitro*.

With continuous administrations of 0.25 mg Warfarin, serum cholinesterase activity was normal, but the activity slightly decreased 24 hours after the first administration of 5 and 10 mg.

In the mice poisoned by yellow phosphorus and chloroform, serum cholinesterase activity

increased considerably.

6. Anticoagulation activity of Warfarin was depressed slightly by adding the normal brei *in vitro*.

When a mixture of Warfarin (0.25 mg) and liver brei was administered orally (single administration), the prolongation of the prothrombin time was slightly depressed and the prothrombin time recovered to normal value faster than the administration of Warfarin alone. However, when the mixture was administered continuously, the prothrombin time prolonged progressively.

Liver brei and its dry powder (heated at 50°C for 24 hours) obtained from the mice 24 hours after a series of 4 to 5 continuous administrations of Warfarin did not show the prolongation of the prothrombin time.

7. Diffusion area of india ink caused by testicles brei and serum from the mice 24 hours after a series of 3 to 4 continuous administrations of Warfarin was the same as that of the untreated control.

8. By the pathological and histological investigations of liver, heart, lung, kidney and intestine of the mice poisoned by Warfarin, degeneration of cells, rupture of small blood capillary and haemorrhage were observed. In large blood vessels of abdominal cavity, however, pathological and histological changes were not observed.

9. Warfarin acted directly on the muscles of the heart and the blood vessels in both web and intestinal membranes in frogs, and the intestinal muscle of mice, causing either excitation

followed by paralysis or paralysis alone.

10. The time necessary for the death of the mice injected intracutaneously with Warfarin was not affected by the simultaneous injection of Rutin + vitamin C, while the time necessary for the stoppage of the frog heart beat showed a tendency to prolong by the simultaneous injection of Rutin + vitamin C or vitamin K₁. The dilation of the capillary vessels of web and intestinal membranes of frog was inhibited temporarily by the injection of Rutin + vitamin C or vitamin K₁, and the paralysis of the intestinal movement of the mice treated by Warfarin was antagonized for a time with the addition of Rutin + vitamin C.

11. From the results of the studies up to date, the mechanism of Warfarin poisoning can be explained as follows:

1) Unlike liver poisons, Warfarin causes coagulation defect by affecting functionally the parenchymal cells of liver, bringing about the decrease in prothrombin and the stable factor.

2) Remarkable haemorrhage that is the major cause of the death by Warfarin, can be attributed both to the prolonged bleeding time caused by coagulation defect, and to the rupture of capillary vessels caused by the decrease in resistance of capillary wall.

3) It is supposed that the presence of a certain amount of Warfarin in capillary for some time is responsible for the decrease in resistance of capillary wall. It can be said that the capillary dilation action of Warfarin is the major cause of the decrease in capillary resistance.

昭和33年11月25日印刷 昭和33年11月29日発行

防虫科学 第23卷—Ⅳ 定価 ¥180.

主 幹 武居三吉 編集者 内田俊郎

京都市左京区北白川 京都大学農学部

発行所 財団法人 防虫科学研究所

京都市左京区吉田本町 京都大学内
(振替口座・京都5899)

印刷所 大宝印刷株式会社

京都市南区東九条西岩本町八