

プロトロンビン生成に関する研究

昭和38年10月30日受付 (特別掲載)

信州大学医学部松岡内科学教室

(指導: 松岡松三教授)

峯 村 直

Studies on the Synthesis of Prothrombin

Tadashi Minemura

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. Matsuzo Matsuoka)

緒 言

ビタミンKの欠乏により出血傾向が出現することは古くより多くの記載がある。1934年 Dam^{①②}は脂溶性の抗出血因子を発見しビタミンKと命名したが、Dam等^③、Schönheyder^④、Quick^⑤は、このような出血はビタミンKの欠乏によつて、プロトロンビンが減少するためであるとした。ビタミンKの作用機序は、なお不明の点が多いが、主として肝臓においてプロトロンビン生成酵素の補酵素としての役割を有するものとされている^{⑥⑦}。Lasch等^{⑧⑨}は肝のミトコンドリアは、ビタミンKの存在のもとに第Ⅷ因子からプロトロンビンを生成すると報告している。クマリン系^⑩およびインダンジオン系の抗凝血薬は、肝内および肝外の網内系におけるプロトロンビンの生成を妨げるが、Winterstein^⑪は、これらの薬剤はプロトロンビン生成の酵素系において、ビタミンKと拮抗的に作用してビタミンKを追い出すためであるといっている。ビタミンKの作用に関して Martiusら^⑫は、ビタミンK欠乏動物の肝のミトコンドリアの酸化的磷酸化反応は低下するが、ビタミンKの添加によつて回復し、またデイクマロール系の抗凝血薬は、ビタミンKと拮抗して、酸化的磷酸化反応を阻害する^{⑬⑭}ことから、プロトロンビン合成のエネルギー源は、酸化的磷酸化反応であつて、この反応を介してビタミンKはプロトロンビンの生成に関与するといっている。

著者は、ビタミンKの作用を中心としてプロトロンビンの生成と、酸化的磷酸化反応との関係について検討したので報告する。

実験 I

酸化的磷酸化反応に対するビタミンKとクマリン系およびインダンジオン系の抗凝血薬の影響について検

討した。

実験材料と実験方法

- 1) 実験動物: Wister系ラット(配合飼料で飼育)
- 2) 反応溶液, 酵素液の調製: ラットの肝の20%ホモジネートを次のように調製した。0.154MのKCl水溶液1000容に0.04MのKHCO₃ 8容を加えたものをメジウムとした。ラットを断頭して殺し、ただちに肝をとり出して氷冷したメジウム中で細断して洗い秤量して肝1に対して4の氷冷メジウムを加え、ガラス製のPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで氷冷しながら1000 r. p. m.の廻転で2分間磨砕したものを酵素液とした。Warburg 検圧計の反応容器の内容は次のようなものとした。(表1)

主室: 酵素液 1.0ml (13~17mgN), 基質は0.05MのNa Pyruvate 0.2ml。無機燐受容系は、①0.02MのNa ATP (アデノシン三燐酸ナトリウム) 0.1mlと、②0.4MのGlucose 0.1mlとHexokinase (イースト) 0.1ml。ほかに0.1M 燐酸緩衝液0.6ml, 0.1M MgCl₂ 0.1ml, 0.2M KF 0.2ml, ビタミンKまたはクマリン系抗凝血薬0.1mlを加えて総量2.5mlとした。

側室: 50%三塩化醋酸 0.3ml。

副室: 20% KOH 0.2ml。

- 3) 反応条件: 反応容器に酵素液を除いたすべての試薬を入れて氷冷し、新鮮な酵素液を加えてただちに検圧計にとりつけ、空気を気相として30°Cの恒温槽中で5分間予振して、温度平衡を待ち酸素の吸収を測定した。5分~20分の反応ののち側室の三塩化醋酸を添加して反応を止め、無機燐の濃度を測定した。

4) 酸素吸収の測定: Warburg 検圧法。

5) 無機燐濃度: Fiske-Subbarow法^⑭。

6) P: O比の計算: 温度平衡終了時に反応を止め

表 1. 反 応 系 組 成

添 加 溶 液	終末濃度
0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)	0.6ml
0.05M Na Pyruvate	0.2ml
0.1 M MgCl ₂	0.1ml
0.02M Na ATP	0.1ml
0.4 M Glucose	0.1ml
0.2 M KF	0.2ml
20% Rat Liver Homogenate/0.154M KCl	1.0ml
Hexokinase (yeast)	0.1ml

(30°C: 空气中)

て無機燐を測定し、これを基準として反応中の無機燐消失量を求めた。

7) ビタミンK: 次の5種を用いた。

ビタミン K₁ (2-methyl-3-phytyl-1.4-naphthochinone)=Konachion, Firma Hoffmann-La Roche

ビタミン K₂ (2-methyl-1.4-naphthochinone)=メナジオン, 武田

ビタミン K₃ 重亜硫酸塩 (2-methyl-1.4-naphthochinone Sodium bisulfite)=カチーフ, 武田

ビタミン K₄ 燐酸エステル (2-methyl-1.4-naphthohydrochinone diphosphoric acid ester tetra sodium salt)=無痛カチーフ, 武田

ビタミン K-S (II) (S-(2-methyl-1.4-naphthochinonyl-3)-β-mercaptopropionic acid)=K-S (II), 武田

8) 抗凝血薬: 次の2種を用いた。

シントローム (3[(α-4'-Nitrophenyl-β-acetyl)-ethyl]-4-oxycoumarin)=Sintrom, Geigy

インジオン (2-Phenyl-indan-1.3-dion)=Indion, 第一化学

実験成績

1) 酸化的燐酸化反応に対するビタミン K₁ の影響

反応容器の4個にビタミン K₁ を終末濃度で 10⁻⁴M になるように添加し、対照の4個には 0.154M の KCl 水溶液を加えて 30°C で反応させた。無機燐濃度測定の基準は対照と同じものを別にとつた。ビタミン K₁ 群も対照群も共に 5, 10, 15, 20分に各1個の容器の反応を止めた。おのおのの酸素吸収量 (ΔO₂) と無機燐消失量 (ΔP) は図1, 表2に示す。

両群とも酸素吸収量、無機燐消失量はほぼ直線的に

近く増加したが、P:O 比は対照群で 2.06, 2.04, 1.93, 1.87であつたが、ビタミン K₁ 添加群では 2.22, 2.38, 2.34, 2.21であつた。各反応時間の P:O 比はいずれもビタミン K₁ 添加群が対照よりも大で、それぞれ 7%, 16%, 21%, 18%, 平均 15.5%の酸化的燐酸化反応の促進がみとめられた。

2) 酸化的燐酸化反応に対するビタミン K₄ 燐酸エステルの影響

同様にビタミン K₄ 燐酸エステルを終末濃度で 10⁻⁴M 添加して5分~20分反応した場合の P:O 比の変化を表2, 図2に示す。

この場合の対照群の5~20分反応の時の P:O 比はそれぞれ 1.89, 1.92, 2.00, 1.85でビタミン K₄ 燐酸エステル添加群の P:O 比は 2.08, 2.14, 2.18, 2.03で、いずれも対照群より大で、それぞれ 10%, 9%, 9%, 9%, 平均 9%の酸化的燐酸化反応の促進をみとめた。

3) 酸化的燐酸化反応に対する Sintrom の影響

終末濃度 10⁻⁴M の Sintrom を添加した場合の5分~20分反応した P:O 比の変化を表2, 図3に示す。

対照群の P:O 比は 2.04, 2.32, 2.30, 2.18であつたが、Sintrom 添加群の酸素吸収量は対照に比して

図 1. Oxidative Phosphorylation に対する Vitamin K₁ の影響

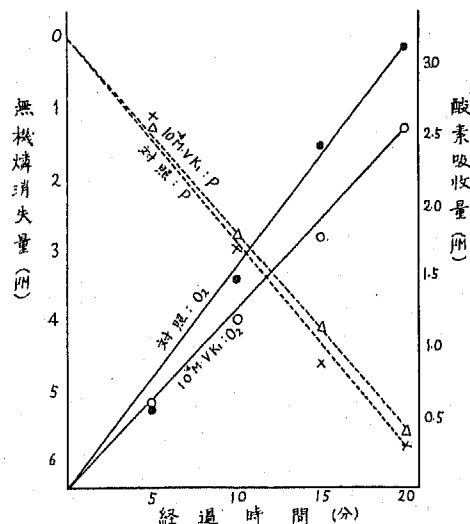
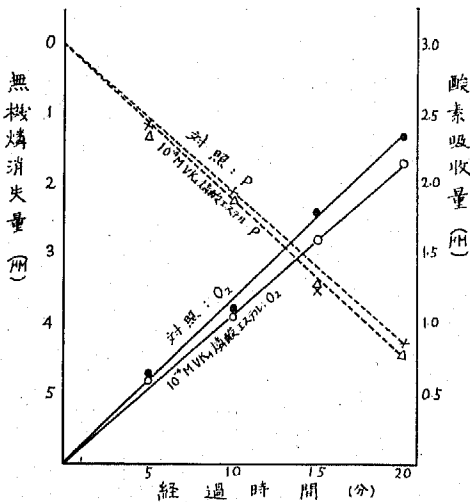


表 2. Oxidative Phosphorylation に対する Vitamin K, Sintrom の影響

経過時間分	ΔO_2 μM	ΔP μM	P:O	ΔO_2 μM	ΔP μM	P:O	P:O 差 %
Vitamin K ₁ 10 ⁻⁴ -M							
5	0.56	1.15	2.06	0.59	1.30	2.22	+ 7
10	1.49	3.00	2.04	1.19	2.85	2.38	+ 16
15	2.42	4.65	1.93	1.77	4.15	2.34	+ 21
20	3.12	5.80	1.87	2.54	5.61	2.21	+ 18
VK ₄ 磷酸エステル 10 ⁻⁴ M							
5	0.64	1.20	1.89	0.60	1.25	2.08	+ 10
10	1.10	2.15	1.92	1.05	2.25	2.14	+ 9
15	1.78	3.55	2.00	1.59	3.45	2.18	+ 9
20	2.32	4.30	1.85	2.14	4.35	2.03	+ 9
Sintrom 10 ⁻⁴							
5	0.22	0.45	2.04	0.83	0	0	-100
10	0.86	2.00	2.32	1.60	+0.5	0	-100
15	1.41	3.25	2.30	2.54	+0.5	0	-100
20	1.82	3.97	2.18	3.30	+0.5	0	-100

図 2. Oxidative Phosphorylation に対する VK₄ 磷酸エステルの影響



異常に大であつたが、無機燐の消失はまったくなく P:O 比はいずれも 0 で、酸化的燐酸化反応を完全に阻害した。

4) 以上の実験で反応10分または15分のときの P:O 比が最大を示したので、以下に反応10分のときの P:O 比を目標にして、種々の濃度のビタミン K および抗凝血薬を添加したときの酸化的燐酸化反応について検討した。

表 3 に示すように、ビタミン K₁ を添加した場合の酸化的燐酸化反応の促進の程度は、終末濃度 10⁻⁴M で 23%、同じ酵素液を使った反応系に 10⁻⁵M のビタミン K₁ を添加したものでは 28% の促進をみとめた。

図 3. Oxidative Phosphorylation に対する Sintrom の影響

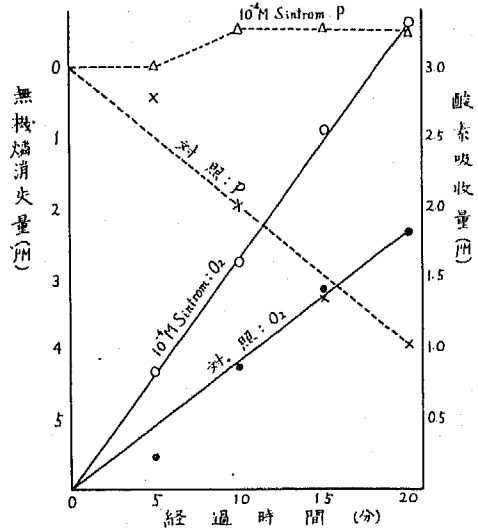


表 3. Oxidative Phosphorylation に対する Vitamin K の影響

添 加 剤	終末濃度 M	ΔO_2 μM	ΔP μM	P:O	P:O 差 %
Vitamin K ₁	対照	5.01	6.98	1.39	—
	10 ⁻⁴	4.52	7.75	1.71	23
	10 ⁻⁵	4.79	8.52	1.78	28
VK ₄ 磷酸エステル	対照	5.28	9.75	1.84	—
	10 ⁻⁴	4.59	9.00	1.96	7
	10 ⁻⁵	3.94	7.60	1.93	5
VK ₂ 重亜硫酸塩	対照	4.47	8.20	1.83	—
	10 ⁻⁴	3.05	5.00	1.64	—
	10 ⁻⁵	2.98	5.02	1.69	3
VK ₃ (Menadione)	対照	2.88	4.95	1.72	5
	10 ⁻⁴	2.67	5.95	2.23	—
	10 ⁻⁵	2.45	5.45	2.22	—
KS (I)	対照	2.25	5.25	2.31	4
	10 ⁻⁴	1.85	4.20	2.27	2
	10 ⁻⁵	2.09	4.65	2.22	—

ビタミン K₄ 磷酸エステルを添加した場合には 10⁻⁴M で 7%、10⁻⁵M で 5% の P:O 比の増大をみとめた。

したが、 $10^{-6}M$ では促進効果はみられなかつた。ビタミン K_3 重亜硫酸塩を添加した場合には $10^{-4}M$ で3%、 $10^{-5}M$ で5%の P:O 比の増大をみとめた。ビタミン K_3 の添加では $10^{-5}M$ のとき4%の P:O 比の増大を認めしたが、 $10^{-4}M$ では促進効果はみられなかつた。K-S (II) の添加では $10^{-4}M$ のときの P:O 比の増大は2%であつたが、 $10^{-5}M$ では促進効果はみられなかつた。

終末濃度 $10^{-4}M$ の Sintrom を添加した場合には表4に示すように82%の P:O 比の減少がみられ、燐酸化反応の非共軛化は、いちじるしかつた。 $10^{-5}M$ では16%の、 $10^{-6}M$ では3%の P:O 比の減少があり、軽度の非共軛化をみとめた。Indion を添加した場合 $10^{-4}M$ では70%、 $10^{-5}M$ でも52%の P:O 比の減少をみとめ、阻害効果は、いちじるしかつた。

表4. Oxidative Phosphorylation に対する抗凝血薬の影響

添 加 剤	終末濃度 M	ΔO_2 μM	ΔP μM	P:O	P:O 差 %
Sintrom	対照	5.28	9.75	1.84	—
	10^{-4}	7.14	1.50	0.33	-82
	10^{-5}	6.19	9.55	1.54	-16
"	10^{-6}	4.48	9.55	1.78	-3
Indion	対照	4.20	9.01	2.14	—
	10^{-4}	3.49	2.25	0.61	-70
	10^{-5}	3.62	4.05	1.11	-52
Sintrom	対照	5.01	6.98	1.39	—
	10^{-4}	5.04	2.55	0.50	-64
	10^{-4}	5.28	2.75	0.52	-63
Sintrom + VK_4 燐酸エステル	10^{-4}	4.39	2.55	0.58	-58
	10^{-4}	4.55	2.35	0.52	-63
Indion	対照	2.90	6.40	2.22	—
	10^{-4}	2.25	2.25	1.00	-55
	10^{-4}	2.09	2.25	1.07	-51
Indion + VK_3 重亜硫酸塩	10^{-4}	2.31	2.20	0.95	-57
	10^{-4}				

ビタミンKと抗凝血薬を同時に添加した場合の P:O は、表4に示すように終末濃度 $10^{-4}M$ の Sintrom を単独に添加した場合の P:O の減少は63~64%であつたが、Sintrom と等モル濃度のビタミン K_4 燐酸エステルを同時に添加した場合の P:O は58~63%の減少をみとめ、Sintrom を単独に添加したものと、

ほとんど差がなかつた。ビタミン K_4 燐酸エステルを単独に添加した場合 P:O は軽度に増大したが、Sintrom と同時に添加した場合には Sintrom による P:O 比の減少を阻止する効果は、みとめられなかつた。ビタミン K_3 重亜硫酸塩と Indion について同様に検討したが、表4に示すように終末濃度 $10^{-4}M$ の Indion の添加による P:O 比の減少は55%であつたが、Indion と等モル濃度のビタミン K_3 重亜硫酸塩を同時に添加したものでは P:O 比は51~57%の減少がみられ、Indion を単独に添加したものと差がなかつた。

実験 II

実験 I においてビタミンKおよび抗凝血薬の酸化燐酸化反応に対する影響について検討したが、この反応溶液のプロトンピン時間と第VII因子は反応の前で変化がなかつたので、反応溶液の組成、pH を変えてプロトンピン、第VII因子の生成を観察した。

実験材料と実験方法

1) 実験動物：実験 I に同じ。

2) 反応溶液、酵素液：0.154M の KCl 水溶液を 0.1M の NaOH 水溶液で pH 7.9 に調製したものをメジウムとしてあらかじめ氷冷し、実験 I に準じてとつたラットの肝組織1に対して、メジウム2の割合で加え、実験 I に準じて 1000r. p.m. で2分間磨砕し、ただちに 3000r. p.m. で5分間冷却遠心沈澱し、得られた上清 (Liver cell-free液) を酵素液とした。

保存人血清：正常人血清を $37^{\circ}C$ に2時間 incubate した後 $4^{\circ}C$ の氷室に24時間保存したもので Owren の P&P 法で測定して、プロトンピン活性をほとんどみとめないものをプロトンピン基質とした。この血清の第VII因子は正常血清と、ほとんど同程度の活性を示した。

ビタミンK：次の2種を用いた。

ビタミン K_1 (Mephyton Merck Sharp and Dohme)

ビタミン K_4 ジ燐酸エステルテトラナトリウム

抗凝血薬：

Warfarin (3-(α -Acetyl-Denzy)-4-hydroxycoumarin)=ワーファリン (エーザイ)

反応溶液は表5に示すように酵素液 2.0ml, 保存人血清 1.0ml, 0.1M Na Oxalate 0.5ml とし、ビタミンK溶液または Warfarin 溶液 0.5ml を添加して総量 4.0ml とした。対照には 0.154M の KCl 溶液 0.5ml を添加した。

表 5. 反 応 系 組 成

30% Rat Liver Cell-free/0.154M KCl	2.0ml
保 存 人 血 清	1.0ml
0.1M Na Oxalate	0.5ml
*Vitamin K 又は Warfarin 溶液	0.5ml
30°C 恒温槽中で振盪	
* 対照は 0.154M KCl 0.5ml	

3) 反応条件: Warburg 検圧装置を利用して反応を観察した。反応容器に試薬を加えて氷冷し, 新鮮な酵素液を最後に加えて, ただちに 30°C の恒温槽中で空気を気相として40分まで反応を観察した。

4) 血液凝固因子の測定: プロトロンビン, Owren の Prothrombin-Proconvertin 法¹⁶⁾で測定した。たゞしカルシウム溶液は 0.05M の CaCl₂ 水溶液を使用した。反応溶液のプロトロンビンを松岡一段法¹⁶⁾¹⁷⁾で測定した場合には fibrin clot の形成がみられなかつたが, Prothrombin-Proconvertin 法で測定した場合には, 明瞭な fibrin clot の形成をみとめた。第Ⅶ因子: Koller-Duckert 法¹⁸⁾で測定した。

実 験 成 績

反応溶液のプロトロンビン第Ⅶ因子を反応前, 反応後10, 20, 30, 40分に測定した値を秒で表6に示す。

1) プロトロンビン活性の変動

i) ビタミン K₁ の影響

反応溶液に1%のビタミン K₁ 懸濁液 0.5g (ビタミン K₁ 5mg) を添加した。対照のプロトロンビン時間は反応前133.5秒のものが10分後には98.0秒にきらかに短縮し, 40分後には82.5秒でプロトロンビン活性の増加をみとめた。ビタミン K₁ 5mg を添加したものは, 反応前129.5秒のものが, 10分後97.0秒に, 以後30分まで短縮して最短80.5秒に達した。図4に示すようにビタミン K₁ を添加したものは, 対照とほぼ平行にプロトロンビン時間の短縮を示したが, 対照に比してその傾向はより明瞭であつた。

図5の例もビタミン K₁ 5mg を添加した場合であるが, 対照例とともに30分後までほぼ平行にプロトロンビン時間の短縮をみとめ, 40分後には軽度の延長を示した。対照では198秒から最短106.5秒まで短縮したが, ビタミン K₁ 添加例は208秒から最短81.0秒まで対照に比して著明に短縮した。

ii) ビタミン K₄ 磷酸エステルの影響

終末濃度 10⁻⁴M のビタミン K₄ 磷酸エステルを添加した場合のプロトロンビンの変動を図6に示す。対照例は100.5秒から40分後まで短縮して54.2秒になつ

表 6. プロトロンビン, 第Ⅶ因子活性の変動

添 加 剤	第Ⅶ因子(秒)		経 過 時 間 (分)	対 照	
	プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)		プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)
1% VK ₁ 0.5ml	129.5	25.8	0	133.5	25.7
	97.0	24.8	10	98.0	25.6
	85.0	25.7	20	89.2	25.4
	80.5	26.7	30	82.8	25.4
	81.5	26.7	40	82.5	27.4
1% VK ₁ 0.5ml	208.0	28.6	0	198.0	28.6
	105.0	28.2	10	142.0	28.2
	91.0	29.2	20	116.0	29.2
	81.0	29.5	30	106.5	29.2
	93.0	30.8	40	109.0	29.5
VK ₄ 磷酸エステル (8×10 ⁻³ M) 0.5ml	98.6	27.2	0	100.5	27.2
	68.3	26.8	10	75.0	25.6
	57.0	26.5	20	61.5	26.6
	51.5	27.8	30	58.0	27.8
	52.0	26.8	40	54.2	28.0
Warfarin (8×10 ⁻³ M) 0.5ml	50.2	25.0	0	50.0	25.0
	41.0	23.5	10	41.0	23.5
	41.5	23.5	20	37.5	24.8
	43.0	23.8	30	35.5	25.6
	45.0	23.8	40	36.0	25.6

図 4. プロトロンビン, 第Ⅶ因子活性の変動 (I) Vitamin K₁ 添加

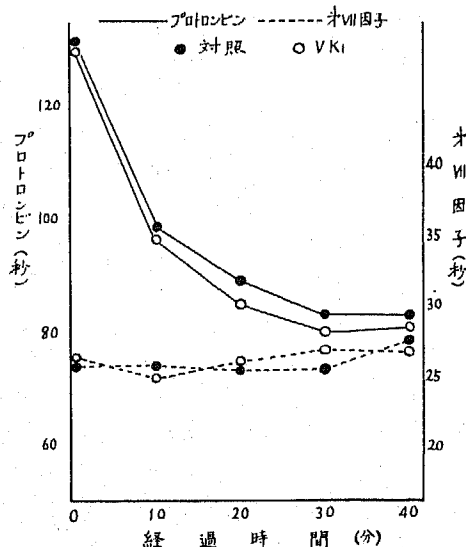


図5. プロトロンビン, 第VII因子活性の変動 (2)
Vitamin K₁ 添加

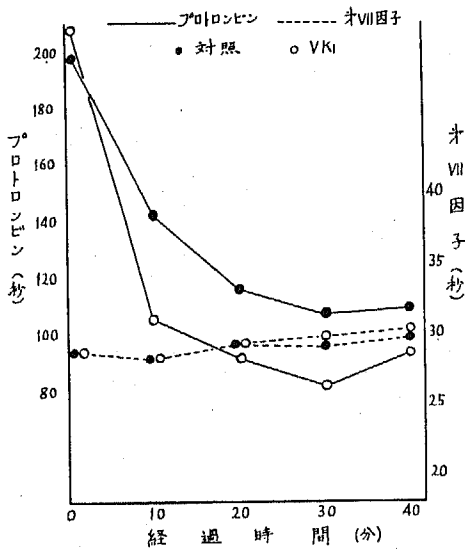
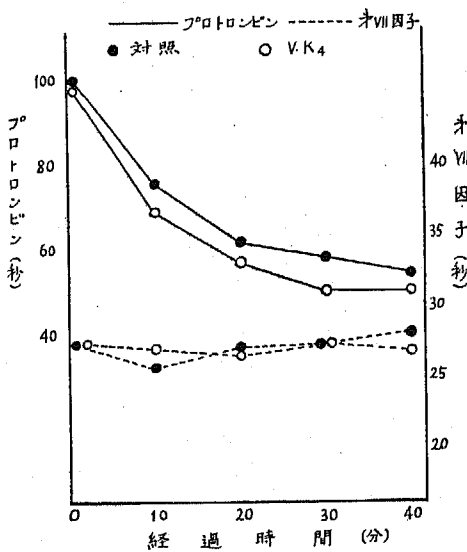


図6. プロトロンビン, 第VII因子活性の変動 (3)
V K₄ 燐酸エステル添加

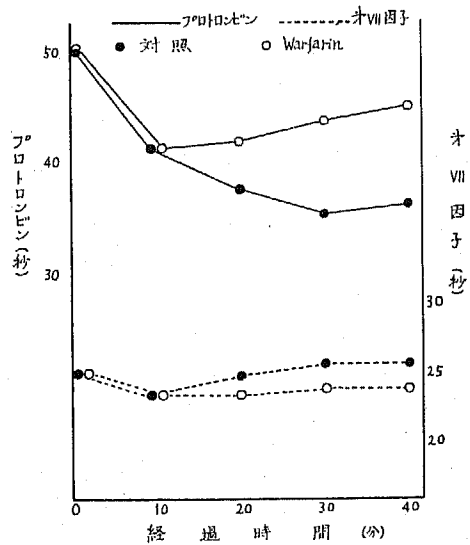


たが, ビタミン K₄ 燐酸エステルを添加したものでは 98.6秒から30分後まで短縮して51.5秒に達し, 対照よりもやゝ短縮の程度は大であつた。

iii) Warfarin の影響

終末濃度 10⁻⁴M の Warfarin を添加した反応溶液のプロトロンビン活性の変動を図7に示す。対照が反応前50.0秒のものが30分後まで短縮して35.5秒に達したが, Warfarin を添加したものでは50.2秒から10分後41.0秒に短縮したが, 以後次第に延長の傾向を示し, 短縮の程度は対照に比して軽度で, かつ短時間で止つた。

図7. プロトロンビン, 第VII因子活性の変動 (4)
Warfarin 添加



反応前のプロトロンビン時間は, 酵素液の異なるものでは, いちじるしい差があり, 短縮の程度も差があるので, 短縮した秒数をそのまま比較することは困難であるので, 表7に示すように反応前のプロトロンビン時間の秒数を, 反応後のプロトロンビン時間の秒数で

表 7. プロトロンビン短縮時間とプロトロンビン指数

	プロトロンビン短縮時間 (秒)	プロトロンビン指数				
		A	B	A-B		
1% VK ₁ 0.5ml	48	41	7	159	151	8
1% VK ₁ 0.5ml	115	89	26	223	181	42
8×10 ⁻³ M VK ₄ 0.5ml	46.6	46.3	0.3	189	183	6
8×10 ⁻³ M Warfarin 0.5ml	5.2	14	-8.8	111	138	-27

A: 被検・B: 対照

$$\text{プロトロンビン指数} = \frac{\text{反応前プロトロンビン時間 (秒)}}{\text{反応後プロトロンビン時間 (秒)}} \times 100$$

除して100倍したものを仮にこの場合の「プロトロンビン指数」とし、この指数の大きいもの程プロトロンビン活性の変動が大きいと考えて比較した。対照の指数よりも大きい指数を示すものは、プロトロンビン活性の増加も対照よりも大きいと考えられる。この指数はビタミン K₁ を添加したものは対照よりも大で、プロトロンビン生成の促進をあらわし、ビタミン K₄ 磷酸エステルを添加したものでは軽度の促進を示し、Warfarin を添加したものでは、プロトロンビン活性の上昇はいちじるしく阻害された。

2) 第Ⅶ因子活性の変動

i) ビタミン K₁ の影響

図4の例では対照の第Ⅶ因子凝固時間は、反応前25.7秒のものが、25.4秒まで一旦軽度に短縮したが、プロトロンビン時間の最も短縮した40分後には27.4秒に延長し、第Ⅶ因子活性は反応前よりも低下した。ビタミン K₁ 添加例でも25.8秒から24.8秒に一旦短縮したのち、プロトロンビン活性が最高を示した30分後には27.6秒に延長し、第Ⅶ因子活性は反応前よりも低下した。

図5の例では対照の凝固時間は、反応前28.6秒のものが一旦軽度に短縮したのち、プロトロンビン活性が最高に達した30分後には29.2秒にやはり延長した。ビタミン K₁ を添加したのも同様で28.6秒から一旦短縮したのち29.5秒に延長した。

ii) ビタミン K₄ 磷酸エステルの影響

図6に示すように、対照もビタミン K₄ 磷酸エステルを添加したのも、凝固時間は一旦軽度に短縮したのちプロトロンビン活性が、最高に達する時には反応前よりも延長した。

iii) Warfarin の影響

図7に示す様に対照の凝固時間は、反応前25.0秒のものが一旦23.5秒に短縮したのち、プロトロンビン活性が最高に達した30分後には25.5秒に延長し、第Ⅶ因子活性の低下を示したが、Warfarin 添加例では25.0秒から10分後23.5秒に短縮した後、ほとんど不変であった。

実験Ⅲ

実験Ⅱでは、保存人血清を基質としてラットの肝の Cell-free 液を使つて、プロトロン

ビンの生成をみとめたが、次に酸化的磷酸化反応とプロトロンビンの生成とを同時に観察した。

実験材料と実験方法

1) 実験動物：実験Ⅰに準ずる。

2) 反応溶液：酵素液はラットの肝の33%ホモジネートで、メジウムは実験Ⅱに準じ、調製法は実験Ⅰに準ずる。基質は0.1MのNa Pyruvateと実験Ⅱに準ずる保存人血清。磷酸受容系は、①0.02MのNa ATP水溶液と、②7g/dlのGlucose水溶液とラットの骨格筋の抽出液。ほかにpH7.9の0.1M磷酸緩衝液、0.1M MgCl₂水溶液、0.1M Na Oxalate水溶液、0.2M KF水溶液、および添加剤で反応溶液の組成は表8に示す。添加剤は以下に示すものを用いた。

ビタミン K₁ (Kaywan, エーザイ)

水溶性ビタミン K₁ (2-Methyl-3-phytyl-1.4-naphthoquinone tetra sodium) = Merck Sharp & Dohme

ビタミン K₄ 磷酸エステル

Warfarin (ワーファリン, エーザイ)

阻害剤：酸化的磷酸化反応を特異的に非共軛化する2.4-Dinitrophenol (DNP と略す) および電子伝達系阻害剤であるKCN。

対照には、等量のメジウムを添加した。以上を加えて総量5.0mlとした。副室には20% KOH 0.2mlを入れた。

3) 反応条件：気相は空気、30°Cで30分反応を観察した。

4) P:O比の計算：extra polation method¹⁰⁾。

5) 血液凝固因子測定：実験Ⅱに準ずる。

表 8. 反 応 系 組 成

添 加 溶 液		終末濃度
0.1 M	Na Pyruvate	0.2ml
0.02M	Na ATP	0.1ml
0.1 M	MgCl ₂	0.1ml
7 g/dl	Glucose	0.1ml
0.2 M	KF	0.2ml
0.1 M	Phosphate Buffer pH7.9	0.5ml
0.1 M	Na Oxalate	0.5ml
	保存人血清	1.0ml
33%	Rat Liverhomogenate/0.154M KCl	2.0ml
	Hexokinase (Muscle Juice)	0.1ml
	促進剤又は阻害剤	0.2ml

(pH 7.9 に調製) (30°C 空気中)

実験成績

(I) ビタミン K, Warfarin, DNP

KCN 試験管内添加

反応溶液を調製して、ただちに 30°C の恒温槽で反応させて、10, 20, 30分後のプロトロンビン, 第Ⅶ因子, P:O 比を測定した。

1) ビタミン K₁ の影響

表9, 図8に示すように, 対照のプロトロンビン時間は反応前 152秒のものが30分後 115秒に短縮し, ビタミン K₁ を添加したものは 153秒から30分後99秒になり, 対照よりも短縮の傾向が明瞭であつた。第Ⅶ因子は対照が反応前38.8秒のものが10分後36.2秒に短縮したのち反応前値よりも延長した。ビタミン K₁ 添加のものはほぼ同様の傾向で, 38.2秒から10分後37.7秒になり以後反応前値よりも延長した。P:O 比は対照で1.88~1.91, ビタミン K₁ 添加のもので2.21~2.51で対照に比して18~31%の酸化的磷酸化反応の促進をみとめた。

表9. プロトロンビン, 第Ⅶ因子, P:Oの変動
Vitamin K 添加

経過時間(分)	対照 プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	Vitamin K ₁ 10 ⁻⁴ M プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	P:O 差(%)
0	152	38.8		153	38.2		
10	140	36.2	1.90	127	37.7	2.38	+25
20	122	38.6	1.91	113	39.0	2.51	+31
30	115	40.2	1.88	99	39.5	2.21	+18
	対照 プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	水溶性 KV ₁ 10 ⁻⁴ M プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	P:O 差(%)
0	162	34.0		161	34.6		
10	127	32.8	1.80	125	33.7	2.12	+17
20	118	35.2	1.84	115	34.9	2.15	+16
30	118	34.8	1.80	111	35.8	2.09	+16
	対照 プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	V K ₁ 磷酸エステル 10 ⁻⁴ M プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	P:O 差(%)
0	112	28.6		112	29.0		
10	82	28.2	1.56	77	27.9	1.75	+10
20	77	28.2	1.62	72	29.3	1.78	+9
30	76	29.4	1.54	69	29.8	1.68	+9

2) 水溶性ビタミン K₁ の影響

表9, 図9に示すように, 対照のプロトロンビン時間は162秒から20分後 118秒まで短縮したが, 終末濃

図8. Vitamin K₁ 添加

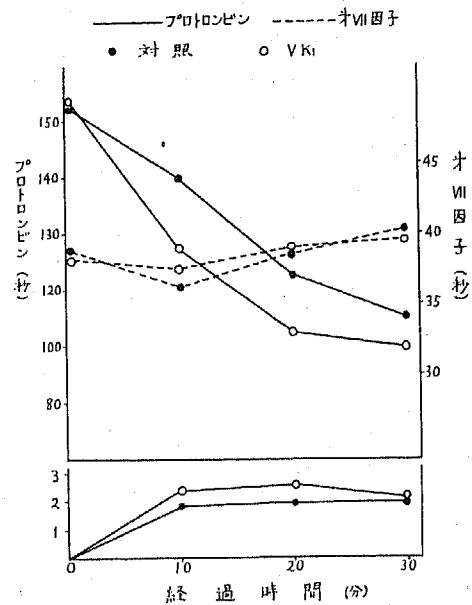
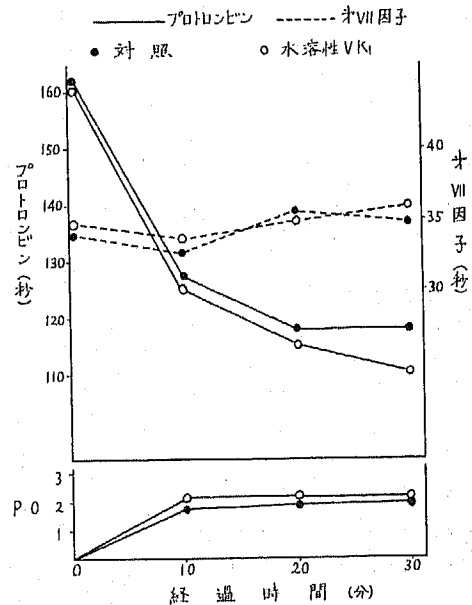


図9. 水溶性 VK₁ 添加



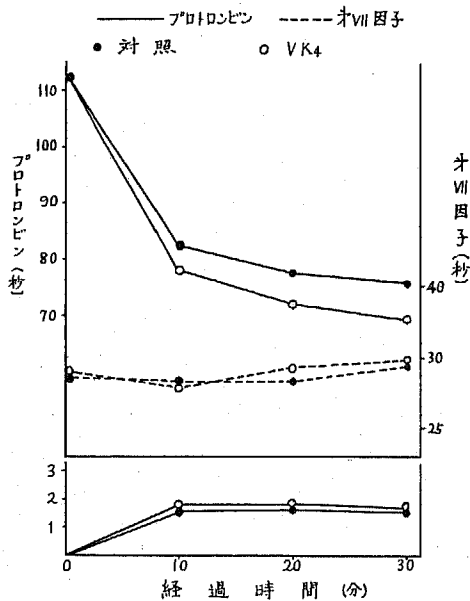
度 10⁻⁴M のビタミン K₁ を添加したものでは 161秒から30分後 111秒まで短縮し, 対照よりも短縮の傾向があきらかであつた。第Ⅶ因子は対照が34.0秒から10分後32.8秒に短縮し, 以後反応前よりも延長の傾向にあつた。水溶性ビタミン K₁ 添加例も同様の傾向で 34.6秒から33.7秒に短縮し, 以後反応前値よりも延長

した。P:O比は対照が1.80~1.84, 水溶性ビタミンK₁添加例は2.09~2.15で対照に比して16~17%の酸化的磷酸化反応促進をみとめた。

3) ビタミンK₄ 磷酸エステルの影響

表9, 図10に示すように, 対照のプロトロンビン時間は112秒から30分後76秒に短縮し, 終末濃度10⁻⁴MのビタミンK₄ 磷酸エステルを添加したものでは112秒から30分後69秒に短縮し, 対照よりも短縮の傾向はやゝ大であった。第VII因子は28.6秒から28.2秒に短縮し, 以後反応前よりも延長した。ビタミンK₄ 磷酸エステルを添加したものでも, 同様の傾向で29.0秒から27.9秒に短縮して後反応前よりも延長した。P:O比は対照が1.54~1.59でビタミンK₄ 磷酸エステル添加例では1.68~1.78で対照に比して9~10%の酸化的磷酸化反応促進をみとめた。

図10. V K₄ 磷酸エステル添加



4) Warfarin の影響

表10, 図11に示すように, 対照のプロトロンビン時間は135秒から30分後に88秒まで短縮したが, 終末濃度10⁻⁴MのWarfarinを添加したものでは, プロトロンビン時間の短縮はまったくみとめず135秒から30分後137秒になった。終末濃度10⁻³MのWarfarinを添加した場合も, プロトロンビン時間の短縮はなく137秒から30分後140秒に延長した。第VII因子については対照が28.9秒から10分後28.2秒になり, 以後延長して30.3秒にいたつた。終末濃度10⁻⁴MのWarfarin添加の場合27.4秒から短縮することなく38.6秒にいた

表10. プロトロンビン, 第VII因子, P:Oの変動
Warfarin, DNP, KCN 添加

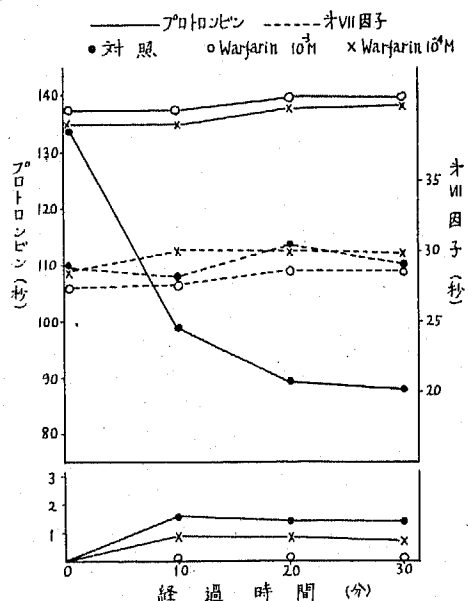
経過時間 (分)	対 照			Warfarin 10 ⁻⁴ M			
	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	P:O差 (%)
0	135	28.9		135	27.4		
10	99	28.2	1.60	135	27.5	0.91	- 43
20	89	30.3	1.45	136	28.6	0.88	- 39
30	87	29.0	1.43	137	28.6	0.75	- 47

経過時間 (分)	対 照			Warfarin 10 ⁻³ M			
	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	P:O差 (%)
0				137	28.8		
10	対照は上と同じ			137	30.3	0	-100
20	対照は上と同じ			140	30.0	0	-100
30	対照は上と同じ			140	29.8	0	-100

経過時間 (分)	対 照			DNP 10 ⁻³			
	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	P:O差 (%)
0	172	44.1		170	43.0		
10	98	42.6	1.93	170	43.1	0	-100
20	81	45.5	2.01	171	43.2	0	-100
30	73	44.8	1.79	176	43.9	0	-100

経過時間 (分)	対 照			KCN 10 ⁻³			
	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	プロトロンビン (秒)	第VII因子 (秒)	P:O	P:O差 (%)
0				174	43.8		
10	対照は上と同じ			166	43.8	0	-100
20	対照は上と同じ			172	44.2	0	-100
30	対照は上と同じ			173	44.5	0	-100

図11. Warfarin 添加



り、終末濃度 $10^{-4}M$ の Warfarin 添加では同様に 28.8秒から短縮することなく 29.8秒に延長した。P:O比は対照が1.43~1.60で、終末濃度 $10^{-4}M$ の Warfarin 添加で0.75~0.91を示し39~47%の酸化的磷酸化反応の阻害をみとめた。終末濃度 $10^{-3}M$ の Warfarin 添加例では P:O 比は0で100%の阻害を示した。

5) DNP, KCNの影響

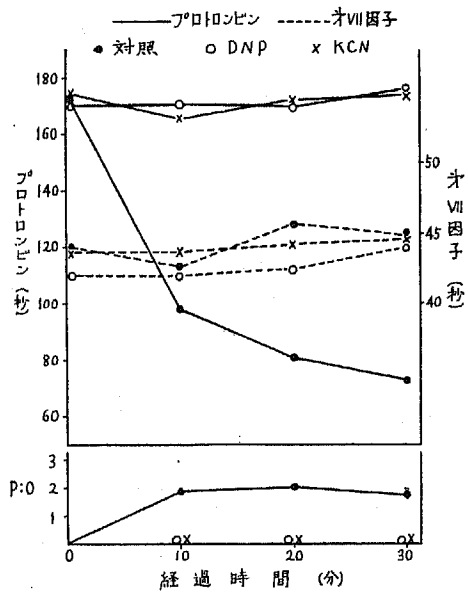
表10, 図12に示すように、プロトロンビン時間は対照で172秒から30分後73秒に短縮を示したが、終末濃度 $10^{-3}M$ の DNPの添加により、プロトロンビン時間の短縮は全くみられなかつた。第VII因子は対照が44.1秒から10分後に42.6秒に一旦短縮したのち44.5秒に延長したが、DNP添加例では43.0秒から短縮することなく30分後には43.9秒であつた。P:O比は対照が1.78~2.01を示したがDNPを添加したものでは0で酸化的磷酸化反応は100%阻害された。

終末濃度 $10^{-3}M$ の KCNを添加したものでは、プロトロンビン時間はほとんど短縮することなく、第VII因子は43.8秒から短縮することなく44.5秒まで延長した。P:O比は0であつた。

6) プロトロンビン時間の短縮と P:O との関係について。

表11は上記の各反応におけるプロトロンビン時間の短縮した値と、実験で仮に定めたプロトロンビン指数と、P:O比とをそれぞれ対照と比較したものであるが、ビタミン K_1 , 水溶性ビタミン K_1 , ビタミン K_4 磷酸エステルを添加したものでは、いずれもプロトロンビン指数も、P:O比も対照よりも大であつた。Warfarin, DNP, KCN を添加したものでは、プロトロンビン指数, P:O比がいずれも対照よりも小

図12. DNP, KCN 添加



であつた。図13に各反応系のプロトロンビン指数と P:O 比の対照との差を示す。図にみられるようにプロトロンビン指数の大なるものは P:O も大で、プロトロンビン指数の小なるものは P:O 比も小であつた。

(II) Warfarin, DNP 腹腔内投与

1) Warfarin, DNP を腹腔内に投与したラットの肝のホモジネートを酵素液として、プロトロンビンの生成と酸化的磷酸化反応を検討した。体重 150g 前後の正常ラットの 9 匹に 1mg/day の Warfarin 水溶液を 3 日間腹腔内注射し、他の 3 匹は 1mg/day の DPN 水溶液を 3 日間腹腔内注射した。投与前の一段

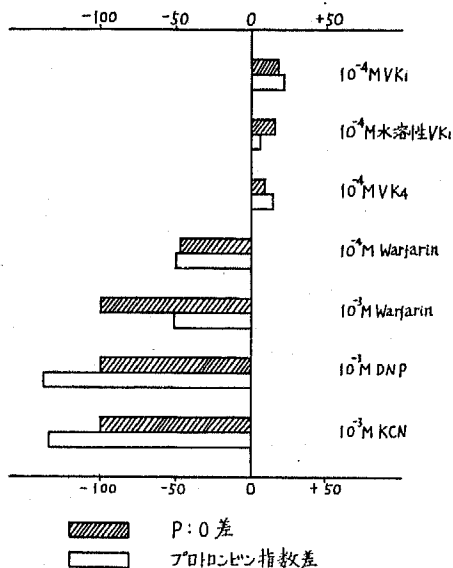
表 11. プロトロンビン短縮時間, プロトロンビン指数, P:O の関係

	プロトロンビン短縮時間 (秒)			プロトロンビン指数			P:O		
	A	B	A-B	A	B	A-B	A	B	$\frac{A-B}{B} \times 100$
$10^{-4}M$ $V K_1$ 添加	54	37	17	154	132	22	2.21	1.88	18
$10^{-4}M$ 水溶性 $V K_1$ 添加	50	44	6	145	137	8	2.09	1.80	16
$10^{-4}M$ $V K_4$ 添加	43	36	7	162	147	15	1.68	1.54	9
$10^{-4}M$ Warfarin 添加	-2	48	-50	98	155	-57	0.75	1.43	-47
$10^{-4}M$ Warfarin 添加	-3	48	-51	97	155	-56	0	1.43	-100
$10^{-3}M$ DPN 添加	-6	99	-105	96	235	-139	0	1.78	-100
$10^{-3}M$ KCN 添加	1	99	-98	100	235	-135	0	1.78	-100

A: 被検
B: 対照

$$\text{プロトロンビン指数} = \frac{\text{反応前プロトロンビン時間 (秒)}}{\text{反応後プロトロンビン時間 (秒)}} \times 100$$

図13. プロトロンビン指数差と P:O 差の関係



法プロトロンビン時間は表12に示すように15.2秒から22.5秒の間にあつた。

Warfarin 投与群のうち1匹は第2回投与の翌日に消化管および腹腔内に出血して死亡したが、他の8匹の一段法プロトロンビン時間は、最も短いもので107秒、長いものでは240秒以上にいずれも延長した。DNP投与群では、一段法プロトロンビン時間の延長

をみとめなかつた。Warfarin 投与群をさらに3群に分けて、3匹にはビタミンK₄磷酸エステルを3mg/day 3日間、2匹にはビタミンK₁を3mg/day 3日間、他の2匹には水溶性ビタミンK₁ 3mg/day 3日間それぞれ連続腹腔内注射した。ビタミンK₄ 磷酸エステル投与群の一段法プロトロンビン時間は、投与前108秒~240秒以上であつたが、全例3日目までに出血死亡した。水溶性ビタミンK₁ 投与群は、いずれも投与前の一段法プロトロンビン時間は240秒以上であつたが、1匹は2日目に出血死亡し、他の1匹は3回投与後一段法プロトロンビン時間は180秒に短縮した。ビタミンK₁ 投与群の一段法プロトロンビン時間は128秒と240秒以上であつたものが、投与3回後62.5, 52.2秒にそれぞれ短縮し、その程度は水溶性ビタミンK₁ 投与群よりもいちじるしかつた。

2) Warfarin 投与ラットの肝の酸化的磷酸化反応とプロトロンビン生成

Warfarin 投与後一段法プロトロンビン時間が107秒であつたラットの肝のホモジエネートを酵素液として、プロトロンビンの生成と酸化的磷酸化反応について検討した。表13、図14に示すように、プロトロンビン時間は短縮することなく220秒から30分後230秒に延長した。第VII因子は85.6秒から86.0秒とわずかに延長した。P:O比は1.75~1.87で酸化的磷酸化反応はみとめられた。

表 12. Warfarin, DNP, Vitamin K 投与後のプロトロンビン時間

No.	プロトロンビン (秒)		プロトロンビン (秒)		プロトロンビン (秒)	
1	21.0	Warfarin 1mg/day 3日間投与	+	VK ₄ 3mg/day 投与		
2	17.4		240<			+
3	22.0		180			+
4	19.6		108	水溶性 VK ₁ 3mg/day 3日間投与	+	
5	19.6		107			
6	17.6		240<		+	
7	20.8		240<		180	
8	17.2		128	VK ₁ 3mg/day 3日間投与	62.5	
9	22.5		240<		55.5	
10	18.0		DNP 1mg/day 3日間投与	17.0		
11	15.2			16.0		
12	17.6			18.9		

表13. プロトロンビン, 第Ⅶ因子, P:Oの変動
Warfarin, DNP, Warfarin+Vita-
min K 投与

経過時間(分)	プロトロンビン(秒)	第Ⅶ因子(秒)	P:O	血プロトロンビン(漿)
Warfarin 1mg/day 3日間投与				
0	220	85.0		107.7
10	228	86.4	1.70	
20	230	86.2	1.75	
30	230	86.0	1.67	
DNP 1mg/day 3日間投与				
0	188	60.5		17.0
10	195	61.5	1.89	
20	194	65.0	1.92	
30	205	66.2	1.78	
Warfarin 投与後 VK ₁ 投与				
0	144	60.0		180
10	145	60.5	1.79	
20	145	60.0	2.34	
30	153	60.5	2.05	
Warfarin 投与後水溶性 VK ₁ 投与				
0	194	85.0		55.0
10	195	85.0	1.69	
20	196	86.5	2.03	
30	196	86.0	2.28	

DNP 投与例について同様に検討した。

表13, 図14に示すようにプロトロンビン時間は短縮せず, 第Ⅶ因子は60.5秒から66.2秒まで延長した。

Warfarin 投与後血漿のプロトロンビン時間の延長したラットにビタミン K₁ を投与して, 血漿プロトロンビン時間が中等度に回復したラットの肝について観察した反応では表13, 図15に示すように, プロトロンビン時間は短縮することなく144秒のものが153秒まで延長した。第Ⅶ因子はほとんど変化しなかつた。P:O 比は1.79~2.34で酸化的磷酸化反応はみとめられた。

Warfarin 投与後水溶性ビタミン K₁ を投与して血漿プロトロンビン時間の軽度に短縮したラットについて, 同様に検討した。

図15に示すように, プロトロンビン時間は, ほとんど変化せず, 第Ⅶ因子は85.0秒から86.0秒までわずかに延長した。P:O は1.69~2.28で酸化的磷酸化反応

図14. プロトロンビン, 第Ⅶ因子, P:Oの変動
Warfarin, DNP 投与

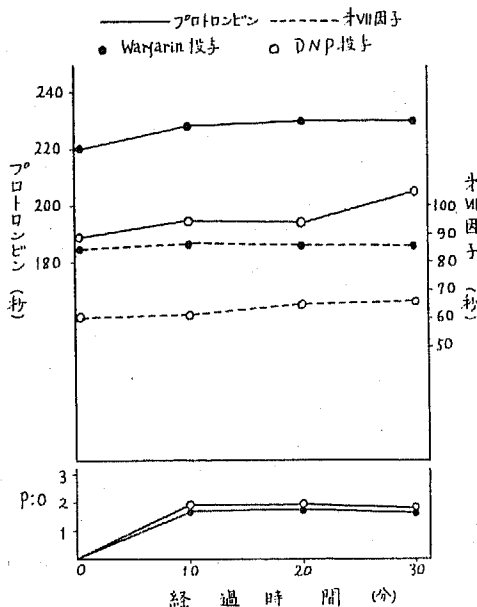
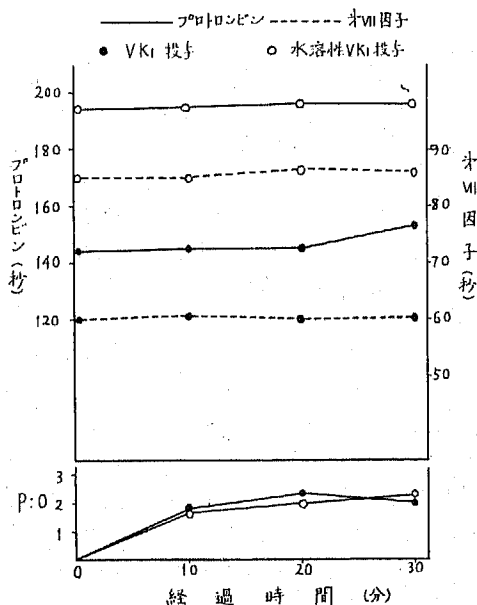


図15. プロトロンビン, 第Ⅶ因子, P:Oの変動
Warfarin 投与後 Vitamin K 投与



はみとめられた。

以上のようにラットの腹腔に Warfarin を注射することによって, 血漿プロトロンビンの低下をきたし, そのラットの肝では試験管内のプロトロンビン生成も阻害されたが, 酸化的磷酸化反応は完全には阻害され

なかつた。

総括ならびに考案

多くの臨床的²⁰⁻²⁴ならびに実験的知見²⁵から、プロトロンビンは肝臓でビタミンKの存在のもとに生成されると考えられている。1934年 Dam¹の発見以来ビタミンK欠乏食によつて、低プロトロンビン血症が起ることが知られている。また黄疸²⁶のある患者に凝血障害がみとめられることがあるのは、肝実質障害のためのプロトロンビン生成障害によるものであると考えられている。Smith²⁷はクロロホルムによる肝障害のさいに、Warner²⁸、Warren²⁹は肝剔除によつて、プロトロンビンの低下が起ることを、それぞれ報告している。最近の蛍光抗体法^{30,31}による実験でもプロトロンビンが肝実質細胞で作られることが確かめられている。プロトロンビンのほか第Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ因子^{32,33}も肝実質細胞で作られると考えられているが、網内系³⁴でも凝固因子が作られるという報告がある。

肝臓におけるこれらの凝固因子の生成のさいに、ビタミンKが、どのような機序で作用するかは、なおその詳細は不明であるが、ビタミンKは生体内で凝固因子の生成反応の触媒として補酵素的⁷に作用することは或程度たしかなこととされている。

ビタミンKのナフトキノ核が酸化還元系に入る¹ことは知られているが、ビタミンK欠乏動物の肝のミトコンドリアの関与する酸化的磷酸化反応は、正常動物のそれに比して低下し³⁵、また *in vitro* に一定量のビタミンKを添加することによつて回復する³⁶という。凝固因子の合成反応はエネルギー消費過程であつて、そのエネルギー源は酸化的磷酸化反応であり、ビタミンKの欠乏は酸化的磷酸化反応を介して¹³プロトロンビンの生成を低下させるという。ビタミンKが酸化的磷酸化反応に関与することは多くの記載³⁷がある。

著者は、ラットの肝のホモジエネートを酵素液とし、Na Pyruvate を基質とした反応系で、酸化的磷酸化反応に対するビタミンKの役割を検討し、ビタミンKが酸化的磷酸化反応を促進するものであることを確かめた。ここに使用した反応系では終末濃度 $10^{-5}M$ のビタミンK₁が最もいちじるしく酸化的磷酸化反応を促進し、ついで $10^{-4}M$ のビタミンK₁の添加のときに促進効果のみとめた。ビタミンK₄ 磷酸エステル、ビタミンK₃、ビタミンK₃ 重亜硫酸塩、ビタミンK-S (II)の促進効果は著明でなかつた。

1941年 Campbell³⁸が Dicoumarol を分りして以来、次々に合成されたクマリン系およびインダンジ

オン系抗凝血薬³⁹はプロトロンビン、第Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ因子を減少せしめることが知られているが、これらの薬剤は肝における、これらの因子の生成反応に補酵素的に働くビタミンKと拮抗して生成を阻害する^{10,11}と考えられている。Martius^{12,13}によれば、これらの因子の合成に必要なエネルギーを産生する酸化的磷酸化反応に作用し、低濃度でも磷酸化反応を非共軛化することによつて、合成を阻害するという。

著者は上記の反応系において Sintrom が酸化的磷酸化反応を終末濃度 $10^{-4}M$ で63~100%阻害し、 $10^{-5}M$ 以下でも阻害効果のあることを確かめた。Indion は $10^{-4}M$ で70%、 $10^{-5}M$ でも50%の、また Warfarin は $10^{-3}M$ で100%、 $10^{-5}M$ でも39~47%のそれぞれ阻害効果のあることをみとめた。

Lasch^{8,9}、Alkjaesig⁴⁰は肝のミトコンドリアによる *in vitro* のプロトロンビン生成を報告した。著者はラットの肝のホモジエネートから分りした Cell-free 液と保存人血清とを $30^{\circ}C$ に incubate して反応溶液のプロトロンビン活性の増加を観察した。プロトロンビン時間は、個々の反応溶液によつて大きな差があり、その短縮時間も差はなはだしかつた。そこで本来の意味のプロトロンビン指数⁴¹とは異なるが反応前のプロトロンビン時間の秒数を、反応後のプロトロンビン時間の秒数で除したものを、プロトロンビン時間の短縮の程度をあらわすために、仮にここでプロトロンビン指数として求めると、指数は138から183の間にあつた。反応溶液にビタミンK₁、ビタミンK₄を添加したものでは、指数は対照よりも6~42大であり、促進効果のみとめたが、ビタミンK₁の促進効果が大きかつた。Warfarin を添加したものでもプロトロンビン時間の短縮のみとめたが、プロトロンビン指数は対照よりも小で阻害効果のみとめた。

Lasch⁸によればプロトロンビンは、ビタミンKの存在のもとに第Ⅶ因子から、ミトコンドリアによつて作られると述べているが、上記の反応系で測定した第Ⅶ因子は対照およびビタミンKを添加したものは、いずれも一旦は活性の上昇のみとめたのち、プロトロンビン時間の短縮につれて、反応前の値よりも活性は低下する傾向にあつた。

以上のことから、ラットの肝のホモジエネートによつてプロトロンビンが生成されることと、この反応がビタミンKによつて促進され、また Warfarin に阻害されることを認めたが、ビタミンKが酸化的磷酸化反応を促進し、Sintrom、Warfarin、Indion がこれを阻害することもみとめられた。生理的な状態では、この二つの反応が同時におこなわれると、考えられている

が、現在までのところ、この両者の関係を直接に検討した報告には接していない。著者は上記の反応系によって両反応を同時に観察した。先きのべた理由から、ここで仮定したプロトロンビン指数とP:O比を各反応について求め、ビタミンK、抗凝血薬、DNP、KCNを添加した場合のプロトロンビン指数とP:O比を、おのおのの対照と比較してみた。ビタミンK₁水溶性ビタミンK₁、ビタミンK₄ 磷酸エステルを添加した場合は、いずれもP:O比は対照よりも大で酸化的磷酸化反応が促進され、この時同時に測定したプロトロンビン指数は、いずれも対照よりも大でプロトロンビンの生成が促進された。また、Warfarin、DNP、KCNを添加した場合P:O比はいずれも対照よりも小となり、同時に測定したプロトロンビン指数も対照より小で、プロトロンビンの生成も、酸化的磷酸化反応もともに阻害された。

DNP、KCNを添加した場合両反応は完全に阻害されたが、Warfarinを添加した場合には、終末濃度 $10^{-4}M$ のときP:O比は0.75~0.91で磷酸化反応は完全には阻害されなかつたが、プロトロンビンの生成は完全に阻害された。

Coumarin系抗凝血薬によるHypoprothrombinemiaを改善する作用は、ビタミンK₁が最もすぐれていることは知られているが^②、Warfarinを投与して、低プロトロンビン血症を来したラットに投与したビタミンK₁の効果は、ビタミンK₁が最も有効で次いで水溶性ビタミンK₁がやゝ有効で、ビタミンK₄ 磷酸エステルはほとんど無効であつた。

Warfarinを投与したラットの肝では、酸化的磷酸化反応が、なおかなりの程度にみとめられたが、著明なプロトロンビンの低下を来し、またin vitroでのプロトロンビンの生成もみられなかつた。Warfarinはin vivoおよびin vitroで酸化的磷酸化反応を部分的に阻止する濃度でも、プロトロンビンの生成を阻害することを認めた。このことは正常ラットの肝について観察したin vitroでの反応でも低濃度のWarfarinがP:O比の軽度の低下をきたす程度でも、プロトロンビンの生成を完全に阻止したことも一致する。

DNPを1mg/day 3日間腹腔内注射したものは、血漿プロトロンビンの低下も、その肝についての酸化的磷酸化反応の阻害もみられず、DNPの試験管内添加の効果とは一致しなかつたが、その原因については不明である。

結 論

プロトロンビンの生成機構に関して、酸化的磷酸化反応との関係を検討し、次の結論を得た。

1) ラットの肝のホモジエネートを酵素液とする反応溶液に添加したビタミンKは、酸化的磷酸化反応を促進し、かつ、その効果はビタミンK₁に最も著明であつた。またWarfarin、Sintrom、Indion、DNP、KCNはいずれも酸化的磷酸化反応を阻害した。

2) ラットの肝のホモジエネートおよびそのCell-free液とProthrombin-freeの人血清をincubateしてプロトロンビンの試験管内生成を認めた。

3) ビタミンKはプロトロンビンの試験管内生成を促進し、Warfarin、DNP、KCNは、これを阻害することを認めた。

4) プロトロンビンの試験管内生成のさいに、第Ⅶ因子は一過性に活性の上昇をみとめたが、プロトロンビン活性の上昇にともなつて第Ⅶ因子活性は低下した。

5) プロトロンビンの試験管内生成と酸化的磷酸化反応を同時に測定した場合、ビタミンKを添加して酸化的磷酸化反応の促進したものは、同時にプロトロンビンの生成も促進された。

6) Warfarin、DNPを添加して酸化的磷酸化反応の阻害されたものは、プロトロンビンの生成も阻害された。

7) Warfarinを添加したものでは、酸化的磷酸化反応を部分的に阻害する濃度のWarfarinでもプロトロンビンの生成は完全に阻害した。

8) Warfarinを注射して、いちじるしい血漿プロトロンビンの低下をみとめたラットの肝には、なお、かなりの酸化的磷酸化反応がみられた。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を頂いた恩師松岡松三教授に深く謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第46回日本消化機病学会総会、第23回および第24回日本血液学会総会において発表した。

文 献

- ①Dam, H.: Nature. 133: 909 (1934) ②Dam, Schönheyder, F.: Biochem. J. 28: 1355 (1934)
 ③Dam, H. Schönheyder, F. Tage Hansen E.: Biochem. J. 30:1075 (1936) ④Dam, H. Schönheyder, F.: Biochem. J. 30: 879 (1936)
 ⑤Quick, A. J.: Am. J. Physiol. 118: 260 (1937)
 ⑥松岡松三: 現代内科学大系、代謝異常Ⅲ. p. 68, 中

- 山書店 (1959) ⑦Quick, A. J. Colletine, G. E.: Am. J. Physiol. 164: 3 (1951) ⑧Lasch, H. G. Roka, L.: Hoppe-Seylers Zschr. Physiol. Chem. 294: 30 (1953) ⑨Lasch, H. G. Roka, L.: Klin. Wschr. 32: 460 (1954) ⑩Winterstein, A.: Thromb. Diath. Haemorrh. 4: 428 (1960) ⑪Martius, C. Nitz-Litzow D.: Biochem. Zschr. 327: 51 (1955) ⑫Martius, C. Nitz-Litzow D.: Biochim. Biophys. Acta. 12: 134 (1953) ⑬Martius, C.: Dtsch. Med. Wschr. 83: 1701 (1958) ⑭Fiske-Subbarow: J. Biol. Chem. 66: 375 (1925) ⑮Owren, P. A. Aas, K.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 3: 201 (1951) ⑯松岡松三: 日本医事新報. 1314: 37 (昭24) ⑰松岡松三: 綜合臨床. 9: 72 (昭35) ⑱Koller, F. Loeliger, A. D. Duckert, F.: Acta. Haemat. 6: 1 (1951) ⑲Cross, R. J. Taggart, J. V. Covo, G. A. Green, D. E.: J. Biol. Chem.: 177: 655 (1949) ⑳松岡松三: 内分泌と代謝. 1: 148 (昭33) ㉑Mammen, Von E. Gross R.: Blut.: 8. 109 (1962) ㉒松岡松三・佐竹清人・中島富彦・小田多井邦子: 日消誌. 55: 587 (昭33) ㉓松岡松三・佐竹清人: 新薬と臨床. 8: 743 (昭34) ㉔Smith, H. P. Warner, E. D. Brinkhous K. M.: J. Exp. Med. 66: 801 (1937) ㉕Bollman, J. L. Butt, H. B. Snell, A. M.: J. Am. M. Ass. 115: 1087 (1940) ㉖Quick, A. J. Stanley-Brown, M. Bancroft, F. W.: Am. J. Med. Sci. 190: 501 (1935) ㉗Warner, E. D. Brinkhous, K. M. Smith, H. P.: Am. J. Physiol. 114: 667 (1936) ㉘Warner, E. D.: J. Exp. Med. 68: 831 (1938) ㉙Warren, R. Rhoads, J.: Am. J. Med. Sci. 198: 193 (1939) ㉚Barnhart, M. I.: Am. J. Physiol. 199: 360 (1960) ㉛Barnhart, M. I. Anderson, G. F.: Fed. Proc. 20: 52 (1961) ㉜松岡松三: 診療. 13: 570 (昭35) ㉝Newcomb, T. Matter, M. Conroy, L. De Marsh, Q. B. Finch, C. A.: Am. J. Med. 20: 798 (1956) ㉞Slätis, P.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10. Suppl 33 (1958) ㉟Martius, C. Nitz-Litzow, D.: Biochim. Biophys. Acta. 13: 152 (1954) ㊱Martius, C. Nitz-Litzow, D.: Biochim. Biophys. Acta. 13: 289 (1954) ㊲Brodie, A. F. Weber, M. M. Gray, C. T.: Biochim. Biophys. Acta. 25: 448 (1957) ㊳Campbell, H. A. Link, K. P.: J. Biol. Chem. 138: 21 (1941) ㊴松岡松三・佐竹清人・栗田広志・荻原洋三・中島富彦・今野修・村山繁光・宮坂博允・深沢英: 内科. 3: 121 (昭34) ㊵Colletine, G. E. Quick, A. J.: Am. J. Med. Sic. 222: 7 (1951) ㊶Alkjaesig, N., Seegers, W. H.: Am. J. Physiol. 176: 111 (1954) ㊷James, D. F., Bennett, I. L., Scheinberg, P., Buttler, J. J.: Arch. Int. Med. 83: 632 (1949)