◆原 著◆

ラットにおけるビタミン K 依存性凝固因子に対する ワーファリンとビタミン K の影響

—PIVKA-II の代謝—

山 中 吉 隆^{*1}, 山 野 雅 弘^{*1}, 浅 田 高 広^{*1}
柳 原 太^{*1}, 山 中 幸 子^{*1}, 間 瀬 勘 史^{*1}
安 永 幸 二 郎^{*1}, 四 家 勉^{*2}, 内 田 清 久^{*2}

Effect of Warfarin and Vitamin K on Vitamin K-dependent Clotting Factors in Rats

—Metabolism of PIVKA-II—

Yoshitaka YAMANAKA^{*1}, Masahiro YAMANO^{*1}, Takahiro ASADA^{*1},
Futoshi YANAGIHARA^{*1}, Sachiko YAMANAKA^{*1}, Kanshi MASE^{*1},
Kojiro YASUNAGA^{*1}, Tsutomu SHIKE^{*2} and Kiyohisa UCHIDA^{*2}

Key words: rat, vitamin K-dependent clotting factor, PIVKA-II, warfarin, vitamin K₁

Changes in plasma and liver descarboxyprothrombin (PIVKA-II), an abnormal prothrombin without biological activity, were examined in rats after a single injection of warfarin (2.5 mg/kg, s.c.) and compared with changes in plasma clotting factor levels. Furthermore, the changes in plasma and liver PIVKA-II levels after a single injection of vitamin K₁ (VK₁) (200 µg/kg, s.c.) were examined in rats kept on a VK-deficient diet for 3 days. The plasma prothrombin and factor VII levels decreased soon after warfarin injection, bottomed out at 24 hrs and then began to increase, returning almost to the initial levels at 72 hrs. The plasma PIVKA-II level began to increase 3 hrs after warfarin injection, peaked at 24 hrs and then declined. The liver PIVKA-II levels, however, began to increase at 1 hr after warfarin injection, continued to increase for a while, and then declined. Warfarin caused an abrupt increase in the liver PIVKA-II levels, but the increase in plasma PIVKA-II level was delayed about 3 hrs. Liver PIVKA-II increased to about 5 fold that of normal rats and began to be excreted into plasma. The liver PIVKA-II levels were normalized within 2 hrs after VK₁ injection, but the recovery of the plasma PIVKA-II levels required 12~24 hrs. The disappearance half-time of liver PIVKA-II was calculated

^{*1} 関西医科大学第一内科〔〒570 大阪府守口市文園町1〕: The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, 570 Japan.

^{*2} 塩野義製薬研究所〔〒553 大阪市福島区鷺洲5-12-4〕: Shionogi Research Laboratories, Fukushima-ku, Osaka, 553 Japan. 受付: 1990.5.30, 受理: 1990.8.17.

to be 0.86 hr while that of plasma PIVKA-II was 11.6 hrs. These results suggest that warfarin increases PIVKA-II levels in plasma and liver, but the rise in plasma level is delayed for about 3 hrs. During the time lag the liver PIVKA-II level increased about 5 fold that of the normal rat liver, indicating that this value corresponds to the maximal capacity of liver microsomes to restore PIVKA-II. The shorter disappearance time of liver PIVKA-II after VK_1 injection than that of plasma suggests that the carboxylation reaction in the liver proceeds quickly.

はじめに

ビタミン K (VK) は血液凝固因子のうち、血液凝固の進展に関与する第 II, 第 VII, 第 IX, 第 X の各因子¹⁾と凝固を制御するプロテイン C²⁾と S³⁾の生合成に必須である。VK はこれらの凝固因子蛋白前駆体の特定の glutamyl 残基 (Glu) が γ -carboxyglutamyl 残基 (Gla) に変換される際のカルボキシル化反応の補酵素として機能する⁴⁾。VK が欠乏した状態あるいはワーファリンなどの VK 拮抗剤を投与した時などは、Gla への変換が不十分であるので生物学的活性のない異常凝固因子 (Protein induced by vitamin K absence or antagonist, PIVKA) が肝および血中に増加すると考えられている^{5,6)}。しかし、実際にはワーファリン投与により PIVKA-II が増加する場合、また低プロトロンビン血症に VK_1 の投与により PIVKA-II が減少する場合、血中および肝 PIVKA-II がどのような量的関係で変動するのかといった PIVKA-II の代謝に関する問題は未だ明らかな解答が得られていない現状である。

そこで、今回は上記問題点を解決すべく、通常飼料飼育正常ラットにワーファリンを投与し、また VK 欠乏飼料飼育ラットに VK_1 を投与して投与後のプロトロンビン時間 (PT), 活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT), 血中フィブリノーゲン (第 I 因子), プロトロンビン (第 II 因子) および第 VII 因子、血中および肝の PIVKA-II 濃度の変動を測定し、VK サイクルに対するワーファリンと VK_1 の影響および PIVKA-II の代謝について検討し

た。

I. 実験材料および方法

1. 動物、飼料および処置

実験には Japan Clea (Tokyo) から購入した JCL-SD 系雄ラット (7~8 週令, 体重 200~300 g) を用いた。飼料と水分が自由に摂取できる状態で、1 日光照射 12 時間 (A.M. 8~P.M. 8) の air conditioned room (25°C, 湿度 50~60%) におき、実験期間中はラットのふん食を防止するために床に金網をもつケージで飼育した。VK 含有飼料としては、 VK_1 を 500~600 ng/g を含む飼料 (JCL-CA-1, Japan Clea, Tokyo) を使用し、VK 欠乏飼料としては、 VK_1 が 5 ng/g 以下の飼料 (TEK-LAD CO., Madison, WI) を使用した。

ワーファリンの投与は、通常飼料飼育ラットにワーファリンを生理食塩水に溶解し、2.5 mg/kg を 1 回皮下注射した。 VK_1 の投与は、VK 欠乏飼料で 3 日間飼育後 VK_1 200 μ g/kg を 1 回皮下注射した。

2. 血液凝固指標の測定

ラットの腹腔内に Somnopentyl 0.5 ml/kg (Pentobarbital sodium として 32.4 mg/kg) を注射して麻酔させたのち、3.8% クエン酸ナトリウム 1 容に対し血液 9 容の割合で腹部大動脈より採血するとともに、すみやかに肝の摘出を行った。血液は 4°C, 3,000 rpm で 15 分間遠心し得られた血漿は -20°C で、肝は -70°C で測定時まで保存した。

a. PT, APTT, フィブリノーゲン, 第 VII 因子の測定法

検体は、4°C, 3,000 rpm で 15 分間遠心分離

Fig. 1 Changes in blood coagulation indexes (PT, APTT, fibrinogen, factor VII) after warfarin injection (2.5 mg/kg, s.c.) in rats fed an ordinary diet. Each point and bar represents the mean $\pm$ S.E. in 4 rats.

後の新鮮血漿を用い、COAG-A-MATE-X 2 (Warner Lambert CO., Morris Plains, N. J.) にて測定した。第 VII 因子活性測定法は、第 VII 因子欠乏血漿 (General Diagnostics) 0.1 ml にイミダゾール緩衝食塩水にて 10% 希釈した血漿 0.1 ml を加え、37°C でプレインキュベートしたシンプラスチンオート (組織トロンボプラスチン+Ca²⁺ 混液, General Diagnostics) 0.2 ml を加え凝固時間を測定し、正常血漿ベリハイノーマル, シトレイト (General Diagnostics) の各希釈列より同様の手順で作成した正常活性検量線より換算して求め

た。

b. プロトロンビン、血中および肝 PIVKA-II の測定法

プロトロンビン、血中および肝 PIVKA-II は Shah ら⁷⁾ の方法を改良した Harauchi ら⁸⁾ の方法により測定した。すなわち、正常プロトロンビンのみならず PIVKA-II も完全にトロンビンへ転換させ得る蛇毒 (Echis Carinatus Venom, Sigma) と合成基質 (S-2238, KabiVitrum, Stockholm, Sweden) を用いる方法で、Ba 塩吸着前後の被検血漿を蛇毒により活性化し、生成させたトロンビンと S-2238 を

Table 1 Changes in plasma prothrombin, plasma and liver PIVKA-II levels after warfarin injection

Hrs. after warfarin injection ^a	Plasma		Liver
	prothrombin (U/ml)	PIVKA-II (U/ml)	PIVKA-II (U/mg Ms protein)
0	186±5.2 ^b	2.0±0.1	0.10±0.01
1	173±5.3	2.1±0.1	0.24±0.01*
2	160±11.8	2.1±0.2	0.41±0.01*
3	139±1.8*	3.4±0.4*	0.51±0.01*
6	103±1.1*	6.2±0.2*	0.54±0.03*
12	58±1.5*	8.1±0.5*	0.63±0.03*
24	31±1.6*	12.1±0.3*	0.66±0.02*
48	36±5.2*	7.4±0.4*	0.39±0.03*
72	146±18.6	4.3±1.2	0.15±0.02

a A single dose of 2.5mg/kg of warfarin was injected subcutaneously.

b Mean±S.E. in 4 rats.

* P<0.05 compared with control (Ohr) group.

Table 2 Changes in plasma prothrombin, plasma and liver PIVKA-II levels after vitamin k₁ injection

Hrs. after vitamin k ₁ injection ^a	Plasma		Liver
	prothrombin (U/ml)	PIVKA-II (U/ml)	PIVKA-II (U/mg Ms protein)
0	57±7.0 ^c	7.5±0.8	0.50±0.02
1	66±11.8	6.8±0.7	0.26±0.02**
2	96±4.5**	8.3±0.4	0.10±0.01**
3	131±6.5**	6.4±0.5	0.09±0.00**
6	137±7.6**	6.7±0.4	0.09±0.00**
12	172±3.3**	3.6±0.2*	0.08±0.00**
24	198±1.7**	2.6±0.2*	0.09±0.01**
48	193±3.5**	1.4±0.1*	0.09±0.01**
Normal rat ^b	190±1.5	2.5±0.0	0.08±0.00

a Rats fed on a vitamin K deficient diet for 3 days were given 200μg/kg of vitamin K₁ subcutaneously.

b Control values for rats kept on an ordinary diet.

c Mean±S.E. in 4 rats.

* P<0.05 compared with 0 hr group.

** P<0.01 compared with 0 hr group.

反応させ生成した P-nitroaniline を 405 nm で比色定量した。Ba 塩吸着前の合成基質分解能 (正常プロトロンビンと PIVKA-II を合わせた活性) と, 吸着遠心後の上清の合成基質分解能 (PIVKA-II の活性) の差異から正常プロトロンビンと PIVKA-II の量を求めた。肝 PIVKA-II の測定は肝ミクロソーム分画の懸濁液に TritonX-100 を添加して可溶化後, 血漿と同様に測定した。

3. Half disappearance time (T_{1/2}) の計算

通常飼料飼育ラットにワーファリンを投与し

その後の血中プロトロンビンおよび第 VII 因子, また VK 欠乏飼料で 3 日間飼育ラットに VK₁ 投与しその後の血中および肝 PIVKA-II の各因子それぞれの経時的变化の測定値を片対数グラフにプロットし最小二乗法により T_{1/2} を求めた。

II. 成績

1. PT, APTT, フィブリノーゲン, 第 VII 因子に対するワーファリンの影響 (図 1)

ワーファリン投与後の PT, APTT, フィブ

Fig. 2 Changes in blood coagulation indexes (PT, APTT, fibrinogen, factor VII) after vitamin K₁ injection (200 µg/kg, s.c.) in rats fed a vitamin K-deficient diet for 3 days. Shaded area represents the normal range. Each point and bar represents the mean ± S.E. in 4 rats.

リノーゲン、第 VII 因子の変動は図 1 に示すごとくである。PT, APTT はワーファリン投与後 24 時間までは徐々に延長して 24 時間後に最高値 (PT 36.3 ± 1.2 秒, APTT 32.8 ± 0.9 秒) に達し、以後減少し 72 時間後には正常値に回復した。第 VII 因子の変化はもっとも速く、ワーファリン投与後急速に減少して 24 時間後に最低値 ($8.0 \pm 0.5\%$) に達し、72 時間後には正常値に回復した。一方、フィブリノーゲンはワーファリン投与後特に変化は認められなかった。

2. ワーファリン投与後の血中プロトロンビ

ン、血中および肝 PIVKA-II の変動 (表 1)

ラットの血中プロトロンビンの正常値は約 180 thrombin unit (U)/ml であるがワーファリン (2.5 mg/kg) 投与後は漸次減少し、24 時間後に最低値 31 U/ml を示した。この低下は 48 時間後まで持続したが、72 時間後にはほぼ正常値まで回復した。血中 PIVKA-II は正常ラットでも 2.0 U/ml 程度認められるが、ワーファリン投与後 2 時間までは増加せず、3 時間以降増加し始め、24 時間後に 12 U/ml まで増加し、その後減少したが 72 時間後においても若干の増加が認められた。一方、肝 PIVKA-

Fig. 3 Half disappearance time of plasma prothrombin, factor VII, plasma and liver PIVKA-II.

$Y = -0.043 X + 2.276$ ($r = 0.999$) for plasma prothrombin

$Y = -0.114 X + 2.445$ ($r = 0.995$) for factor VII

$Y = -0.026 X + 0.908$ ($r = 0.899$) for plasma PIVKA-II

$Y = -0.35 X + 0.280$ ($r = 0.995$) for liver PIVKA-II

II はワーファリン投与前は 0.10 U/mg microsomal protein (Ms) であるが、ワーファリン投与直後より増加した。投与後 3 時間までは急激に増加したが、それ以降は 24 時間まで徐々に増加し、以後減少し 72 時間後には正常値に回復した。

3. PT, APTT, フィブリノーゲン, 第 VII 因子に対する VK_1 の影響 (図 2)

ラットを VK 欠乏飼料で 3 日間飼育し低プロトロンビン血症の状態にし、次いで VK_1 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与後の PT, APTT, フィブリノーゲン, 第 VII 因子の変動は図 2 に示すごとくである。 VK_1 投与後延長していた PT と APTT, 減少していた第 VII 因子はそれぞれ 12~24 時間で正常範囲への回復が認められた。フィブリノーゲンは VK_1 投与後ほぼ一定であった。

4. VK_1 投与後の血中プロトロンビン, 血中および肝 PIVKA-II の変動 (表 2)

ラットを VK 欠乏飼料で 3 日間飼育し、低プロトロンビン血症の状態にし、ついで VK_1 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与後の血中プロトロンビン, 血中および肝 PIVKA-II の変動は表 2 に示すごとくである。血中プロトロンビンは VK_1 投与前低値であったが、 VK_1 投与直後より増加し、2 時間後には有意な増加が認められ、12 時間以後で正常値まで回復した。血中 PIVKA-II は VK_1 投与前高値であったが、 VK_1 投与後 2 時間で一旦増加傾向が認められたが、12 時間以後で有意に減少し 24 時間で正常値まで回復した。一方肝 PIVKA-II は VK_1 投与直後より減少がみられ、2~3 時間で正常値まで回復した。

5. 血中プロトロンビン, 第 VII 因子, 血中および肝 PIVKA-II の half disappearance time ($T_{1/2}$) (図 3)

ワーファリン投与後の血中プロトロンビンおよび第 VII 因子の変動と VK_1 投与後の血中および肝 PIVKA-II の変動を図 3 に示した。すなわち図のグラフで直線的に減少する部分より $T_{1/2}$ を求めると血中プロトロンビン, 第 VII 因子, 血中および肝 PIVKA-II での $T_{1/2}$ の 6.97, 2.64, 11.6, 0.86 hrs であった。

III. 考 察

今回われわれは、血中 PIVKA-II だけでなく肝における PIVKA-II の変動を測定するとともに血液凝固指標も同時に測定することにより、更に詳しく PIVKA-II の代謝と VK 依存性凝固因子に対するワーファリンと VK_1 の影響について検討した。

ワーファリンは VK サイクルの VK epoxide reductase と VK reductase の酵素活性を阻害し⁹⁾¹⁰⁾、特に前者の酵素に対する阻害活性が強いと報告されている¹¹⁾。ワーファリンは VK epoxide reductase 活性を非可逆的に失活させるが、VK を反応系に加えたり臨床的に投与すると VK 依存性カルボキシラーゼ活性が回復することが知られている。また、Kawamoto らは *in vitro* で VK epoxide

reductase は $0.1 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 濃度のワーファリンによって阻害されるが、VK reductase は $10 \sim 500 \mu\text{M}$ 濃度によっても阻害されなかったと報告している¹²⁾¹³⁾。

本研究においてもワーファリン 2.5 mg/kg 一回皮下注射した場合、通常飼料 (VK_1 500 ng/g) を摂取しているにも関わらず、血液凝固因子の生合成が障害され PT, APTT は 24 時間後最大に延長し、第 VII 因子も 24 時間後に最低値を示した。しかし、24 時間以降は回復傾向にあり 72 時間ではほぼ正常値までの回復が認められた。またこの時血中プロトロンビン、血中および肝 PIVKA-II もほぼ同様の変動を示した。これより血液凝固因子および VK サイクルに対するワーファリンと VK の影響について以下の様に考察した。すなわち、ワーファリン投与により VK reductase 活性と VK epoxide reductase 活性が阻害され食事からの VK は hydroquinone に還元されず、カルボキシル化反応の補酵素として機能し得なかったものと考えられる。また、ワーファリン投与 24 時間以降は血液凝固因子の生合成の回復が認められ、これより食事による VK が VK reductase 活性の回復にともないカルボキシル化反応の補酵素として作用し始めたものと考えられた。この時、VK epoxide reductase 活性はワーファリン投与 72 時間後において正常ラットの 30% の活性しか回復していないことをわれわれは確認し報告している¹⁴⁾。正常ラットの 30% の VK epoxide reductase 活性にも関わらず肝細胞内に蓄積していた VK epoxide の減少が認められ、血液凝固因子の生合成も正常化したことから VK epoxide から phylloquinone への還元反応が進行し食事よりの VK が VK サイクルを回転したものと考えられた。

また VK 欠乏飼料で 3 日間飼育ラットに VK_1 $200 \mu\text{g/kg}$ 一回皮下注射した時、PT, APTT および第 VII 因子は VK_1 投与後 12~24 時間で正常範囲への回復が認められた。一方、血中プロトロンビンおよび肝 PIVKA-II の回復は PT, APTT よりも速いものであった。この実験処置においては VK 還元酵素系

は阻害されておらず、単に VK 欠乏によりカルボキシル化反応の補酵素としての hydroquinone の量が不十分の状態であり、血液凝固因子の生合成が低下しているところへ投与された VK_1 は hydroquinone となり補酵素として作用し、肝細胞内で蓄積されていた前駆体蛋白 (PIVKA) がカルボキシル化され凝固活性を持つプロトロンビンとなり血中に流出したものである。これより、PT, APTT の回復は VK 依存性凝固因子がある程度まで増加して初めて正常範囲へ回復することが確認された。

更に本研究において、VK 依存性凝固因子特に血中プロトロンビン、血中および肝 PIVKA-II について、ワーファリンおよび VK_1 投与によりその後の凝固因子量の経時的変動を追跡することにより崩壊と産生つまり体内代謝について検討した。

その結果として、まずワーファリン投与直後より肝 PIVKA-II は増加するが、血中 PIVKA-II は 3 時間後に初めて増加し約 3 時間の lag time が認められた。この 3 時間の lag time について以下の様に考察した。すなわち、ワーファリンの投与により VK サイクルの還元酵素活性が障害されカルボキシル化反応が進行せず前駆体蛋白 (PIVKA) がそのまま肝細胞内で蓄積され、ある濃度以上になると血中へ PIVKA-II を放出する機構の存在を意味するものであった。また PIVKA-II に対する肝細胞内プール存在の可能性については今までに報告されているが⁶⁾、実際にはどれ位の量まで蓄積可能であるのかは報告されていない。そこで今回の実験結果 (表 1) より、肝細胞内で蓄積される PIVKA-II が対象群の約 5 倍になった時血中 PIVKA-II が増加し始め、これより肝における PIVKA-II の蓄積許容量は正常の約 5 倍程度と推論することが可能であると思われる。

次に VK 欠乏飼料で 3 日間飼育ラットに VK_1 を投与することにより肝細胞内で蓄積していた肝 PIVKA-II は VK_1 投与直後より $T_{1/2} = 0.86 \text{ hr}$ の割合で減少するのに対し、血中 PIVKA-II は $T_{1/2} = 11.6 \text{ hrs}$ の割合で減少した。この時の肝 PIVKA-II の減少は VK_1

投与によりカルボキシル化反応が進行し活性を持ったプロトロンビンに変換され血中へ放出したもので, その結果血中プロトロンビンの増加は VK_1 投与直後より認められた. 正常プロトロンビンは, PIVKA-II の場合と違って肝から血中へ移行するとき肝細胞内で蓄積されるようなことはないことが確認された. Shah ら¹⁵⁾ は VK 欠乏ラットに VK_1 を投与した場合, VK_1 投与後 10~15 分で肝プロトロンビン濃度は最高に達し, プロトロンビンが血中に放出されると本研究と同様の結果を報告している. しかし, VK 欠乏状態で VK_1 を投与されると PIVKA-II から正常凝固因子 (プロトロンビン) への変換が増加するのみでなく, 表 2 の血中 PIVKA-II の変動結果より肝で蓄積されていた肝 PIVKA-II の一部がカルボキシル化されないまま血中へ放出されるのではないかと推察されるが未解決である.

さらにまた, ワーファリン 投与後各時点での血中プロトロンビンと血中 PIVKA-II の合計量がワーファリン投与前と異なる結果を得た. この結果より考えられることは, ワーファリン投与により肝における VK サイクルが障害されプロトロンビン生成が低下し, その結果血中プロトロンビンが減少する. しかし一方, この時ワーファリン投与により肝細胞内には増加した PIVKA-II がプールされているが, 異常蛋白である PIVKA-II と正常プロトロンビンの肝細胞膜の透過性や血中への放出機構の相違などを推定すると, 肝から血中への PIVKA-II の増加は血中プロトロンビンの減少した量だけ増加するとは考えられず, その結果として, ワーファリン投与前と投与後の各時点での血中プロトロンビンと血中 PIVKA-II の合計量が一定ではなく異なるものと考えられた.

血中 PIVKA-II の変動と肝 PIVKA-II の変動は, ワーファリン投与の場合相関計数 $r=0.72$ の関係で変動したが, VK 欠乏飼料飼育ラットに VK_1 投与後の血中 PIVKA-II と肝 PIVKA-II の関係は $r=0.43$ であった. これは VK_1 投与により血中 PIVKA-II は $T_{1/2}=11.6$ hrs の割合で減少するのに対し, 肝

PIVKA-II はカルボキシル化後プロトロンビンとなり $T_{1/2}=0.86$ hr の割合で減少し約 2 時間後には正常化したためと考えられた. しかし, この時カルボキシル化され血中に放出されたプロトロンビンと血中 PIVKA-II の関係は $r=0.88$ であった. これらの結果より, 血中プロトロンビン, 血中および肝 PIVKA-II の変動は, 肝における産生と血中あるいは組織での消失といった関係を明らかにするものと考えられた. また, これらの凝固因子の $T_{1/2}$ 測定結果より肝 PIVKA-II がもっとも速く次いで第 VII 因子, 血中プロトロンビン, 血中 PIVKA-II の順であった. このことより肝細胞内で蓄積されていた肝 PIVKA-II は VK_1 投与されることにより直接カルボキシル化反応の作用を受けることから, 肝 PIVKA-II の半減消失時間 ($T_{1/2}=0.86$ hr) はカルボキシル化反応の速度を表現していると考えられた.

結 語

実験に繁用されるラットにワーファリンおよび VK_1 を投与することにより VK 依存性凝固因子特に血中および肝 PIVKA-II の量的関係を検討した. その結果, 肝 PIVKA-II は一旦肝細胞内で対象群の約 5 倍まで蓄積され 3 時間の lag time をもって血中に PIVKA-II が放出された. また, 肝 PIVKA-II の半減消失時間 ($T_{1/2}=0.86$ hr) はカルボキシル化反応の速度を表現していると考えられた.

文 献

- 1) Suttie, J.W.: Synthesis and secretion of vitamin K dependent clotting protein. In: Plasma protein secretion by the liver. eds. H. Glaumann, T. Peters, Jr. and C. Redman, London: Academic Press, 1983, pp. 375~403.
- 2) Stenflo, J.: A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. J. Biol. Chem., **251**: 355~363, 1976.
- 3) Discipio, R.G., Hermodson, M.A., Yates, S.G. and Davie, E.W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X

- (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*, **16**: 698~706, 1977.
- 4) Suttie, J.W.: Vitamin K-dependent carboxylase. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**: 459~477, 1985.
 - 5) Stenflo, J.: Dicumarol-induced prothrombin in bovine plasma. *Acta. Chem. Scand.*, **24**: 3762~3763, 1970.
 - 6) Carlisle, T.L., Shah, D.V., Schlegel, R. and Suttie, J.W.: Plasma abnormal prothrombin and microsomal prothrombin precursor in various species. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **148**: 140~144, 1975.
 - 7) Shah, D.V., Swanson, J.C. and Suttie, J.W.: Abnormal prothrombin in the vitamin K-deficient rat. *Thromb. Res.*, **35**: 451~458, 1984.
 - 8) Harauchi, T., Takano, K., Matsuura, M. and Yoshizaki, T.: Liver and plasma levels of descarboxyprothrombin (PIVKA-II) in vitamin K deficiency in rats. *Jap. J. Pharmacol.*, **40**: 491~499, 1986.
 - 9) Whitlon, D.S., Sadowski, J.A. and Suttie, J.W.: Mechanism of coumarin action: Significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*, **17**: 1371~1377, 1978.
 - 10) Lee, J.J., Priciple, L.M. and Fasco, M.J.: Identification of warfarin sensitive protein component in a 200S rat liver microsomal fraction catalyzing vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reduction. *Biochemistry*, **24**: 7063~7070, 1985.
 - 11) Wallin, R. and Martin, L.F.: Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver. *Biochem. J.*, **241**: 389~396, 1987.
 - 12) Kawamoto, K., Touchi, A., Sugeno, K. and Matsubara, T.: *in vitro* effect of β -Lactam antibiotics and N-Methyltetrahydrothiol on microsomal vitamin K epoxide reductase in rats. *Jap. J. Pharmacol.*, **47**: 169~178, 1988.
 - 13) Kawamoto, K. and Uchida, K.: Effect of N-Methyltetrahydrothiol on liver microsomal vitamin K reductase. *Jap. J. Pharmacol.*, **50**: 159~165, 1989.
 - 14) Yamanaka, Y., Yamano, M., Yasunaga, K., Shike, T. and Uchida, K.: Effect of warfarin on plasma and liver vitamin K levels and vitamin K epoxide reductase activity in relation to plasma clotting factor in rats. *Thromb. Res.*, **57**: 205~214, 1990.
 - 15) Shah, D.V. and Suttie, J.W.: The effect of vitamin K and warfarin on rat liver prothrombin concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**: 91~95, 1972.
-