ラットに対するワルファリン, ビタミン D₃ および それらの混合物の急性経口毒性について

谷 川 力* 草 野 忠 治**

* イカリ消毒 (株) エンジニアリングセンター (〒275 習志野市茜浜 1-12-3)

麻布大学環境生物学教室 (〒229 相模原市淵野辺 1-17-71)

** 筑波大学農林学系 (〒305 つくば市天王台 1-1-1)

(受領: 1992 年 12 月 10 日)

Acute toxicity of a mixture of warfarin and
vitamin D₃ to laboratory rats

Tsutomu TANIKAWA* and Tyuzi KUSANO**

* Engineering Center, Ikari Disinfection Co., Narashino 275, Japan and Department
of Environmental Biology, Azabu University, Sagamihara 229, Japan

** Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan

Key words: warfarin, vitamin D₃, rat, acute oral LD₅₀.

緒 言

クマリン剤抵抗性家畜性ネズミ類がヨーロッパで現れ, クマリン剤によるネズミ類の防除が困難となり, その効力の増進について研究が行われるようになった. Lund (1974), Greaves *et al.* (1974), Bai *et al.* (1978) は実験用ラットおよびハツカネズミ *Mus musculus*, ドブネズミ *Rattus norvegicus*, クマネズミ *Rattus rattus* に対するビタミンD₂ とワルファリンとの混合物の亜急性毒性を調査した. これらのなかで, ビタミンD₂ とワルファリンとの混合比=1:1, 5:1で, この混合物はクマネズミに対して効力増進が認められた (Bai *et al.*, 1978). さらに, 実験用マウス, ラットに対して, 混合比ビタミンD₂: ワルファリン=7:4 (前者), 4:1 (後者) で, 混合物の亜急性毒性に相加効果が認められた (Greaves *et al.*, 1974). さらに, 混合比ビタミンD₂: ワルファリン=1:1, 5:1で混合物はクマネズミに対して効力増進効果が認められた. しかし, クマリン剤抵抗性ドブネズミ (混合比ビタミンD₂: ワルファリン=4:1) (Lund, 1974). ウィスター系ラット (混合比

ビタミン D₂: ワルファリン=40:1, 100:1) (Bai *et al.*, 1978) に対して, この混合物に効力増進効果は認められなかった. しかし, ワルファリンとビタミンD₃ を混合したことによる急性経口毒性値については明らかになっていない. 今回, ラットに対しこれら2種混合薬剤が極めて共力的に, 有毒な作用を示すことが明らかになったので報告する.

材料および方法

供試薬剤は下記のように調合した. すなわち, ビタミンD₃ (100%原体, 和光純薬(株)製) 原体を食用サラダオイル (食用なたね油と食用大豆油の混合オイル) に溶解させた後, ワルファリン (98.0%原体, Aldrich Chemical Company, Inc. 製) 原体を懸濁させた. この投与量がラットの体重 100 g に対し 0.13~1.32 g になるように調製した. 調製は, おおのこの混合重量比でワルファリン: ビタミン D₃=1:4, 1:2および1:1とし, 比較対照としてワルファリンおよびビタミンD₃ それぞれを単独に含ませた食用サラダ油を投与した. 供試動物にはラット (Jcl: SD 系) 4週齢を日本クレア (株) よ

Table 1 Mortality and survival time of the rats by single oral administration of a mixture of warfarin+vitamin D₃ (1:4).

Sex	Dosage (mg/kg)		Days after single administration								Mortality (%)	Survival time (day, mean $\pm$ S.D.)
	Warf.	V. D ₃	1	2	3	4	5	6	7	14		
Male	9.3	37.0	0	4	7	10	—	—	—	—	100	2.9 $\pm$ 0.9
	7.1	28.5	0	1	7	10	—	—	—	—	100	3.2 $\pm$ 0.6
	5.5	22.0	0	3	7	9	9	9	9	9	90	2.9 $\pm$ 0.8
	4.3	17.0	0	3	6	7	7	7	7	7	70	2.7 $\pm$ 0.8
	3.3	13.0	0	1	4	5	5	5	5	5	50	3.0 $\pm$ 0.7
Female	9.3	37.0	0	5	9	9	9	9	9	9	90	2.4 $\pm$ 0.5
	7.1	28.5	0	3	9	9	9	9	9	9	90	2.7 $\pm$ 0.5
	5.5	22.0	0	1	5	8	8	9	9	9	90	3.6 $\pm$ 1.1
	4.3	17.0	0	0	1	3	3	3	3	3	30	3.7 $\pm$ 0.6
	3.3	13.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—

り購入し、1週間の順化の後使用した。試験群は各濃度について雌雄各10頭とし、5段階濃度で比較した。

試験方法は、ラットに対し食用サラダ油と供試薬剤の懸濁液をマグネチックスターラー上で常に攪拌状態にし、上記の供試薬剤を1回のみ金属カテーテルを用いて強制的に経口投与した。

投与後は14日間にわたり、ネズミの生存状況を観察し、24時間ごとの死亡率を求めた。以上の条件下で各濃度の死亡率を求め Litchfield and Wilcoxon 法 (Litchfield and Wilcoxon, 1949) により LD₅₀ 値を算出し比較検討した。

試験条件は、12時間照明、室温 24°C、湿度 55% に設定した。

試験結果

1. ワルファリン：ビタミン D₃=1:4

結果は、Table 1 に示したように死亡が雌雄とも2日目より4日目まで認められ、雄ではワルファリン 7.1 mg/kg+ビタミン D₃ 28.5 mg/kg 投与区で100%の死亡率、ワルファリン 3.3 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg で50%の死亡率であった。雌ではワルファリン 9.3 mg/kg +ビタミン D₃ 37.0 mg/kg で90%の死亡率、ワルファリン 3.3 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg では死亡が認められなかった。また、死亡した個体の平均生存日数は、2.7~3.2日の間であった。

以上の薬量と死亡率から LD₅₀ 値を算出し、雄でワルファリン 3.3 mg/kg +ビタミン D₃ 13.2 mg/kg、雌でワルファリン 5.4 mg/kg +ビタミン D₃ 24.0 mg/kg を得た。これらの LD₅₀ 値の有意差を検定したところ両者間に差は認められなかったことから、雌雄を合わせて

LD₅₀ 値を算出し、ワルファリン 4.3 mg/kg +ビタミン D₃ 17.0 mg/kg を得た。

2. ワルファリン：ビタミン D₃=1:2

結果は、Table 2 に示したように死亡が雌雄で2日目より5日目まで認められ、雄ではワルファリン 14.3 mg/kg +ビタミン D₃ 28.5 mg/kg 投与区で100%の死亡率、ワルファリン 6.5 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg で40%の死亡率を得た。雌ではワルファリン 18.5 mg/kg +ビタミン D₃ 37.0 mg/kg で90%の死亡率、ワルファリン 6.5 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg では死亡が認められなかった。また、死亡した個体の平均生存日数は、2.7~4.0日の間であった。

以上の薬量と死亡率の関係から LD₅₀ 値を算出し、雄でワルファリン 7.7 mg/kg +ビタミン D₃ 15.5 mg/kg、雌でワルファリン 9.5 mg/kg +ビタミン D₃ 19.0 mg/kg を得た。これらの有意差を検定したところ両者間に差は認められなかったことから、雌雄を合わせて LD₅₀ 値を算出し、ワルファリン 9.7 mg/kg +ビタミン D₃ 19.5 mg/kg を得た。

3. ワルファリン：ビタミン D₃=1:1

結果は、Table 3 に示したように死亡が雌雄で2日目より5日目まで認められ、雄ではワルファリン 22.0 mg/kg +ビタミン D₃ 22.0 mg/kg 投与区で100%の死亡率、ワルファリン 13.0 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg で70%の死亡率を得た。雌ではワルファリン 28.5 mg/kg +ビタミン D₃ 28.5 mg/kg で100%の死亡率、ワルファリン 13.0 mg/kg +ビタミン D₃ 13.0 mg/kg では死亡率50%を得た。また、死亡した個体の平均生存日数は、3.1~4.2日の間であった。

以上の薬量と死亡率の関係から LD₅₀ 値を算出し、雄

Table 2 Mortality and survival time of the rats by single oral administration of a mixture of warfarin+vitamin D₃ (1:2).

Sex	Dosage (mg/kg)		Days after single administration								Mortality (%)	Survival time (day, mean $\pm$ S.D.)
	Warf.	V. D ₃	1	2	3	4	5	6	7	14		
Male	18.5	37.0	0	4	6	10	—	—	—	—	100	3.0 $\pm$ 0.9
	14.3	28.5	0	6	6	10	—	—	—	—	100	2.8 $\pm$ 1.0
	11.0	22.0	0	5	7	9	9	9	9	9	90	2.7 $\pm$ 0.9
	8.5	17.0	0	2	4	6	6	6	6	6	60	3.0 $\pm$ 0.9
	6.5	13.0	0	0	1	3	4	4	4	4	40	4.0 $\pm$ 0.8
Female	18.5	37.0	0	5	7	9	9	9	9	9	90	2.7 $\pm$ 0.9
	14.3	28.5	0	1	7	7	8	8	8	8	80	3.1 $\pm$ 0.8
	11.0	22.0	0	2	4	5	5	5	5	5	50	2.8 $\pm$ 0.8
	8.5	17.0	0	3	5	6	6	6	6	6	60	2.7 $\pm$ 0.8
	6.5	13.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—

Table 3 Mortality and survival time of the rats by single oral administration of a mixture of warfarin+vitamin D₃ (1:1).

Sex	Dosage (mg/kg)		Days after single administration								Mortality (%)	Survival time (day, mean $\pm$ S.D.)
	Warf.	V. D ₃	1	2	3	4	5	6	7	14		
Male	37.0	37.0	0	6	7	9	10	—	—	—	100	2.8 $\pm$ 1.1
	28.5	28.5	0	4	9	9	10	—	—	—	100	2.8 $\pm$ 0.9
	22.0	22.0	0	1	4	8	10	—	—	—	100	3.7 $\pm$ 1.0
	17.0	17.0	0	2	3	4	6	7	7	7	70	3.9 $\pm$ 1.6
	13.0	13.0	0	0	2	4	7	7	7	7	70	4.1 $\pm$ 0.9
Female	37.0	37.0	0	1	7	8	10	—	—	—	100	3.4 $\pm$ 1.0
	28.5	28.5	0	2	6	8	10	—	—	—	100	3.4 $\pm$ 1.1
	22.0	22.0	0	1	2	6	6	6	6	6	60	3.5 $\pm$ 0.8
	17.0	17.0	0	0	1	4	6	6	6	6	60	4.2 $\pm$ 0.8
	13.0	13.0	0	0	2	2	5	5	5	5	50	4.2 $\pm$ 1.1

でワルファリン 10.4 mg/kg + ビタミン D₃ 10.4 mg/kg, 雌でワルファリン 12.5 mg/kg + ビタミン D₃ 12.5 mg/kg を得た. この試験についても雌雄の有意差を検定したところ両者間に差は認められなかったことから, 雌雄を合わせて LD₅₀ 値を算出し, ワルファリン 12.0 mg/kg + ビタミン D₃ 12.0 mg/kg を得た.

4. ワルファリン単独

結果は, Table 4 のように死亡が雌雄で3日目より7日目まで認められ, 雄ではワルファリン 44.0 mg/kg 投与区で50%の死亡率, 13.0 mg/kg で10%の死亡率を得た. 雌では66.0 mg/kg で60%の死亡率, 13.0 mg/kg では死亡が認められなかった. また, 死亡した個体の平均生存日数は, 3.9~4.5日の間であった.

以上の薬量と死亡率の関係から LD₅₀ 値を算出したところ, 雄で44.6 mg/kg, 雌で43.6 mg/kg を得た.

これらの有意差を検定したところ両者間に差は認められなかったことから, 雌雄を合わせて LD₅₀ 値を算出し, 61.1 mg/kg を得た.

5. ビタミン D₃ 単独

結果は, Table 5 に示したように死亡が雌雄で2日目より6日目まで認められ, 雄ではビタミン D₃ 74.0 mg/kg 投与区で100%の死亡率, 26.0 mg/kg で10%の死亡率を得た. 雌では57.0 mg/kg で100%の死亡率, 26.0 mg/kg では死亡が認められなかった. また, 死亡した個体の平均生存日数は, 2.7~3.2日の間であった.

以上の薬量と死亡率の関係から LD₅₀ 値を算出し, 雄で55.0 mg/kg, 雌で49.0 mg/kg を得た. これらの有意差を検定したところ両者間に差は認められなかったことから, 雌雄を合わせて LD₅₀ 値を算出し, 44.7 mg/kg を得た.

Table 4 Mortality and survival time of rats by single administration of warfarin only.

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after single administration								Mortality (%)	Survival time (day, mean ±S.D.)
		1	2	3	4	5	6	7	14		
Male	66.0	0	0	1	4	4	4	4	4	40	3.8 ± 0.5
	44.0	0	0	1	4	5	5	5	5	50	4.0 ± 0.7
	29.5	0	0	1	3	4	4	4	4	40	4.0 ± 0.8
	19.5	0	0	2	2	3	3	3	3	30	3.7 ± 1.2
	13.0	0	0	0	1	1	1	1	1	10	4.0
Female	66.0	0	0	1	5	6	6	6	6	60	4.0 ± 0.6
	44.0	0	0	2	2	2	4	4	4	40	4.5 ± 1.7
	29.5	0	0	0	2	3	3	4	4	40	5.0 ± 1.4
	19.5	0	0	1	4	5	5	5	5	50	4.0 ± 0.7
	13.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—

Table 5 Mortality and survival time of rats by single administration of vitamin D₃ only.

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after single administration								Mortality (%)	Survival time (day, mean ±S.D.)
		1	2	3	4	5	6	7	14		
Male	74.0	0	2	9	10	—	—	—	—	100	2.9 ± 0.6
	57.0	0	2	4	4	4	4	4	4	40	2.5 ± 0.6
	44.0	0	1	3	3	3	3	3	3	30	2.7 ± 0.6
	34.0	0	0	4	4	4	4	4	4	40	3.0
	26.0	0	0	1	1	1	1	1	1	10	3.0
Female	74.0	0	3	9	9	9	10	—	—	100	3.0 ± 1.2
	57.0	0	2	10	—	—	—	—	—	100	2.8 ± 0.5
	44.0	0	1	4	4	4	4	4	4	40	2.8 ± 0.5
	34.0	0	0	1	2	2	2	2	2	20	3.5 ± 0.7
	26.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—

以上をまとめて、それぞれの LD₅₀ 値を Table 6 に示した。

考 察

急性経口毒性値については、供試動物種、系統などにより大きく異なるときがあるが、実験用ラットに対してはワルファリン単体による急性経口毒性値は、Hagan and Radomski (1953) によると 186 mg/kg (ワルファリン塩として)、Wilk (1957) によると 14.5~20.0 mg/kg, Geigy (1951, Wilk's report (Wilk, 1957)) によると 60.0 mg/kg, Mayer (1952, Wilk's report (Wilk, 1957)) によると 60.0 mg/kg, などの報告がある。いっぽう、ビタミンD₃単体による急性経口毒性値は、同じく SD 系ラットでは Marshall (1984) によれば 43.6 mg/kg と報告されている。今回のそれぞれの単体投与による急性経口毒性値は、ワルファリンが 61.1 mg/kg, ビタミンD₃が 44.7 mg/kg となり、上記の報告と類似

した結果と考えられた。よって、今回、単体投与による急性経口毒性値とこれらを混合した製剤の急性経口毒性値を比較検討したところ、ワルファリン：ビタミンD₃=1:4ではワルファリンの毒性値が14.2倍、ビタミンD₃の毒性値が2.6倍になった。1:2の混合比ではワルファリンの毒性値が6.3倍、ビタミンD₃の毒性値が2.3倍になった。また1:1の混合比ではワルファリンの毒性値が5.1倍、ビタミンD₃の毒性値が3.7倍になった。Sun and Johnson (1960) による共力係数を算出したところ、共力係数はワルファリン：ビタミンD₃=1:4では267, 1:2では187, 1:1では215といずれの場合も共力作用が認められた。これらのことから、Greaves *et al.* (1974) が報告したワルファリンとビタミンD₂のハツカネズミに対する相加効果と異なり、ワルファリンとビタミンD₃はラットに対して、共力効果があるものと思われた。この差異は実験動物およびビタミンDの種類を反映しているものと思われる。

Table 6 Summarized acute oral LD₅₀ values from Tables 1-5.

Test samples	Acute oral LD ₅₀ (mg/kg)*	
	Warfarin	Vitamin D ₃
Warf. : V. D ₃ =1 : 4 (Table 1)	4.3	17.0
Warf. : V. D ₃ =1 : 2 (Table 2)	9.7	19.5
Warf. : V. D ₃ =1 : 1 (Table 3)	12.0	12.0
Warfarin only (Table 4)	61.1	—
Vitamin D ₃ only (Table 5)	—	44.7

* Summarized acute oral toxicity of vitamin D₃, warfarin and their combinations to albino rats.

死亡した個体の平均生存日数は薬量によって異なるが、ビタミンD₃の混合比が高くなるほど短くなった ($p < 0.001$). これは、ワルファリン単独での平均生存日数よりもビタミンD₃単独でのそれに近い日数であることから、致死までの日数がワルファリンによるよりもビタミンD₃によって大きく影響を受けることを示すものと思われた。

以上のことから、ワルファリンとビタミンD₃の混合物の殺鼠剤としての有用性が示唆された。

要 約

ワルファリンとビタミンD₃の混合物をラットに経口投与し、急性毒性を調べたところ、ワルファリンとビタミンD₃ (混合比 1 : 4) では、LD₅₀ 値がおおの 4.3 mg/kg, 17.0 mg/kg となった。同様に混合比 1 : 2 では、LD₅₀ 値が 9.7 mg/kg, 19.5 mg/kg となった。また、混合比 1 : 1 では、LD₅₀ 値が 12.0 mg/kg, 12.0 mg/kg となった。同時に実施したワルファリン、ビタミンD₃それぞれの単独投与による LD₅₀ 値が 61.1 mg/kg, 44.7 mg/kg であった。これらの結果から、ビタミンD₃にはワルファリンに対する共力効果があるものと考えられた。なお、これらの薬剤の急性毒性に性差は認められなかった。また、ワルファリンとビタミンD₃の混合物を投与したときの平均生存日数は、ワルファリン単独投与の生存日数よりもビタミンD₃単独投与の平均生存日数に近い日数であることから、致死までの日数がワルファリンによる影響よりもビタミンD₃によって強く影響されたためと推定された。

引用文献

- Bai, K. M., M. K. Krishnakumari and S. K. Majumder (1978): Toxicity of calciferol, warfarin and their combinations to *Rattus norvegicus* (albino) and *R. rattus*. *Pestic. Sci.*, **9**: 44-50.

- Greaves, J. H., R. Redfern and R. E. King (1974): Some properties of calciferol as a rodenticide. *J. Hyg., Camb.*, **73**: 341-351.
Hagan, E. C. and J. L. Radomski (1953): The toxicity of 3-(acetonylbenzyl)-4-hydroxycoumarin (warfarin) to laboratory animals. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **52**: 379-382.
Litchfield, J. T., Jr. and F. Wilcoxon (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**: 99-113.
Lund, M. (1974): Calciferol as a rodenticide. *Int. Pest Control*, **11**: 10-11.
Marshall, E. F. (1984): Cholecalciferol: A unique toxicant for rodent control. In: *Proc. 11th Vert. Pest Conf. 1984, Univ. California, Davis, U. S. A.*, pp.95-98.
Sun, Y. P. and E. R. Johnson (1960): Analysis of joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.*, **53**: 887-892.
Wilk, von W. (1957): Vergleichende pharmakologische und toxikologische Prüfung von Scillirosid-, Alpha-Naphthyl-thioharnstoff- und Coumarin-Präparaten. *Z. Angew. Zool.*, **44**, 419-446.

Summary

The toxic response of albino rats (SD strain, *Rattus norvegicus*) to warfarin, vitamin D₃ and mixtures of the two compounds was investigated. Acute oral LD₅₀ values of the test rats determined by single oral administration of some mixtures of warfarin and vitamin D₃ were shown as follows: warfarin+vitamin D₃ (1:4): 4.3, 17.0 mg/kg; warfarin+vitamin D₃ (1:2): 9.7, 19.5 mg/kg; and warfarin+vitamin D₃ (1:1): 12.0, 12.0 mg/kg. On the other hand, acute oral LD₅₀ values of warfarin and vitamin D₃ applied separately, were 61.1 and 44.7 mg/kg, respectively. There was no significant difference between male and female in the acute toxicities of warfarin, vitamin D₃ and mixtures of the two. Synergistic effects between warfarin and vitamin D₃ were apparently observed in oral acute toxicities to rats.