

## 第30回麻布環境科学研究会 一般演題3

# 妊娠及び授乳ラットを用いたフェノバルビタールによる 凝固系への影響

望月 雅裕

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

## 【背景】

Vitamin K (VK) 依存性凝固因子 (第II, VII, IX 及びX因子) はいずれも肝臓で前駆たんぱく質として合成され、活性を示すには前駆たんぱく質中のグルタミン酸 (Glu) 残基を $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基に変換する翻訳後修飾が必要である。この反応は $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼにより触媒される。GluがGlaに変換されると、還元型VKヒドロキノン (KH<sub>2</sub>) は2, 3-エポキシド体 (KO) に変換される。KOは2, 3-エポキシド還元酵素 (KO reductase) により還元されてVKとなり、ついでNADPHによりVKからKH<sub>2</sub>に変換される (VKサイクル)。

VKは食事によって摂取されるほか、腸内細菌によっても合成されるため、乳児はVKを合成する腸内細菌を欠き、出生児の約3%はVK欠乏症で、新生児でまれに出血性疾患が観察され、特に、フェノバルビタール (PB) などの抗癲癇薬の投薬治療を受けている母親の乳児で起こりやすい。

PBは、抗瘰癧薬として広く使用されている。一方で、PBは肝薬物代謝酵素を誘導し、ラットで肝臓発がんを促進させる。また、PBはVKサイクルに作用し、ラットでVKの排泄を促進するとともに、妊娠ラットの肝臓でCYP2B及びVKのグルクロン酸抱合に関係するUDP-glucuronyltransferase 関連遺伝子を誘導する。

これまでに化学物質の血液凝固時間及びVKとの関連は、腸内細菌によるVK合成がみられない germ free ラットにVK欠乏飼料を与える試験系が用いられてきた。しかし、我々は通常飼料を給餌した

specific-pathogen-free (SPF) 動物を試験系として用いる化学物質の毒性試験でも、血液凝固時間の変化をしばしば経験している。

そこで、本研究では、より正常に近い通常飼料で飼育したSPF動物を試験系として用い、血液凝固系に及ぼすPBの影響を妊娠及び授乳期の母ラットにPBを単独もしくはVKと併用投与し、母ラット及びその乳児の血液凝固系への影響を検討した。

## 【実験デザイン】

供試動物：雌雄のCrl:CD (SD) 系SPFラットを当所で交配し、得られた妊娠動物を使用

実験1. PBの投与量を80 mg/kg/dayとし、妊娠13日及び授乳7日のラット並びに13週齢の非妊娠ラットにそれぞれ連続7日間、強制経口投与した。それぞれ最終投与の翌日 (妊娠20日又は授乳14日) に、採血・剖検した。さらに、授乳14日の乳児についても採血を実施した。

実験2. 授乳7日のラットにPB (80 mg/kg/day) とVK<sub>2</sub> (30 mg/kg/day) を7日間連続併用経口投与し、最終投与の翌日 (授乳14日) に、採血・剖検した。乳児についても同様に採血を実施した。

検査項目：

母動物：PT, APTT, FIB, TBT, ATIII, 凝固第VII, IX及びX因子活性, 肝臓重量, 肝臓の総CYP含量

乳児：PT, APTT, FIB, 凝固第VII, IX及びX因子活性

## 〔結果・考察〕

実験 1 (母動物の PB の投与量 : 80 mg/kg/day、投与期間 : 7 日間)			
検査項目	妊娠ラット	授乳ラット	非妊娠ラット
肝臓重量	—	↑	↑
総 CYP 含量	↑	↑	↑
APTT	—	↑	—
ATIII	—	↑	↑
Factor VII	—	—	↑
Factor IX	—	—	↙
Factor X	—	—	↑
乳児	F1 雄		F1 雌
PT	↑		↑
APTT	↑		↑
Factor VII	↓		—
Factor IX	↙		↓
実験 2 (授乳母動物の投与量 : PB-80 mg/kg/day、VK <sub>2</sub> -30 mg/kg/day、投与期間 : 7 日間)			
検査項目	母動物	F1 雄 <sup>a)</sup>	F1 雌 <sup>a)</sup>
PT	—	—	—
APTT	↑	—	—
Factor VII	↑	—	—
Factor IX	↙	—	—
Factor X	↑	—	—

—: 変化なし ↑: 有意な増加、 ↓: 有意な減少、 ↙: 減少傾向 a): PB および VK を併用投与した授乳ラットの F1

対照群に用いた正常な妊娠ラット（妊娠 20 日）では、出産に伴う母体からの出血に備えた防御反応としての体深部での血液凝固促進によると考えられる FIB の増加、TBT の短縮及び凝固第 X 因子活性の増加がみられた。さらに、APTT の延長もみられたが、凝固促進作用に対するカウンターバランスと考えられた。正常な授乳ラット（授乳 14 日）では、乳児へ母乳供給のために、肝臓ではエネルギー生産が優先され、肝臓で合成される ATIII および凝固第 IX 因子活性の減少が認められた。

妊娠、授乳及び非妊娠の PB を投与したラットで肝臓重量及び総 CYP 含量が増加し、薬物代謝酵素の誘導が確認された。血液凝固系では、妊娠及び非妊娠ラットには血液凝固時間の延長は認められなかったものの、授乳ラットで APTT の延長及び ATIII の増加が観察され、内因性経路への影響が示唆された。VK は母乳を介して乳児に供給されるため、授乳中の母親はより多くの VK を必要とし、非授乳期には通常起こりえない VK の不足が生じているものと推察された。さらに、凝固第 IX 因子活性が減少する授乳ラットの状態も影響しているものと考えられた。PB を投与した授乳ラットの乳児では、APTT 及び PT

の延長並びに凝固第 VII 及び IX 因子活性の減少を示し、外因性経路への影響も認められ、母ラットより重篤な影響がみられた。出生後の乳児への VK の供給は、ほぼ全面的に母乳に頼っており、PB に暴露された母ラットで VK の排泄が亢進した結果、その乳児への VK 供給が減少したため、母ラットよりも高度の VK 欠乏状態が惹起されたものと考えられる。また、授乳ラットへの VK<sub>2</sub> の併用投与によりその乳児では、血液凝固時間の延長が改善されたことも VK との関連を強く示唆している。さらに、PB を投与した非妊娠及び VK 併用授乳ラットでは、凝固第 VII 及び X 因子の増加がみられた。これは、PB により凝固第 VII 及び X 因子が活性化されている可能性を示し、PB は VK 排泄促進以外にも凝固因子への直接的な作用があることが示唆された。

以上、授乳ラットへ PB を連続投与することで、その乳児にヒトの新生児出血性疾患と同様な VK 欠乏によると考えられる血液凝固時間の延長を惹起することが明らかとなり、本実験系がヒトの新生児出血性疾患のモデルとして有用であることが示唆された。