

## ヒト血清アルブミンおよび $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質の薬物結合サイトに結合するワルファリンとジアゼパムに対する長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の影響

高村徳人、緒方賢次、石井紗綾\*、尾崎峯生\*、興梠靖幸、徳永仁、山口裕次、園田純一郎、大崎卓\*\*

Effects of long- and medium-chain fatty acids on warfarin and diazepam that bind to drug site of human serum albumin and human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein

Norito Takamura, Kenji Ogata, Saya Ishii\*, Mineo Ozaki\*, Yasuyuki Kourogi, Jin Tokunaga, Yuji Yamaguchi, Junichiro Sonoda, Takashi Osaki\*\*

### Abstract

This study systematically evaluated the effects of long- and medium-chain fatty acids (LFAs and MFAs, respectively) on human serum albumin (HSA) sites I and II and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP) drug binding sites using warfarin (site I) and diazepam (site II) as probes.

Free concentrations of warfarin and diazepam were quantified by UHPLC using ultrafiltration.

The results showed that the free fraction of warfarin was lower than that of the control, with increasing [LFAs]/[HSA] (the free fraction of diazepam was markedly higher), whereas the free fraction of warfarin was higher than that of the control, with increasing [LFAs]/[AGP] (the free fraction of diazepam was also similar). In addition, the free fraction of warfarin was slightly higher than that of the control, with increasing [MFAs]/[HSA] (the free fraction of diazepam was markedly higher), and the free fraction of warfarin was slightly higher than that of the control, with increasing [MFAs]/[AGP] (the free fraction of diazepam was also similar).

These data suggest that LFAs and MFAs either exert competitive or allosteric inhibition on the binding of warfarin and diazepam to HSA and AGP. However, only LFAs may have a cooperative effect on warfarin binding to HSA.

**Key words** : human serum albumin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, long-chain fatty acids, medium-chain fatty acids, drug binding site

**キーワード** : ヒト血清アルブミン、 $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質、長鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸、薬物結合サイト

---

九州保健福祉大学薬学部 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町1714-1

School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino, Nobeoka City, Miyazaki 882-8508, Japan

\*尾崎眼科 〒883-0066 宮崎県日向市亀崎1-15

\*Ozaki Eye Hospital, 1-15 kamezaki, Hyuga City, Miyazaki 883-0066, Japan

\*\*津田沼眼科 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼1-23-1

\*\*Tsudanuma Eye Clinic, 1-23-1 Tsudanuma Narashino City, Chiba 275-0016, Japan

## 緒言

薬物と結合する血清蛋白質にはアルブミン (HSA) と  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質 (AGP) がある。酸性薬物は主に HSA に結合し塩基性薬物は主に AGP に結合し効率よく全身に広がっていく。いわば、HSA と AGP は血中において薬物のフェリーボートのような働きをしている。そして、薬物の HSA のサイト I<sup>1)</sup> と II および AGP のサイトへの薬物の結合は生体内成分である脂肪酸により大きな影響を受ける。生体内の脂肪酸には大きく分けて長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸が存在するため、これまでに我々は HSA の薬物結合サイトであるサイト I<sup>1)</sup> と II に対する長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の影響をサイト I プローブであるフェニルブタゾンとサイト II プローブであるジアゼパムを用い系統的に調べたところ様々な影響をサイト I および II において観察できた<sup>2)</sup>。さらに、我々は AGP の薬物結合サイトに対する長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の影響を塩基性薬物結合サイトの代表薬物であるジソピラミドとリドカインを用い系統的に調べたところ様々な影響を AGP の薬物結合サイト<sup>3)</sup> において観察できた<sup>4)</sup>。しかしながら、HSA と AGP の両方に結合できるサイトプローブを用いて HSA と AGP の結合サイトに及ぼす脂肪酸の影響を横断的に調べた研究は存在しない。

そこで、我々は生体内に存在する長鎖脂肪酸であるリノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、および、中鎖脂肪酸であるカプリン酸、ペラルゴン酸、カプリル酸の影響を HSA サイト I と AGP 薬物結合サイトのサイトプローブでもあるワルファリンと HSA サイト II と AGP 薬物結合サイトプローブでもあるジアゼパムを用い HSA から AGP までを同一のサイトプローブで横断的に調べることにした。

## 材料と方法

### 1.材料

ヒト血清アルブミン (essentially fatty acid free)、 $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質およびステアリン酸は Sigma-Aldrich 社より、リノール酸およびオレイン酸ナトリウムはナカライテスク (株) より、パルミチン酸、カプリン酸ナトリウムおよびペラルゴン酸ナトリウムは東京化成工業 (株) より、ワルファリンカリウムはエーザイ (株) より、ジアゼパムは和光純薬工業 (株) より、カプリル酸ナトリウムは片山化学工業 (株) より購入した。その他の試薬および溶媒類は全て市販特級品を使用し、水は蒸留水を使用した。緩衝液は 0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を

使用した。

HSA に対するワルファリンおよびジアゼパムの結合定数はそれぞれ  $2.3 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ <sup>5)</sup> および  $4.9 \times 10^5 \text{M}^{-1}$  であり<sup>6)</sup>、AGP に対するワルファリンおよびジアゼパムの結合定数はそれぞれ  $2.12 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ <sup>7)</sup> および  $6.3 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ <sup>8)</sup> である。

### 2.方法

#### 限外濾過法

0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で HSA および AGP が 30  $\mu\text{M}$  になるよう調製した溶液 330  $\mu\text{L}$  にワルファリンとジアゼパムの最終濃度が 1.5  $\mu\text{M}$  になるよう添加した。それらの試料に種々の長鎖脂肪酸および種々の中鎖脂肪酸が 0  $\mu\text{M}$  (コントロール)、30  $\mu\text{M}$ 、60  $\mu\text{M}$  および 90  $\mu\text{M}$  になるよう調製した試料を限外濾過器 (Vivacon<sup>®</sup> 500 10,000 MWCO HY; sartorius, Goettingen, Germany) に入れ、遠心分離 (2250 g 10 分間) 後、得られた濾液を UHPLC 用の試料とした。

#### UHPLC の薬物測定条件と遊離濃度の算出

ワルファリンとジアゼパムの遊離濃度は ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) で行った。その装置の構成は SPD-20A UV/VIS detector、LC-30AD pump、SIL-30AC auto injector、CBM-20A system controller および CTO-10ACvp column oven, に Inert Sustain<sup>®</sup> C18 column (2  $\mu\text{m}$ ) (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を取り付けたものである。UHPLC の流速は 1.0 mL/min で 40 °C で測定を行った。ワルファリンとジアゼパムを含む濾液の波長は 270 nm で測定し、移動相は acetonitrile : distilled water : methanol : acetic acid の比が 108: 91: 20: 1 (v/v) になるよう調製した。

ワルファリンとジアゼパムの遊離率は以下の式 (1) で計算された。

$$\text{free fraction} = \frac{[D_f]}{[D_f] + [D_b]} \quad (1)$$

$[D_f]$  と  $[D_b]$  は薬物の遊離形濃度と結合形濃度を示す。

本測定法は再現性が高く、ワルファリンとジアゼパムの 1.5  $\mu\text{M}$  に対する長鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸の濃度依存プロファイルとして傾向を調べる研究であるためコントロールのみ 2 回 (2 サンプル調製) 測定し、その他の測定回数は 1 回 (1 サンプル調製) とした。

結果

種々の長鎖および中鎖脂肪酸のHSAのサイトIとIIおよびAGP結合サイトへの影響を同一のサイトプローブで横断的に検討するために、我々はHSAのサイトIおよびAGPに結合するワルファリン、一方、HSAのサイトIIおよびAGPに結合するジアゼパムの遊離率を調べた。

1. 長鎖脂肪酸のHSAのサイトIおよびAGP薬物結合サイトへの影響

サイトIプローブであるワルファリンの遊離率はリノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸ともにコントロール ([LFAs]/[HSA]=0) に対し [LFAs]/[HSA]= 1、2、3 と徐々に減少した。長鎖脂肪酸の種類に関係なくほぼ同様の結果であった (Figure 1(A))。一方、AGPにおけるワルファリンの遊離率はリノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸の増加とともにコントロール ([LFAs]/[AGP]=0) に対し [LFAs]/[AGP]= 1、2 および 3 で上昇した。しかしながら、長鎖脂肪酸によるワルファリン結合への阻害の程度はすべて同じではなく、特にリノール酸およびオレイン酸で著

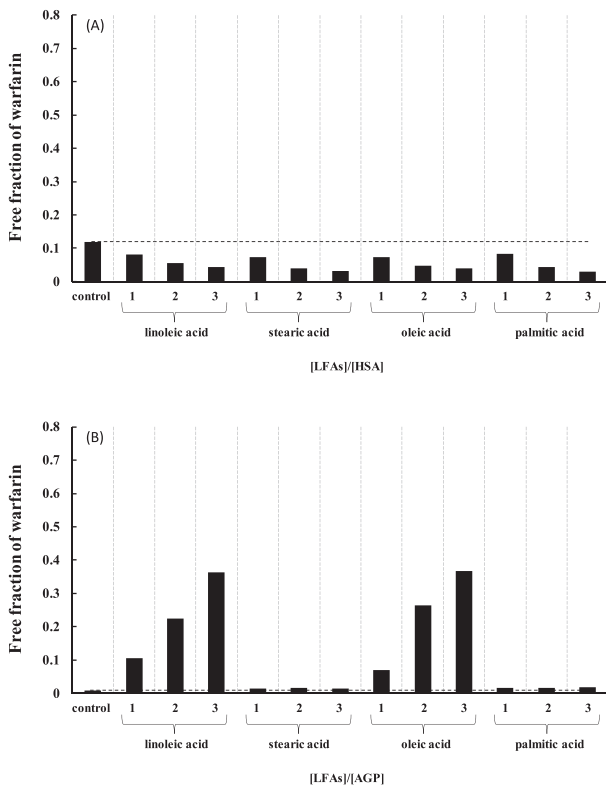


Figure 1. Effect of long-chain fatty acids on the binding of warfarin to HSA (A) and to AGP (B). [warfarin] = 1.5  $\mu$ M, [HSA] and [AGP] = 30  $\mu$ M

しかった (Figure 1(B))。

コントロール ([LFAs]/ [HSA] or [AGP]=0) において、ワルファリンの遊離率はHSAの方がAGPより著しく高かった (Figure 1(A), Figure 1(B))。

2. 長鎖脂肪酸のHSAのサイトIIおよびAGP薬物結合サイトへの影響

サイトIIプローブであるジアゼパムの遊離率はリノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸ともにコントロール ([LFAs]/[HSA]=0) に対し [LFAs]/[HSA]= 1より上昇し、[LFAs]/[HSA]=2および3で急激に上昇した長鎖脂肪酸の種類に関係なくほぼ同様の結果であった (Figure 2(A))。一方、AGPにおけるジアゼパムの遊離率はリノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸の増加とともにコントロール ([LFAs]/[AGP]=0) に対し [LFAs]/[AGP]= 1、2 および 3 で上昇した。しかしながら、長鎖脂肪酸によるジアゼパム結合への阻害の程度はすべて同じではなく、特にリノール酸およびオレイン酸で著しかった (Figure 2(B))。

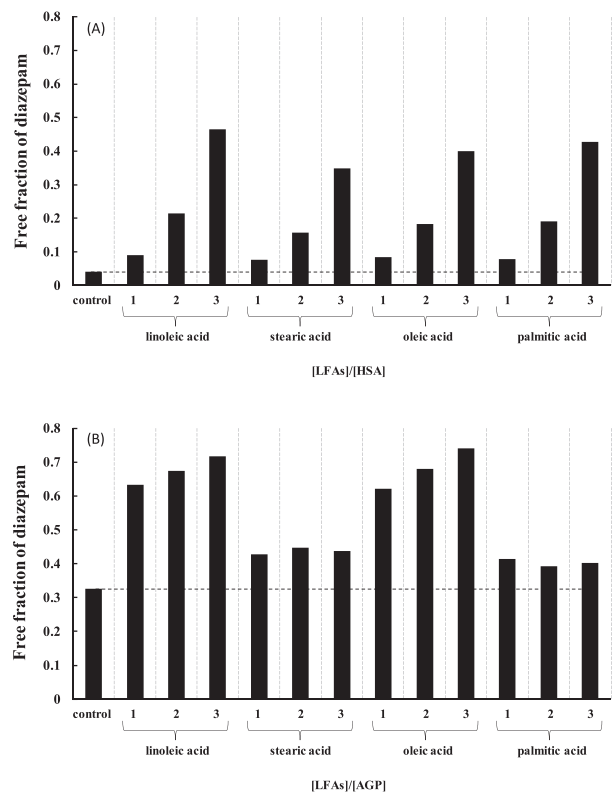


Figure 2. Effect of long-chain fatty acids on the binding of diazepam to HSA (A) and to AGP (B). [diazepam] = 1.5  $\mu$ M, [HSA] and [AGP] = 30  $\mu$ M

コントロール ([LFAs]/ [HSA] or [AGP]=0) において、ジアゼパムの遊離率はHSAの方がAGPより著しく低かった (Figure 2(A), Figure 2(B))。

### 3. 中鎖脂肪酸のHSAのサイト I およびAGP薬物結合サイトへの影響

サイト I のサイトプローブであるワルファリンの遊離率はカプリン酸、ペラルゴン酸、カプリル酸ともにコントロール ([MFAs]/[HSA]=0) に対し [MFAs]/[HSA]= 1、2、3 と増加するにつれ、多くはわずかな増加傾向を示した (ただし、カプリン酸は [MFAs]/[HSA]= 1、2 でわずかに減少し、ペラルゴン酸は [MFAs]/[HSA]= 1 では変化はなかった)。中鎖脂肪酸の種類に関係なくほぼ同様の結果であった。しかしながらカプリン酸のみコントロール ([MFAs]/[HSA]=0) に対し [MFAs]/[HSA]= 1、2 で低下傾向を示し [MFAs]/[HSA]=3 と増加するにつれ僅かな増加傾向を示した。(Figure 3(A))。一方、AGP におけるワルファリンの遊離率はカプリン酸、ペラルゴン酸、カプリル酸ともにコントロール ([MFAs]/[AGP]=0) に対し [MFAs]/[AGP]= 1、2 および 3 で僅かに上昇した (Figure 3(B))。

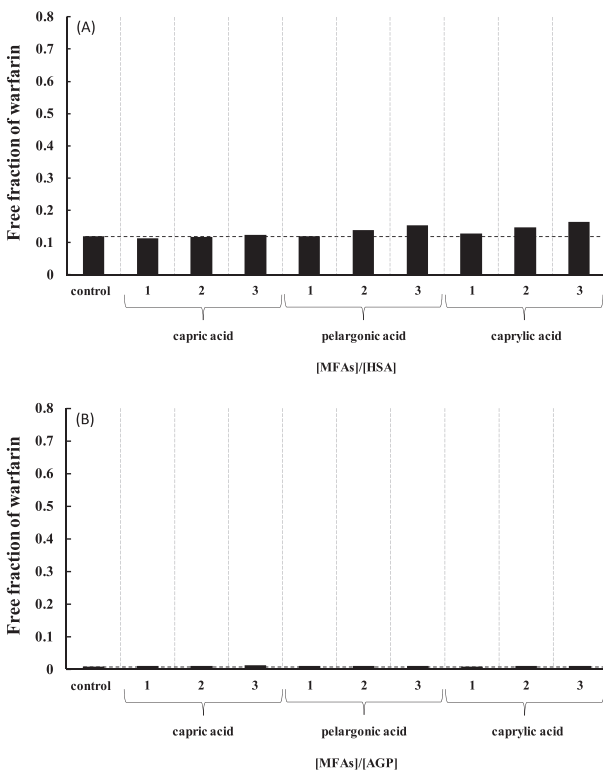


Figure 3. Effect of medium-chain fatty acids on the binding of warfarin to HSA (A) and to AGP (B). [warfarin] = 1.5  $\mu$ M, [HSA] and [AGP] = 30  $\mu$ M

### 4. 中鎖脂肪酸のHSAのサイト II およびAGP塩基性薬物結合サイトへの影響

サイト II のサイトプローブであるジアゼパムの遊離率はカプリン酸、ペラルゴン酸、カプリル酸ともにコントロール ([MFAs]/[HSA]=0) に対し [MFAs]/[HSA]= 1 で既に著しく上昇し、[MFAs]/[HSA]=2 および 3 でさらに上昇したがその差は小さかった。中鎖脂肪酸の種類に関係なくほぼ同様の結果であった (Figure 4(A))。一方、AGP におけるジアゼパムの遊離率もカプリン酸、ペラルゴン酸、カプリル酸ともにコントロール ([MFAs]/[AGP]=0) に対し [MFAs]/[AGP]= 1、2 および 3 で僅かに上昇した (Figure 4(B))。

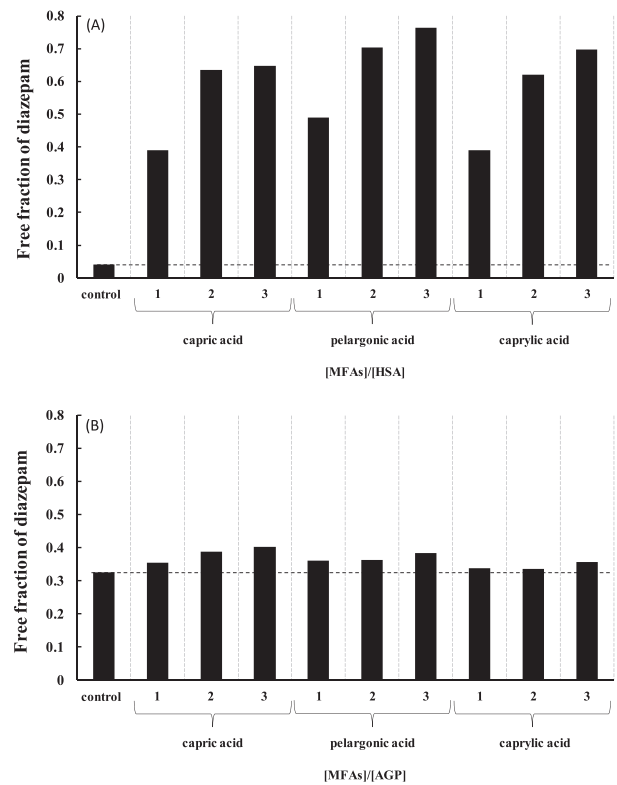


Figure 4. Effect of medium-chain fatty acids on the binding of diazepam to HSA (A) and to AGP (B). [diazepam] = 1.5  $\mu$ M, [HSA] and [AGP] = 30  $\mu$ M

## 考察

本研究により、ワルファリンのHSA結合性はAGP結合性より著しく低く、一方、ジアゼパムのHSA結合性はAGP結合性より著しく高いことが分かった。コントロール ([LFAs]/[HSA or AGP]=0) に対し [LFAs]/[HSA or AGP]=1、2、3 と種々の長鎖脂肪酸を増加させた場合のワルファリン遊離率の変動パターンはHSA (サ

イト I)と AGP で大きく異なることが明らかとなった。特に、AGP 結合サイトにおいて長鎖脂肪酸の中でもリノール酸およびオレイン酸によるワルファリン遊離率の変動パターンはステアリン酸やパルミチン酸と大きく異なることが判明した。また、コントロール ([LFAs]/[HSA or AGP]=0) に対し [LFAs]/[HSA or AGP]=1、2、3 と種々の長鎖脂肪酸を増加させた場合のジアゼパム遊離率の変動パターンは HSA (サイト II) と AGP で大きく異なることが明らかとなった。特に、AGP 結合サイトにおいて長鎖脂肪酸の中でもリノール酸およびオレイン酸によるジアゼパム遊離率の変動パターンはステアリン酸やパルミチン酸と大きく異なることが判明した。一方、コントロール ([MFAs]/[HSA or AGP]=0) に対し [MFAs]/[HSA or AGP]=1、2、3 と種々の中鎖脂肪酸を増加させた場合のワルファリン遊離率の変動パターンは HSA (サイト I) と AGP で類似していることが明らかとなった。また、コントロール ([LFAs]/[HSA or AGP]=0) に対し [MFAs]/[HSA or AGP]=1、2、3 と種々の中鎖脂肪酸を増加させた場合のジアゼパム遊離率の変動パターンは HSA (サイト II) と AGP で大きく異なることが明らかとなった。

ここで、長鎖脂肪酸によるワルファリンおよびジアゼパムの HSA 結合への阻害の程度やパターンの差異より種々の長鎖脂肪酸の結合阻害および結合増強メカニズムを考えてみよう。長鎖脂肪酸は HSA のサイト II 近傍に第一結合サイトが存在し増加するとサイト II に結合することが報告されている<sup>9)</sup>。長鎖脂肪酸はワルファリンのサイト I 結合に対し、[LFAs]/[HSA]=1、2 および 3 では協同的な結合増強効果を引き起こし、[LFAs]/[HSA]=3 では協同的な結合増強効果と競合的な阻害効果を生じさせていると考えられた (Figure 1(A)) (長鎖脂肪酸によるサイト I への協同的な結合増強効果は報告されているが<sup>9)</sup>、アロステリック阻害は報告されていない)。一方、長鎖脂肪酸はジアゼパムのサイト II 結合に対し、[LFAs]/[HSA]=1 ではアロステリック阻害を主に引き起こし、[LFAs]/[HSA]=2 そして 3 と増加するにつれ競合的な阻害効果を強く生じさせていると考えられた (Figure 2(A))。

次に、長鎖脂肪酸によるワルファリンおよびジアゼパムの AGP 結合への阻害の程度やパターンの差異より種々の脂肪酸の結合阻害メカニズムを考えてみよう。長鎖脂肪酸であるリノール酸およびオレイン酸はワルファリンおよびジアゼパムが結合する AGP の結合サイトに対し、競合的な阻害効果を引き起こしていると考えられた (Figure 1(B))。一方、長鎖脂肪酸であるステアリン酸お

よびパルミチン酸の結合サイトはワルファリンおよびジアゼパムが結合する AGP の結合サイトとは異なるサイトに結合しアロステリック阻害を引き起こしていると考えられた (Figure 2(B))。ここで 4 つの長鎖脂肪酸の構造上の差異からワルファリンおよびジアゼパムの AGP 結合に対する阻害の違いを考えてみると、リノール酸およびオレイン酸はステアリン酸やパルミチン酸とは異なり分子内に二重結合を有するため立体構造も直線ではなく曲がっている。よって、結合サイトに対する立体効果も異なることよりリノール酸およびオレイン酸の結合サイトはステアリン酸およびパルミチン酸の結合サイトと同一ではない可能性が高いと考えられる。

中鎖脂肪酸は HSA のサイト II に結合することが報告されている<sup>10)</sup>。中鎖脂肪酸がサイト II に結合することでワルファリンのサイト I 結合に対し、[MFAs]/[HSA]=2 および 3 ではアロステリック阻害が生じていると考えられた (Figure 3(A))。一方、中鎖脂肪酸がサイト II に結合することで、ジアゼパムが結合しているサイト II に対し、[MFAs]/[HSA]=1 より競合的な阻害が強く生じていると考えられた (Figure 4 (A))。中鎖脂肪酸の結合定数は長鎖脂肪酸の結合定数に比べ著しく小さいが<sup>11)</sup>、[MFAs]/[HSA]=1 と [LFAs]/[HSA]=1 のジアゼパムの遊離率を比較すると中鎖脂肪酸による阻害が著しく大きいことから [MFAs]/[HSA]=1 より競合的な阻害が生じていることは明らかである。

一方、中鎖脂肪酸はワルファリンおよびジアゼパムの AGP 薬物結合サイトとは異なるサイトに結合することでワルファリンおよびジアゼパムの AGP 結合に弱いアロステリック阻害を生じているものと考えられた (Figure 3 (B), Figure 4 (B))。その理由として、もしこの阻害がアロステリックではなく競合であれば、中鎖脂肪酸の結合定数は  $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$  オーダーでワルファリンおよびジアゼパムの結合定数と同程度 ( $2.12 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  および  $6.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) であることより、中鎖脂肪酸によるワルファリンおよびジアゼパムの遊離率の増加は理論上かなり大きくなければならないが、実際にその増加は僅かであったからである。さらに、本研究で使用した 3 種の中鎖脂肪酸には二重結合が存在しないため立体構造は直線的であり中鎖脂肪酸の結合サイトとステアリン酸およびパルミチン酸の結合サイトは同じである可能性が高い。

AGP 分子上には塩基性薬物、酸性薬物および中性薬物の 3 つの結合サイトがあると提唱されており、その 3 つの結合サイトにはオーバーラップする領域が存在している<sup>12,14)</sup>。したがって、本研究で使用した脂肪酸の中で

リノール酸およびオレイン酸のみがワルファリンおよびジアゼパムの結合する領域に結合して、リノール酸およびオレイン酸以外の脂肪酸はすべてワルファリンおよびジアゼパムの結合する領域以外に結合しているものと推察された。

臨床において健常人のHSA濃度は4~5 g/dL (600~750  $\mu$ M)でAGP濃度は約75 mg/dL (17  $\mu$ M)であることより、ワルファリンおよびジアゼパムはHSAのサイトIおよびサイトIIにそれぞれ結合し、同サイトに結合する薬物および内因性物質(FFAおよびビリルビン)により競合阻害を受ける。しかしながら、重症の感染症においてHSA濃度が1 g/dL (150  $\mu$ M)以下でAGP濃度は400 mg/dL (90  $\mu$ M)以上になる場合があり、HSAとAGP濃度は接近することになる。その条件においてワルファリンは結合の主体がHSA結合からAGP結合へと変化すると考えられワルファリンの結合阻害はAGP上で生じることになるが、ジアゼパムはHSA結合主体であるためジアゼパムの結合阻害はHSA上で生じるため変わらないと推測される。

## まとめ

ワルファリンのHSA結合性はAGP結合性よりも著しく低く、ジアゼパムのHSA結合性はAGP結合性よりも著しく高いことが判明した。ワルファリンあるいはジアゼパムのHSAおよびAGPへの結合に対する長鎖および中鎖脂肪酸の結合阻害あるいは結合増強パターンの差異の原因は、ワルファリンのHSA結合は長鎖脂肪酸により協同作用および中鎖脂肪酸によりアロステリック阻害をそれぞれ受け、ジアゼパムのHSA結合は長鎖脂肪酸によりアロステリック阻害と競合阻害および中鎖脂肪酸により競合阻害を受けたからであろう。そして、ワルファリンとジアゼパムのAGP結合はAGPの3つの薬物結合サイトのオーバーラップ領域に結合し競合阻害を受けた可能性が高い。

## 引用文献

1. Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N.: The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 11(6):824-832, 1975.
2. 高村徳人, 緒方賢次, 尾崎峯生, 他: ヒト血清アルブミンのサイトIおよびIIに結合する薬物に対する長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の影響. *九州保健福祉大学紀要*. 23:51-56, 2021.
3. Maruyama, T., Otagiri, M., Takadate, A.: Characterization of drug binding sites on alpha 1-acid glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.* 38(6):1688-1691, 1990.
4. 高村徳人, 緒方賢次, 石井紗綾, 他:  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白の薬物結合サイトに結合するジソピラミドとトリドカインに対する長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の影響. *九州保健福祉大学紀要*. 24:31-35, 2023.
5. Tillement, J.P., Zini, R., d' Athis, P.: Binding of certain acidic drugs to human albumin: theoretical and practical estimation of fundamental parameters. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7(4):307-313, 1974.
6. Müller, W., Wollert, U.: Characterization of the binding of benzodiazepines to human serum albumin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 280(3):229-237. 1973.
7. Urien, S., Albengres, E., Zini, R., et al.: Evidence for binding of certain acidic drugs to alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 31(22):3687-3689,

- 1982.
8. Schley, J., Müller-Oerlinghausen, B.: The binding of chemically different psychotropic drugs to alpha 1-acid glycoprotein. *Pharmacopsychiatria*.16(3):82-85, 1983.
  9. Yamasaki, K., Hyodo, S., Taguchi, K., et al.: Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. *PLoS One*. 12(6):e0180404, 2017.
  10. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., Curry, S.: Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 303(5):721-732, 2000.
  11. Spector, A. A.: Fatty acid binding to plasma albumin. *J. Lipid Res.* 16(3):165-179, 1975.
  12. Otagiri, M., Miyoshi, T., Yamamichi, R., et al.: Effects of tricyclic drug on induced circular dichroism spectra of dicumarol bound to alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 42(4):729-733,1991.
  13. Miyoshi, T., Yamamichi, R., Maruyama, T., et al.: Further characterization of reversal of signs of induced cotton effects of dicumarol derivatives-alpha 1-acid glycoprotein systems by protriptyline. *Biochem. Pharmacol.* 43(10):2161-2167,1992.
  14. Miyoshi, T., Yamamichi, R., Maruyama, T., et al.: Reversal of signs of induced cotton effects of dicumarol-alpha 1-acid glycoprotein systems by phenothiazine neuroleptics through ternary complexation. *Pharm. Res.* 9(7):845-849,1992.