

## 抗生物質の止血機構に及ぼす影響

## I. 基礎的検討

飯 田 夕

関西医科大学内科学第一講座(指導:安永幸二郎教授)

(昭和62年4月7日受付)

抗生物質の血小板凝集能の抑制は古くから報告されており、血小板の膜への影響が推定されていた。抗生物質の血小板凝集能、血小板表面陰性荷電、血小板粘着能に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* において検討した。

*in vitro* ではヒト血小板における Latamoxef (LMOX) (終濃度 200~1,000  $\mu\text{g/ml}$ ), Tobramycin (TOB) (終濃度 5~50  $\mu\text{g/ml}$ ) およびこれらの併用の血小板凝集能、血小板表面陰性荷電に及ぼす影響を測定した。LMOX は 1,000  $\mu\text{g/ml}$  ではじめて adenosine-diphosphate (ADP) 凝集を抑制し、特に一次凝集の抑制が強く認められた。collagen 凝集にはすべての濃度において影響を認めなかった。LMOX (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) は血小板表面陰性荷電を増大させ ADP 凝集の抑制と相関した。BAUMGARTNER 法による血小板粘着能の測定では、LMOX (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) + TOB (50  $\mu\text{g/ml}$ ) でわずかに "Thrombus" (血栓形成) の抑制を認めた。*in vivo* においては雄の家兎に LMOX あるいは Ticarcillin (TIPC) 400 mg/kg/day を 1日1回7日間連続投与した。いずれも ADP 凝集の有意な抑制と collagen 凝集にわずかな抑制を認め、血小板表面陰性荷電は有意に増大した。 $\beta$ -ラクタム剤は血小板の膜表面に非特異的に結合して、特に ADP 凝集を抑制すると考えられた。

抗生物質の出血傾向に関する研究は古くから報告されており、1947年すでに FLEMING<sup>1)</sup> はペニシリンの血液凝固能への影響を報告している。血小板については1970年 McCLURE<sup>2)</sup> が Carbenicillin (CBPC) による出血傾向の症例を報告し、ADP 凝集の低下を初めて指摘した。その後、ペニシリン製剤による血小板凝集能に関する研究があいついで報告されたが<sup>3-7)</sup>、その作用機序は明確ではなかった。1983年 NEU<sup>8)</sup> は LMOX, CBPC, TIPC など構造式中にカルボキシル基をもつ抗生物質 (Fig.1) は、血小板の膜に結合して凝集能を抑制するのではないかと述べた。著者は今回、抗生物質の血小板凝集能、血小板表面陰性荷電、血小板粘着能に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* で検討したのでその成績の概要を報告する。

## I. 材料および方法

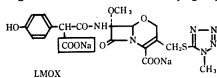
A. *in vitro* の実験

## 1) 血小板凝集能

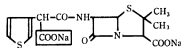
正常人男子 10 名から 21G 針を用いプラスチック注射器にて採血した。3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容量加血液を 700 g にて 8 分遠沈し、多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を作製した。さらにその沈渣を 2,000 g にて 10 分間遠沈して乏血小板血漿

(platelet poor plasma: PPP) を作製した。PRP 180  $\mu\text{l}$  に生理食塩水で溶解した抗生物質 20  $\mu\text{l}$ , あるいは対照の

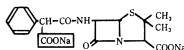
Fig.1 Antibiotics with a carboxyl group



LMOX



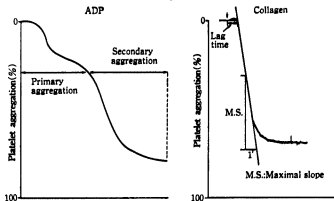
TIPC



CBPC

carboxyl

Fig. 2 Analysis of platelet aggregation

Table 1 Effects of antibiotics on human-platelet aggregation (*in vitro*) (%)

	ADP (15 min.)		ADP (60 min.)		Collagen (15 min.)		Collagen (60 min.)	
	8 $\mu$ M	2 $\mu$ M	8 $\mu$ M	4 $\mu$ M	4 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	4 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
Control	66.7 $\pm$ 13.3	34.8 $\pm$ 7.9	34.2 $\pm$ 4.9	30.0 $\pm$ 12.3	81.6 $\pm$ 4.9	75.6 $\pm$ 11.5	75.5 $\pm$ 7.3	71.3 $\pm$ 11.8
LMOX 200	64.4 $\pm$ 17.6	31.8 $\pm$ 10.6	37.6 $\pm$ 6.0	25.0 $\pm$ 12.8	80.4 $\pm$ 6.4	73.0 $\pm$ 14.1	73.6 $\pm$ 13.7	71.7 $\pm$ 8.6
Control	80.7 $\pm$ 16.8	16.5 $\pm$ 9.6	44.4 $\pm$ 6.0	33.0 $\pm$ 6.7				
LMOX 400	74.3 $\pm$ 10.9	14.5 $\pm$ 9.2	44.7 $\pm$ 7.2	28.3 $\pm$ 3.8				
Control	83.7 $\pm$ 14.7	17.3 $\pm$ 10.1	43.3 $\pm$ 6.1	34.3 $\pm$ 6.0				
LMOX 800	67.7 $\pm$ 5.7	14.7 $\pm$ 11.0	39.9 $\pm$ 6.0	30.7 $\pm$ 8.1				
Control	73.3 $\pm$ 9.3	24.9 $\pm$ 6.9	36.6 $\pm$ 8.3	25.4 $\pm$ 5.9	75.3 $\pm$ 11.9	76.0 $\pm$ 5.5	81.3 $\pm$ 9.0	53.8 $\pm$ 23.6
LMOX 1,000	59.0 $\pm$ 14.9	20.1 $\pm$ 4.6	29.0 $\pm$ 7.6	22.1 $\pm$ 9.1	77.0 $\pm$ 10.8	75.6 $\pm$ 9.6	76.8 $\pm$ 17.3	32.3 $\pm$ 29.4
Control	67.6 $\pm$ 10.2	28.0 $\pm$ 10.8	30.0 $\pm$ 7.6	25.6 $\pm$ 8.9	81.3 $\pm$ 6.3	77.7 $\pm$ 8.7	79.3 $\pm$ 3.2	76.3 $\pm$ 9.0
TOB 50	72.8 $\pm$ 13.4	29.0 $\pm$ 11.8	30.3 $\pm$ 8.5	29.0 $\pm$ 10.8	84.7 $\pm$ 5.7	77.3 $\pm$ 10.0	82.0 $\pm$ 3.2	77.3 $\pm$ 7.5
Control	57.3 $\pm$ 11.9	31.7 $\pm$ 6.7	34.8 $\pm$ 4.7	19.8 $\pm$ 6.4	72.7 $\pm$ 13.8	67.3 $\pm$ 12.7	70.3 $\pm$ 13.4	
LMOX 200 TOB 50	57.3 $\pm$ 8.7	29.7 $\pm$ 8.5	31.5 $\pm$ 6.2	20.0 $\pm$ 6.6	73.7 $\pm$ 14.0	65.3 $\pm$ 13.6	70.3 $\pm$ 12.9	
Control	80.0 $\pm$ 8.2	33.8 $\pm$ 13.8	35.8 $\pm$ 7.6	23.0 $\pm$ 5.4	82.0 $\pm$ 4.5	85.0 $\pm$ 8.8	83.5 $\pm$ 11.1	76.7 $\pm$ 4.7
LMOX 1,000 TOB 50	70.7 $\pm$ 20.0	24.8 $\pm$ 12.5	26.0 $\pm$ 5.9	14.8 $\pm$ 2.9	80.0 $\pm$ 3.6	82.8 $\pm$ 10.5	81.5 $\pm$ 5.9	64.7 $\pm$ 7.5

Data represent mean $\pm$ SD, n=10

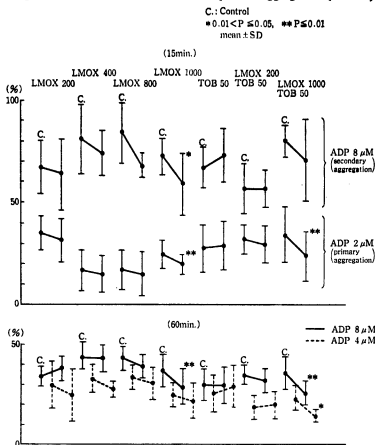
\* 0.01<P $\leq$ 0.05, \*\* P $\leq$ 0.01

場合には生理食塩水 20  $\mu$ l を添加し終濃度が, LMOX は 50~1,000  $\mu$ g/ml, TOB は 5~50  $\mu$ g/ml になるように調整した。そして 37°C 15 分あるいは 60 分 incubate したのち, 血小板凝集能を測定した。測定は HEMATRA-CER 1 (二光バイオサイエンス社) を用い BORN の方法<sup>9)</sup>にて測定した。ADP は Sigma 社製を, collagen は Holm 社製を用いた。ADP 凝集は 8, 4, 2, 1  $\mu$ M, col-

lagen 凝集は 8, 4, 2, 1  $\mu$ g/ml の各 4 濃度で行ない, 5 分間の最大凝集 (maximal aggregation: MA) および最大傾斜 (maximal slope: MS) で検討した (Fig. 2)。

## 2) 血小板表面陰性荷電

PRP を 1% EDTA を含む生理食塩水にて 2 回洗浄し, 洗浄血小板を作製した。杉浦研究所社製の細胞電気泳動測定顕微鏡装置を用いて, 1 検体につき 25°C に

Fig. 3 Effects of antibiotics on human-platelet aggregation (*in vitro*)

て 25 個の血小板の泳動時間を測定し、その平均値より血小板表面陰性荷電 (electrophoretic mobility: E. P. M.) を下記の式より計算した。

$$E. P. M. = M/T \times \pi a^2 / IR \quad \mu\text{sec/V/cm}$$

M: 泳動距離, T: 泳動時間, I: 泳動電流,

a: 泳動管の半径, R: メジウムの泳動度。

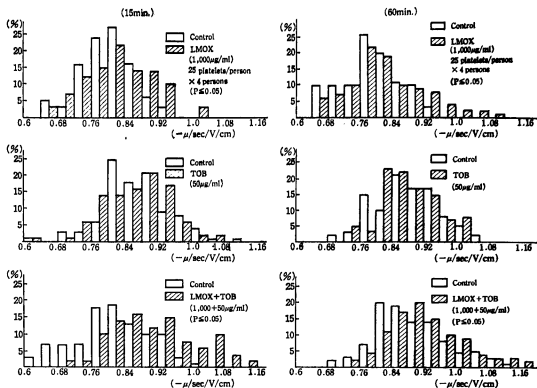
### 3) 血小板粘着能

血小板粘着能は BAUMGARTNER 法<sup>10)</sup>を一部改変<sup>11)</sup>して測定した。家兎の腹部動脈内に Swan-Ganz catheter を挿入しバルーンにて血管内皮細胞を剝離したのち 3~5mm 大の血管片を作製した。この血管片を反転して、perfusion chamber に装着し、3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容量加血液を 150 ml/分、37°C、10 分間灌流した。次にこの血管片を透過電顕用に固定、包埋して約 1mm の切片に切り、トルイジンブルーで染色したのち光学顕微鏡にて観察した。micrometer を用い、10 μm 間隔に区分し、“Naked” (血小板の全く付着していない内皮下組織面)、“Contact” (接触血小板)、“Adhesion”

(粘着血小板)、“Thrombus” (血栓形成: 高さ 5 μm 以上の血小板凝集塊) に分類し、計 1,000 区画におけるそれらの百分率を計算した。

### B. *in vivo* の実験

体重 2.5~3.5 kg の雄の家兎を用いた。LMOX あるいは TIPC の 40 mg/kg/day (n=4) または 400 mg/kg/day (n=10) を 1 日 1 回経静脈的に 7 日間投与したのち、家兎の carotid artery より採血し血小板凝集能および E. P. M. を測定した。ADP 凝集は 10, 5, 2, 1 μM, collagen 凝集は 10, 5, 2, 1 μg/ml の各 4 濃度にて検討した。E. P. M. はヒト血小板と同様に洗浄血小板を作製し測定した。血中濃度は検定菌として LMOX の場合は *E. coli* ATCC-7437 を、TIPC の場合は *P. aeruginosa* NCTC 10490 を用いた band culture bioassay<sup>12)</sup>にて測定した。抗生物質 1g を 5cc の生理食塩水にて溶解し 5 分間で注入しヘパリン処理した注射器にて経時的 (5 分, 10 分, 30 分, 60 分, 180 分) に採血した。血中濃度は 7 日目 (投与終了日) に測定し、血小板凝集能と

Fig. 4 Effects of antibiotics on human-platelet E. P. M. (*in vitro*)Table 2 Effects of antibiotics on human-platelet E.P.M. (*in vitro*)

	(- $\mu/\text{sec}/V/\text{cm}$ )	
	15 min.	60 min.
Control	0.7973 $\pm$ 0.017	0.7984 $\pm$ 0.046
LMOX 200	0.8125 $\pm$ 0.011	0.8140 $\pm$ 0.029
Control	0.8003 $\pm$ 0.005	0.7915 $\pm$ 0.008
LMOX 1,000	0.8081 $\pm$ 0.016	0.7900 $\pm$ 0.027
Control	0.9350 $\pm$ 0.093	0.955 $\pm$ 0.079
TOB 50	0.9438 $\pm$ 0.091	0.955 $\pm$ 0.072
Control	0.8300 $\pm$ 0.069	0.8653 $\pm$ 0.057
LMOX 200	0.8465 $\pm$ 0.067	0.8583 $\pm$ 0.053
Control	0.904 $\pm$ 0.061	0.909 $\pm$ 0.052
LMOX 1,000	0.9163 $\pm$ 0.054	0.9085 $\pm$ 0.078

Data represent mean $\pm$ SD, n=100  
25 platelets/person $\times$ 4 persons

E. P. M. は 8 日目 (投与終了翌日) に測定した。検定は E. P. M. は WILCOXON の検定を用い、他は t 検定を用いた。

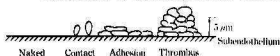
## II. 結 果

### A. *in vitro* の実験

#### 1) 血小板凝集能

抗生物質の単独では、ADP 凝集に対して LMOX は 200~800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では対照と差がなく、1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  にてはじめて抑制を示した (Table 1, Fig. 3)。TOB は 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で ADP, collagen 凝集ともに抑制を認めなかった。抗生物質の併用では ADP 凝集に対して LMOX (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + TOB (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) では抑制がなく、LMOX (1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + TOB (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で抑制を示した。ADP 凝集における抗生物質の incubation 時間への影響をみると、incubation 15 分では二次凝集より一次凝集でより強い抑制が認められた。60 分の incubation では一次凝集しか認められなかったが、ほぼ同様の抑制が認められた。collagen 凝集では、LMOX, TOB の単独、併用のいずれについてもすべての濃度で抑制が認められなかった。Table 1, Fig. 3 には代表的な濃度を示した

Table 3 Effects of antibiotics on human-platelet adhesion to the subendothelium by BAUMGARTNER's method (*in vitro*)



	Naked (%)	Contact (%)	Adhesion (%)	Thrombus (%)
Control (n=10)	26.1±3.2	4.4±1.8	61.5±4.5	8.1±2.0
LMOX 1,000 (n=4)	26.4±4.7	7.1±2.4	59.5±4.3	7.1±2.8
TOB 50 (n=4)	24.9±5.7	5.6±2.9	62.7±8.3	6.8±2.0
LMOX 1,000 TOB 50 (n=3)	27.6±1.8	6.5±3.4	61.0±4.7	5.1±0.9

Data represent mean ± SD

Fig 5 Effects of antibiotics on human-platelet adhesion to the subendothelium by BAUMGARTNER's method (*in vitro*)

C: Control      L: LMOX 1,000μg/ml  
 T: TOB 50μg/ml    L+T: LMOX(1,000μg/ml)+TOB(50μg/ml)  
 (the bars in each figure indicate 5 μm)

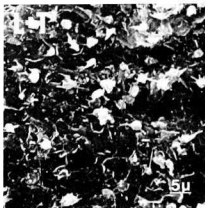
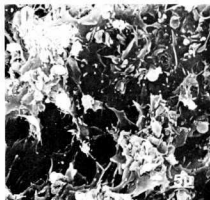


Table 4 Effects of antibiotics on platelet aggregation in rabbits (*in vivo*)

	ADP				Collagen					
	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	2 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ g/ml			5 $\mu$ g/ml		
					M.A.	M.S.	lag time	M.A.	M.S.	lag time
Control (n=10)	55.1 $\pm$ 9.2	50.8 $\pm$ 12.5	43.2 $\pm$ 14.3	38.4 $\pm$ 18.9	68.7 $\pm$ 9.1	62.6 $\pm$ 12.8	93.9 $\pm$ 18.3	65.3 $\pm$ 10.5	51.2 $\pm$ 15.3	126.0 $\pm$ 49.6
LMOX 40 (n=4)	48.8 $\pm$ 3.5	44.2 $\pm$ 2.2	37.8 $\pm$ 4.8	25.3 $\pm$ 15.6	75.0 $\pm$ 5.8	68.0 $\pm$ 9.9	58.0 $\pm$ 9.0	67.0 $\pm$ 4.1	55.0 $\pm$ 18.0	102.0 $\pm$ 25.5
TIPC 40 (n=4)	54.0 $\pm$ 11.4	47.3 $\pm$ 9.1	32.8 $\pm$ 12.7	18.3 $\pm$ 15.7	70.0 $\pm$ 7.2	54.8 $\pm$ 14.5	81.0 $\pm$ 17.3	65.5 $\pm$ 5.8	45.5 $\pm$ 5.2	138.0 $\pm$ 44.4
LMOX 400 (n=10)	32.7 $\pm$ 11.7**	28.6 $\pm$ 9.8**	23.2 $\pm$ 8.8**	11.0 $\pm$ 6.1**	62.3 $\pm$ 11.2	50.7 $\pm$ 13.5	66.0 $\pm$ 23.5	55.8 $\pm$ 11.6	43.5 $\pm$ 14.2	112.9 $\pm$ 52.0
TIPC 400 (n=10)	36.6 $\pm$ 12.4**	30.7 $\pm$ 12.8**	23.7 $\pm$ 11.7**	11.4 $\pm$ 9.1**	66.2 $\pm$ 9.1	49.0 $\pm$ 13.9	91.2 $\pm$ 77.7	56.0 $\pm$ 12.3	39.9 $\pm$ 15.0	146.4 $\pm$ 77.7

Data represent mean  $\pm$  SD

LMOX 40 : LMOX 40 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days, LMOX 400 : LMOX 400 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

TIPC 40 : TIPC 40 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days, TIPC 400 : TIPC 400 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

\*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$

Fig. 6 Effects of antibiotics on platelet aggregation in rabbits (*in vivo*)

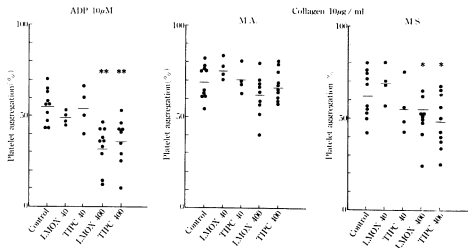
LMOX 40 : LMOX 40 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

LMOX 400 : LMOX 400 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

TIPC 40 : TIPC 40 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

TIPC 400 : TIPC 400 mg/kg/day, iv  $\times$  7 days

\*  $0.01 < P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$



が、他の濃度でもほぼ同様の傾向を示した。

## 2) 血小板表面陰性荷電

LMOX は 200~800  $\mu$ g/ml の濃度では 15 分、60 分の incubation のいずれでも E. P. M. に影響を認めなかったが、1,000  $\mu$ g/ml では 15 分、60 分の incubation ともに有意に E. P. M. を増大させた ( $P < 0.05$ ) (Table

2, Fig. 4)。TOB は 50  $\mu$ g/ml の濃度で 15 分、60 分の incubation のいずれも E. P. M. に影響を与えなかった。

## 3) 血小板粘着能

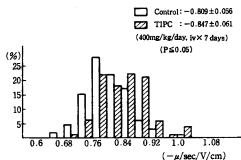
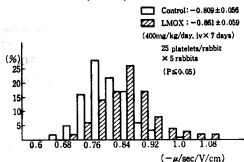
BAUMGARTNER 法によるウサギ大動脈血管に対する血小板粘着能の検討では、LMOX 1,000  $\mu$ g/ml, TOB 50

$\mu\text{g/ml}$  のそれぞれの単独では影響が認められなかった。LMOX (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) + TOB (50  $\mu\text{g/ml}$ ) の併用では "Adhesion" (粘着血小板) には影響を認めず, "Thrombus" (血栓形成) をわずかに抑制したのみであった (Table 3, Fig. 5)。

### B. *in vivo* の実験

LMOX あるいは TIPC を 40 mg/kg/day または 400 mg/kg/day を 1日1回7日間投与した。40 mg/kg/day

Fig. 7 Effects of antibiotics on platelet E. P. M. in rabbits (*in vivo*)



7日間投与群では ADP 凝集, collagen 凝集ともに影響を認めなかった。400 mg/kg/day 7日間投与では LMOX 群, TIPC 群いずれも ADP 凝集のいずれの濃度においても有意な抑制が認められた ( $P < 0.05$ )。collagen 凝集では maximal aggregation には変化が認められなかったが, maximal slope で検討すると抑制が認められた。Table 4, Fig. 6 には代表的な濃度を示したが, 他の濃度でも同様の傾向を示した。

LMOX 400 mg/kg/day 7日間投与群, TIPC 投与 400 mg/kg/day 7日間投与群それぞれで E. P. M. の有意な増大を認めた ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7)。

血中濃度は5分にてピークを示し, 特に LMOX 400 mg/kg/day 投与時には 1,257  $\pm$  527  $\mu\text{g/ml}$  と高値を示した (Table 5)。

### III. 考 察

McCLURE の研究以来, 抗生物質による血小板凝集能の抑制は, *in vitro*, *in vivo* で数多く報告されている<sup>8-11,18-17)</sup>。

動物実験では犬に 750~1,000 mg/kg/24 hr の CBPC あるいは TIPC を投与したところ ADP 凝集は有意に抑制を認め, collagen 凝集はわずかに抑制を認めたと報告されている<sup>8)</sup>。また BANG ら<sup>14)</sup>は normal volunteer に LMOX 12g/day を7日間投与したところ, 3日目より ADP 凝集の抑制を認め中止3日目に回復がみられたと報告している。

1983年 NEU<sup>9)</sup>は抗生物質による血小板凝集の抑制はある種の合成ペニシリンと LMOX に報告例が多いことから<sup>5,5,7,14)</sup>, 6位もしくは7位にカルボキシル基をもつ抗生物質は血小板の膜に結合して凝集能を抑制するのではないかと述べた。 $\beta$ -ラクタム剤の血小板凝集能の抑制を比較すると, *in vitro*<sup>15,16)</sup>, *in vivo*<sup>15,17)</sup>, いずれにおい

Table 5 Plasma concentration of antibiotics in rabbits

	( $\mu\text{g/ml}$ )				
	5 min.	15 min.	30 min.	60 min.	180 min.
LMOX 40 (n=2)	184.5	142.5	85	43.5	
TIPC 40 (n=2)	162.0	68.0	34	3	
LMOX 400 (n=5)	1,257 $\pm$ 527	762 $\pm$ 299	660 $\pm$ 297	533 $\pm$ 322	1.48 $\pm$ 0.46
TIPC 400 (n=5)	780 $\pm$ 221	604 $\pm$ 163	496 $\pm$ 223	296 $\pm$ 89.4	

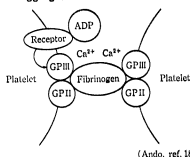
LMOX 40 : LMOX 40 mg/kg/day, iv x 7 days

LMOX 400 : LMOX 400 mg/kg/day, iv x 7 days

TIPC 40 : TIPC 40 mg/kg/day, iv x 7 days

TIPC 400 : TIPC 400 mg/kg/day, iv x 7 days

Fig. 8 Diagram of ADP-induced platelet aggregation



GP II : glycoprotein II, GP III : glycoprotein III

でも LMOX の血小板凝集能の抑制が強いと報告されている。しかし、カルボキシル基をもたない抗生物質にも血小板凝集能の抑制は認められ、カルボキシル基の存在が血小板にいかんにか作用しているかについてはまだ結論が得られていない。

本研究では *in vitro* においては LMOX は 1,000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度ではじめて ADP 凝集を抑制し、特に一次凝集の抑制が強く認められたが、collagen 凝集の抑制は認められなかった。家兎に LMOX または TIPC を 40 mg/kg/day あるいは 400 mg/kg/day 7 日間投与したところ、40 mg/kg/day 投与群では凝集能には抑制は認められなかった。家兎は ADP の一次凝集しかもたないが 400 mg/kg/day 投与群では ADP 凝集の抑制を認め、collagen 凝集では maximal aggregation より鋭敏にその変化が表わされる maximal slope で抑制を認めた。なお 400 mg/kg/day は合成ペニンリンとしては常用量の上限である。

本研究の結果を含め、現在までの報告例を合わせて考えると、*in vivo* では *in vitro* より低濃度で凝集を抑制することから、抗生物質そのものではなく代謝産物が凝集能を抑制するのではないかという意見もある<sup>7)</sup>。

ADP による血小板凝集は Fig. 8 のように考えられている<sup>18)</sup>。血小板表面は陰性荷電をもっており互いに反発し合っている。田上<sup>19)</sup>は、E. P. M. の増大と ADP の一次凝集は相関するが ADP の二次凝集や collagen 凝集とは相関しなかったと報告している。本研究でも ADP 凝集の抑制が認められた *in vitro* での LMOX 1,000  $\mu\text{g/ml}$  の濃度、*in vivo* での 400 mg/kg/day 7 日間の投与でそれぞれ E. P. M. の増大が認められた。

aminoglycoside は細胞膜表面のリン脂質と結合し細胞膜のリン脂質の組成の変化をおこすという報告があるため<sup>20)</sup>。血小板の膜への影響を考慮して TOB を用いて凝集能を検討したが、50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でも影響を認めな

った。

*in vitro* の実験で <sup>125</sup>I-fibrinogen を用いて、CBPC が血小板と fibrinogen の結合を抑制することが報告されている<sup>21)</sup>。また血小板の膜のリン脂質に作用する 6-(p-toluidino)-2-naphthalene-sulfonic acid を用いて、 $\beta$ -ラクタム剤が血小板の膜のリン脂質を障害することも報告されている<sup>22)</sup>。これらの報告からも  $\beta$ -ラクタム剤は血小板の膜を障害して血小板凝集能を抑制すると考えられた。

血小板粘着能の検査法は数種あるが<sup>23)</sup>、家兎の血管を用いた BAUMGARTNER 法が最も生体に近い検査法とされている。BAUMGARTNER 法において LMOX 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 、TOB 50  $\mu\text{g/ml}$  のそれぞれの単独では "Adhesion" (粘着血小板)、“Thrombus” (血栓形成)にはともに影響を認めなかった。LMOX (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) + TOB (50  $\mu\text{g/ml}$ ) の併用でわずかに “Thrombus” (血栓形成) が抑制された。CAZENAVER<sup>24)</sup> も *in vitro* で血小板凝集を抑制する高濃度でも、Penicillin G はコラーゲン粘着には影響しなかったと報告している。

血小板の陰性荷電は表面のシアル酸によると考えられている<sup>10)</sup>。血小板に Neuraminidase を作用させ、シアル酸を除去してもコラーゲン粘着には影響しなかったという報告があり<sup>25,26)</sup>、陰性荷電は血小板粘着には影響しないと考えられている。

本研究では *in vitro* においては LMOX は collagen 凝集への影響は認められず、ADP 凝集の抑制が強く認められた。家兎においても LMOX あるいは TIPC の投与で ADP 凝集の抑制は著明に認められたが、collagen 凝集の抑制はわずかしこ認められなかった。現在までの文献においても、 $\beta$ -ラクタム剤は collagen 凝集への影響は少なく、ADP 凝集の抑制が強いという報告が多く<sup>2-5), 14-16)</sup>、本研究の結果もこれらの報告と一致するものであった。そして、ADP 凝集の抑制の機序としては陰性荷電を増大させることから血小板の膜に非特異的に結合していると考えられた。また血小板粘着への影響は少なく、これは陰性荷電と血小板粘着は関係しないこととよく一致する。

実際に出血傾向が発現した症例で血小板数、プロトロンビン時間 (prothrombin time : PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) はどの施設でも測定されているが、血小板凝集能は一般の施設ではルーチンの検査として行なわれていない。しかし LMOX 投与中に出血傾向を示し、血小板数、PT、APTT は正常で出血時間の延長より血小板凝集能の抑制と判断される症例も報告されている<sup>25,26)</sup>。



さらに血小板系と凝固系は通常は独立しているが、最終的には互いに影響して作用しビタミンK依存性の凝固因子は血小板の膜のリン脂質上で活性化されるといわれている<sup>10)</sup>。このため血小板の膜を障害する抗生物質は二次的にビタミンKを介した凝固止血機構に影響を与える可能性も考えられ、抗生物質使用時には血小板系、凝固系のいずれの出血傾向にも注意する必要があると思われる。

本論文の要旨は第32回日本化学療法学会総会(1984年)、第33回日本化学療法学会総会(1985年)、第34回日本化学療法学会西日本支部総会(1986年)、14th International Congress of Chemotherapy(1985年)において発表した。

稿を終えるにあたりご指導を賜りました恩師安永孝二郎教授、故岡本敏子助教授に深甚なる謝意を表するとともに、本研究に際してご協力いただきました前原敬恒博士、関瀬勲史講師をはじめ医局員各員に感謝いたします。

#### 文 献

- FLEMING, A. & E. W. FISH: Influence of penicillin on the coagulation of blood. *Brit. Med. J.* 2: 242~243, 1947
- MCCLURE, P. D.; J. G. CASSELY, C. MONSTER & D. CROZIER: Carbenicillin-induced bleeding disorder. *Lancet* II: 1307~1308, 1970
- CAZENAVE, J. P.; M. A. PACKHAM, M. A. GUCIONE & J. F. MUSTARD: Effect of penicillin G on platelet aggregation, release, and Adherence to collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 142: 159~166, 1973
- BROWN, C. H.; M. W. BRADSHAW & E. A. NATELSON: Defective platelet function following the administration of penicillin compounds. *Blood* 47: 949~956, 1976
- JONSON, G. J.; G. H. R. RAO & J. G. WHITE: Platelet dysfunction induced by parenteral carbenicillin and ticarcillin. *Am. J. Path.* 91: 85~106, 1978
- 上田 泰, 他: 抗生剤の副作用にかんする研究—広域合成 penicillin 剤の血液凝固能におよぼす影響について—。 *Chemotherapy* 27: 149~150, 1979
- SATTIL, S. J.; J. S. BENNET, M. McDONOUGH & J. TURNBULL: Carbenicillin and penicillin G inhibit platelet function *in vitro* by impairing the interaction of agonists with the platelet surface. *J. Clin. Invest.* 65: 329~337, 1980
- NEU, H. C.: Adverse effect of new cephalosporins. *Ann. Intern. Med.* 98: 415~416, 1983
- BORN, G. V. R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and reversal. *Nature* 194: 927~929, 1962
- BAUMGARTNER, H. R. & C. HAUDENSCHILD: Adhesion of platelet to subendothelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 201: 22~36, 1972
- 高山 進, 他: 抗腫瘍剤の血小板に及ぼす影響 1. Daunorubicin と Doxorubicin の血小板粘着能と形態に与える影響について。 *Blood & Vessel* 15: 409~416, 1984
- 大久保 湧: 抗生物質の測定, その意義と実際。 *内科室函* 2: 906~912, 1956
- 関瀬勲史, 他: 各種抗生剤の血小板凝集能におよぼす影響。 *Chemotherapy* 29: 366~367, 1981
- BANG, N. U.; S. S. TESSLER, R. O. HEINREICH, C. A. MARKS & L. E. MATTLER: Effect of moxalactam on blood coagulation and platelet function. *Rev. Infect. Dis.* 4: S 546~554, 1982
- ANDRASSY, K.; J. KODERSCH, S. FRITZ & E. RITZ: New beta-lactam antibiotics and hemorrhagic diathesis: Comparison of moxalactam and cefotaxime. *Clin. Ther.* 6: 34~41, 1983
- HEINRICH, D.; R. WEINDEL & S. SANTOSO:  $\beta$ -Lactam antibiotics inhibit fibrinogen binding to human platelets *in vitro*: A model for platelet alteration *in vivo*. Recent advances in chemotherapy, antimicrobial section 3, pp. 2611~2612, University of Tokyo press, 1985
- 砂川慶介, 他: 抗生物質と血小板機能。 *Chemotherapy* 35: 252, 1987
- 安藤泰彦, 渡辺清明, 池田康夫: フィブリノーゲンと血小板凝集。 *医学のあゆみ* 127: pp. 70~75, 1983
- TANQUE, K.; S. M. JUNG, I. ISOHISA, N. YAMAMOTO & H. YAMAZAKI: The role of surface charge in platelet function. *Acta Hematol. JPN.* 45: 1391~1400, 1982
- 田中信夫: アミノ配糖体の薬効・薬理。アミノ配糖体薬(編集: 上田 泰), 南江堂, 東京, pp. 33~43, 1985
- AL-MONDHIRY, H.; J. O. BALLARD & V. MCGARVEY: Fibrinogen interaction with human platelets, effect of other coagulation factors, prostaglandins and platelet inhibitors. *Thromb. Res.* 31: 415~426, 1983
- NAKANO, T.; A. TERAWAKI & H. ARITA: Effect of beta-lactam antibiotics on rat platelets. *J. Pharmacobio-Dyn.* 9: s 129, 1986
- 関瀬勲史: コラーゲン線維に対する血小板粘着の検査学的研究: I. コラーゲン線維への血小板粘着測定法の基礎的研究。 *関西医大誌* 38: 145~159, 1986
- GREENBERG, J.; M. A. PACKHAM, J. P. CAZENAVE, H. J. REIMERS & J. F. MUSTARD: Effect

- on platelet function of removal platelet sialic acid by neuraminidase. *Lab. Invest.* 32: 476-484, 1975
- 25) WEITEKAMP, M. R. & R. C. ABER: Prolonged bleeding times and bleeding diathesis associated with moxalactam administration. *JAMA* 249: 69-71, 1983
- 26) FISHMAN, L. & W. R. MARSH: Prolonged bleeding times associated with moxalactam administration. *Neurosurgery* 14: 735-736, 1984
- 27) SUTTIE, J. W. & C. M. JAKSON: Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. *Physiol. Rev.* 57: 1-70, 1977

## EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON HEMOSTATIC MECHANISMS

### I. FUNDAMENTAL STUDIES

YUBE IIDA

First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University

There have been numerous reports that penicillin compounds in large doses inhibit platelet aggregation. It has been suggested that antibiotics with a carboxyl group, such as carbenicillin (CBPC), ticarcillin (TIPC) and latamoxef (LMOX), inhibit platelet aggregation by coating the platelet membrane. The platelet surface carries a negative charge, and the platelets there by repel each other. We studied the effects of antibiotics on platelet aggregation, electrophoretic mobility (E. P. M.), and platelet adhesiveness, both *in vitro* and *in vivo*.

#### 1) *in vitro* study

The effects of the antibiotics, LMOX (200-1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) and tobramycin (TOB) (5-50  $\mu\text{g/ml}$ ) and their combination on platelet function was studied. LMOX suppressed ADP-induced human platelet aggregation, especially primary aggregation, at 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , but not at lower doses. However, TOB (50  $\mu\text{g/ml}$ ) did not suppress platelet aggregation. Even at high doses, both these antibiotics did not suppress collagen-induced platelet aggregation. LMOX (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) raised E. P. M. compared with the control, while ADP-induced primary aggregation had a negative correlation with E. P. M.

These antibiotics were found to have no effect on platelet adherence to the subendothelium of rabbit aorta when examined by BAUMGARTNER's method. Thrombus formation was also slightly reduced by the combination of LMOX+TOB (1,000+50  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 2) *in vivo* study

LMOX or TIPC (intravenously, 400 mg/kg/day for 7 days) significantly suppressed ADP-induced platelet aggregation, and slightly suppressed collagen-induced platelet aggregation. These antibiotics raised E. P. M. compared with the controls.

The platelet aggregation system and the coagulation system may possibly influence each other. Since vitamin K-dependent clotting factors (II, VII, K, X) activate the platelet surface,  $\beta$ -lactams which inhibit ADP-induced platelet aggregation by nonspecific coating of platelet membranes may affect the vitamin K-dependent clotting system.