注射剤添加物の凝固・線溶系に及ぼす影響¹⁾

木村昌行,^{*,a} 安井智美,^a 佐藤 旬,^a 楠 逸美,^a 中川輝昭,^a
上野雅晴,^a 堀越 勇,^a 櫻川信男^b
富山医科薬科大学附属病院 薬剤部,^a 検査部^b

Effects of Additives contained in Injections on Coagulation and Fibrinolysis of Blood¹⁾

MASAYUKI KIMURA,^{*,a} TOMOMI YASUI,^a JUN SATOH,^a ITSUMI KUSUNOKI,^a
TERUAKI NAKAGAWA,^a MASA HARU UENO,^a ISAMU HORIKOSHI,^a
and NOBUO SAKURAGAWA^b

*Department of Hospital Pharmacy^a and Central Clinical Laboratory,^b
Toyama Medical and Pharmaceutical University,
2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan*

(Received July 2, 1982)

Effects of six kinds of additives in injections, *i.e.* benzyl alcohol, HCO-60, macrogol 4000, urethan, sodium bisulfite and sodium sulfite, on the blood were investigated, and the following results were obtained; 1) In the concentrations of additives contained in injections benzyl alcohol inhibited the platelet aggregation and the inorganic salts had the inhibitory effects on both the blood coagulational and fibrinolytic phenomena. The action of sodium bisulfite on the blood was recognized to be based on pH and that of sodium sulfite to be ascribed to SO_3^{2-} . 2) The injections which contain both benzyl alcohol and sodium bisulfite as additives are commercially available. However, they are not evaluated to be desirable injections from the standpoints of hematology, especially of coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation.

Keywords—additives in injections; HCO-60; benzyl alcohol; macrogol 4000; urethan; sodium bisulfite; sodium sulfite; coagulation; fibrinolysis; platelet aggregation

本研究は、脂溶性ビタミン剤の効果に関する臨床報告中に、ADP で惹起された血小板凝集能がビタミン E の添加により、*in vitro* で有意に抑制されたとの報告²⁾に端を発する。

脂溶性のビタミン E に試験管中で、凝集能抑制という直接的な効果を期待することには測定の物理化学的機序から考えて無理がある。むしろこの現象は、溶解補助の目的で注射剤中に 2% ほど添加されていたベンジルアルコールの効果ではないかと判断し、追試したところ予想した特性のあることが判った。市販注射剤の中には、可溶化、分散、無痛化、酸化防止、防腐などの目的で、種々の物質が添加されている。これら添加物の血液系に対する作用について詳細に検討された報告は少ない。

経口投与された薬物が標的組織に到達するためには、消化管から吸収された後、血流に乗らなければならない。その際、血液と薬物との間に広範な相互作用の起こる可能性がある。特に注射剤では、主剤のみならず添加物までが直接血液と接触するので、添加物の血液に対する影響を検索することは、製品の評価や剤形設計上重要な意味を持つ。

今回は、可溶化および無痛化を目的として広く添加されているベンジルアルコール、注射剤に添加が認められている唯一の界面活性剤 HCO-60、催奇形性の可能性ありとして使用が禁止されているウレタン、血液製剤に添加されているマクロゴール 4000、それに酸化防止剤の亜硫酸水素ナトリウムおよび亜硫酸ナトリウムの合計 6 種類の添加物について、凝固、線溶および血小板凝集能に及ぼす効果について検索したところ、興味ある 2, 3 の知見を得たので以下その詳細を報告する。

実 験 の 部

試 料

1. 添加物 ベンジルアルコールは半井化学試薬特級を, HCO-60 は日光ケミカルズの製品を, ウレタンは半井化学試薬特級を, マクロゴール 4000 は局方品を, NaHSO_3 および Na_2SO_3 は和光純薬の試薬特級を, それぞれ希釈して試料溶液とした.

2. 試薬 ヒト標準血漿, リン脂質, 塩化カルシウム溶液およびプロトンビン時間測定用試薬は, いずれもデイド社製で, それぞれ Ci-TROL I (クエン酸塩加標準血漿), アクチン (液状兎脳セファリン製剤, 1.0×10^{-4} M エラジン酸含有, 2 ml/vial), 血液凝固試験用 0.02 M CaCl_2 溶液 (5 ml/vial) およびトロンボプラスチン・C (アセトン脱水兎脳トロンボプラスチンおよび Ca^{2+} 1.16×10^{-2} M 含有, 4 ml/vial) をそのまま, もしくは蒸留水で溶解希釈して使用した.

線溶能測定で使用するフィブリノーゲン, トロンビンおよびウロキナーゼの各溶液は, いずれもミドリ十字社製で, それぞれヒトフィブリノーゲン (1 g/vial), ヒトトロンビン (500 単位/vial) およびウロキナーゼ注 (6000 IU/vial) を用時 1/10 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) もしくは生理食塩液で希釈した. 特に, ウロキナーゼは不安定なので, 凍結保存しておき用時溶解して用いた.

ユーグロブリン画分の調製.³⁻⁵⁾ クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿に試料溶液を加え, さらに蒸留水を加えて 20 倍希釈し, これに 1% 酢酸溶液を加えて pH 5.6 (等電点) に調整後約 1 時間 4°C に放置し, これを 3000 rpm, 15 分間遠沈すると白色の沈渣を得る. 上清を捨て沈渣をもとの血漿と同容量の Owren 緩衝液に溶解して使用した.

血小板凝集能測定に用いる 10^{-4} M エピネフリン, $10 \mu\text{g/ml}$ コラーゲンおよび 10^{-4} M ADP の各溶液は, ポスミン注 (第一製薬製, 1 ml/ampule), 天然コラーゲン繊維溶液 (Hormon-Chemie 社製, 1 mg/ml, pH 2.7) および Sigma 社の adenosine-5'-diphosphate を 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) で希釈調製した.

3. 緩衝液 Owren 緩衝液はデイド社製の Owren's veronal buffer (pH 7.35) を使用, ペロナールナトリウム-酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液は Michaelis の方法⁶⁾ により調製, 使用した. また, Na_2SO_3 溶液と同じイオン強度の溶液を調製するために, Table I に示す塩化ナトリウム溶液を用意した.

TABLE I. Relation between Ionic Strength and Concentration of NaCl Solutions

Ionic strength	0.0594	0.119	0.179	0.238	0.300	0.400	0.594
Concn. of NaCl (w/v %)	0.347	0.695	1.05	1.39	1.75	2.34	3.47

装 置

活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトンビン時間 (以後 aPTT および PT と略す) 測定にはデイド社製 Auto-Fi を, 血小板凝集能測定を目的として, トーア自動血小板計数装置 (東亜医用電子, PL-100) および 4 チャンネル自動血小板凝集計 (NKK 社製, ヘマトレーサー-1, モデル PAT-4 A) を使用した.

測定方法

1. aPTT 測定 Auto-Fi のサンプル皿上に試料 0.1 ml を正確に秤取すると, 装置が作働して Ci-TROL I 0.1 ml, アクチン 0.1 ml さらに 0.02 M CaCl_2 0.1 ml が自動的に添加され, この時点からフィブリン塊が形成されるまでの時間を自動記録した.

2. PT 測定 aPTT 測定と同様, Auto-Fi を用い試料 0.1 ml, Ci-TROL I 0.1 ml およびトロンボプラスチン・C を 0.2 ml 加えた時点からフィブリン塊が形成されるまでの時間を測定した.

3. フィブリン平板を用いた線溶能測定 水平な机上に内径 86 mm のプラスチックシャーレを置き, これに 0.6% フィブリノーゲン溶液 4 ml, 1/10 M リン酸塩緩衝液 4 ml を加えて混和し, さらに 10 単位/ml トロンビン溶液 0.1 ml を加え, シャーレを静かに動かして混和する. そのまま 30 分間室温で静置し, 均一な厚さのフィブリン平板を作製する. 次に, 800 IU/ml ウロキナーゼ溶液と, 2 倍濃度の試料溶液を等量混合し, 添着用の試料とする. フィブリン平板上に, 添着用試料を血糖用ピペットを用いて 0.03 ml ずつ半球形状に添着する. このシャーレを 37°C の恒温槽中に 6 時間放置し, 得られた溶解窓の長・短径の積を線溶能の指標とした.

4. ユーグロブリン溶解時間³⁻⁵⁾ の測定 ユーグロブリン分画の Owren 緩衝溶液 0.3 ml に, 50 単位/ml

トロンビン溶液 0.06 ml を加え、フィブリン塊を形成させる。これを 37°C 恒温下に保存し、一定時間毎に観察してフィブリン塊が完全に溶解するまでの時間を測定し、これをユーグロブリン溶解時間とした。

5. 血小板凝集能測定^{7,8)} 3.8% クエン酸ナトリウム溶液 1/10 容を添加した新鮮血を、1000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を採取してこれを多血小板血漿 (platelet rich plasma, 以後 PRP と略す) とする。血球を含む沈澱層をさらに 3000 rpm で 20 分間遠心分離すると、上清に寡血小板血漿 (platelet poor plasma, 以後 PPP と略す) を得る。PRP 中の血小板数を測定し、粒子数が $3 \times 10^5/\mu\text{l}$ となるよう PPP を加えて調整し、これを試験用血漿とする。次に、血小板凝集計に装着されている 7 mm ϕ $\times$ 50 mm のキューベットに試験用血漿 200 μl と試料溶液 50 μl を入れ、スターラーで攪拌し、これに凝集の inducer である ADP, エピネフリンあるいはコラーゲン溶液を 20 μl 添加し、凝集挙動を透過率の時間的变化として観察した。

6. 家兎を用いた *in Vivo* 実験 Rodriguez-Erdmann 法⁹⁾ に従い、外径 1.35 mm ϕ のポリエチレンチューブを体重約 3 kg の健常家兎 (♀) の耳静脈より心臓内部まで挿入し、チューブを介して試料溶液の注入と被験血液の採取を行った。

7. 種々な pH 条件下での aPTT および PT の測定 Ci-TROL I 1 バイアルを 0.2 ml の蒸留水で溶解し、これに各 pH のペロナールナトリウム-酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 0.8 ml を加え、pH の異なった血漿を作成する。この血漿の pH と aPTT および PT 測定後の pH とを測定しておく。また、この実験では両測定とも自動機器を用いず手法 (傾斜試験管法) で行った。

手法による aPTT 測定¹⁰⁾—小型試験管 (13 mm ϕ $\times$ 100 mm) に上記血漿 0.1 ml, 試料 0.1 ml およびアクトン 0.1 ml を入れて混和し、37°C で 1 分間インキュベート後 0.02 M CaCl_2 溶液 0.1 ml を加え、37°C 恒温下検液が凝固するまでの時間を測定した。

手法による PT 測定¹¹⁾—小型試験管に上記血漿 0.1 ml および試料 0.1 ml を加えて混和し、37°C で 1 分間インキュベート後、トロンボプラスチン・C 溶液 0.2 ml を加え、37°C 恒温下で aPTT の測定と同様凝固するまでの時間を観察した。

8. 種々のイオン強度下での aPTT 測定 種々のイオン強度に調整した Na_2SO_3 および NaCl 溶液を用いて前項 7. と同じ手法で測定した。

結果および考察

1. 凝固系に及ぼす影響

6 種類の添加物、ベンジルアルコール、HCO-60、マクロゴール 4000、ウレタン、 NaHSO_3 および Na_2SO_3 の aPTT および PT に対する影響をまとめて Fig. 1 および Fig. 2 に示す。図の縦軸は凝固時間、横軸は試料の濃度をそのまま表示した。従って、測定セル中では他の試薬で希釈され、添加物濃度は 1/4 に低下している。

両図から明らかなように、aPTT および PT 共にいずれの添加物でも凝固抑制に濃度依存性があり、凝固時間の延長が認められるが、HCO-60、ウレタンおよびマクロゴール 4000 の 3 種類の添加物のそれは顕著ではなく、特に PT 測定では濃度の影響を無視できる。

一方、ベンジルアルコールには濃度依存性があり、aPTT では添加濃度 2% で著しい凝固時間の延長が認められた。また、 NaHSO_3 と Na_2SO_3 の aPTT および PT に対する影響は極めて強烈で、微量の添加で測定範囲を大きく逸脱してしまう。この凝固阻害能は試料溶液の pH, イオン強度あるいはイオン種のいずれかに起因すると思われる。そこで、凝固時間と pH との関係を調べてみた。結果を Fig. 3 に示す。aPTT および PT ともに pH が中性から酸性に傾くと、急激な凝固時間の延長が認められた。この傾向は後に報告¹²⁾ するトロンビン活性測定の際にも認められたものである。

NaHSO_3 については添加試料の pH を凝固時間測定の前後でチェックしたところ、Fig. 3 の結果とほぼ一致した値が得られた。 Na_2SO_3 は添加しても試料溶液の pH が変動しないので、pH が凝固時間延長の原因とは考えられない。そこでイオン強度との対応を調べ、結果を Fig. 4 に示す。図の 2 つの曲線の勾配から明らかなように、同じイオン強度の NaCl に比して Na_2SO_3 の aPTT 抑制能は大きい。従って、抑制能の主因は pH でもイオン強度でもなく SO_3^{2-} イオン自身の効果と考えられる。

以上、*in vitro* 実験では NaHSO_3 , Na_2SO_3 およびベンジルアルコールに顕著な凝固抑制作用が認められたので、次に家兎による *in vivo* 実験を行ってみた。

体重約 3 kg の健常家兎 (♀) に注射剤中の添加濃度と等しく NaHSO_3 および Na_2SO_3 は 0.5%, ベンジルア

Fig. 1. Relation between Additive's Concentration and Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

○: benzyl alcohol, ●: HCO-60,
○: urethane, ○: macrogol 4000,
●: NaHSO₃, ●: Na₂SO₃.

Fig. 2. Relation between Additive's Concentration and Prothrombin Time (PT)

○: benzyl alcohol, ●: HCO-60,
○: urethane, ○: macrogol 4000,
●: NaHSO₃, ●: Na₂SO₃.

Fig. 3. pH Dependency of Clotting Time

●: aPTT, ○: PT.

Fig. 4. Relation between Ionic Strength of Additives and Clotting Time (aPTT)

○: Na₂SO₃, ●: NaCl.

ルコールは 2.0%, HCO-60 およびウレタンは 10%, そしてマクロゴール 4000 では 0.5% 溶液を調製し、これらの溶液 5—15 ml を一定の注入速度でカテーテルを通じて心臓内に注入し、注入後 1 分, 30 分, 1, 2, 4 および 6 時間に採血して aPTT および PT の経時的挙動を追跡した。しかし、いずれの添加剤を注入した場合も、この条件下では急性の変化は認められなかった。

2. 線溶系に及ぼす影響

線溶亢進あるいは抑制の有無を検索する目的で、フィブリン平板を用いたウロキナーゼ線溶活性に対する効果およびユーグロブリン溶解時間に対する寄与を比較してみた。結果を Fig. 5 および Fig. 6 に示す。凝固系の場合と同様、HCO-60, ウレタンおよびマクロゴール 4000 には、いずれも濃度依存性がなく、この濃度範囲では抑制も亢進も認められなかった。

Fig. 5. Relation between Additive's Concentration and the Lysis Activities of Urokinase measured by Fibrin-plate Method

○: benzyl alcohol, ○: urethane, ●: NaHSO₃, ●: HCO-60, ○: macrogol 4000, ●: Na₂SO₃.

Fig. 6. Relation between Additive's Concentration and the Euglobulin Lysis Time

○: benzyl alcohol, ○: urethane, ●: NaHSO₃, ●: HCO-60, ○: macrogol 4000, ●: Na₂SO₃.

Fig. 7. Relation between Inhibitory Behaviors of Platelet Aggregation and Additive's Concentration

○: collagen, ○: ADP, ○: epinephrine.

添加物濃度を測定範囲の上限としたが、測定セル内ではさらに希釈されて表示値の 18.5% の濃度になっている。

図から明らかなように、NaHSO₃、Na₂SO₃、ウレタンおよびマクロゴール 4000 の 4 種類の添加物では、測定濃度全域にわたって凝集阻害は認められなかった。しかし、ベンジルアルコールと HCO-60 とでは、インデューサーにより若干の差異はあるものの、添加濃度で明確な凝集阻害が認められた。

総括

以上の実験結果より次のことが推論できる。凝固・線溶および血小板凝集のような血液学的な挙動から見ると、ウレタンとマクロゴール 4000 の 2 種類の添加物は比較的安全性が高い。HCO-60 には血小板凝集阻害が認められるが、10% という高濃度では多くの物質に共通した性質であって、HCO-60 に特異な挙動とは言い難い。NaHSO₃ や Na₂SO₃ のような無機塩類やベンジルアルコールには *in vitro* の実験で強烈な生理作用を示すことが判った。これら添加物を含む注射剤の長期投与には問題が残る。例えば、Gershanik らの報告¹³⁾ によれば、ベンジルアルコール含有のヘパリン製剤を繰り返し注射された 5 名の未熟児が神経機能の障害、重篤な代謝性アシドーシス、呼吸困難、血小板減少、肝臓および腎臓障害、血圧低下、ショックを起こし死亡したとある。また、Brown らの報告¹⁴⁾ でも、16 名の未熟児のうち 10 名がベンジルアルコールの中毒によると思われる症状で死亡している。これら未熟児の尿からは未変化のままのベンジルアルコールや安息香酸、馬尿酸が検出された。その意味では初めに述べたビタミン E の注射剤の添加物をベンジルアルコールから HCO-60 に変えたことは好まし

一方、NaHSO₃ はフィブリン平板法では、極めて低濃度でウロキナーゼの線溶活性を完全に阻害してしまったが、Na₂SO₃ の阻害効果は NaHSO₃ ほど顕著ではなかった。また、ベンジルアルコールはわずかではあるが線溶能亢進作用を持つと思われる結果を得た。

これらの傾向はユーグロブリン溶解時間の測定でも同様に認められた。

3. 血小板凝集能に対する影響

測定結果をまとめて Fig. 7 に図示する。図の横軸は添加物の濃度、縦軸は血小板凝集に伴って起こる透過率の変化のコントロールに対する比を%で表現したものである。注射剤中の

い改良と言えよう。

しかし、現時点でベンジルアルコールや亜硫酸水素ナトリウムが添加された注射剤が多数市販されており、中にはこの両者を含む製品も2,3見受けられる。このような注射剤は凝固、線溶、血小板凝集という血液のホメオスターシスに關与する基本的性質をいずれも抑制し、阻害する可能性を秘めており、肝臓や循環器の障害を持つ患者への投与には、より一層の慎重さが必要であろう。

今後は、添加物間の相互作用についても検討を続けて行きたい。

引用文献および注

- 1) この論文の要旨は第43回日本血液学会総会で発表，名古屋，1981年4月。
- 2) 有森 茂，“ビタミンEシンポジウム抄録集，”1980，p.108。
- 3) 松岡松三，“血液凝固検査法（改訂第3版），”金原出版，東京，1979，pp.206—208。
- 4) 風間睦美，臨床病理，**24**，316（1975）。
- 5) 風間睦美，医用酵素，**1**，476（1975）。
- 6) L. Michaelis, *Biochem. Z.*, **234**, 139 (1931)。
- 7) G.V.R. Born, *Nature* (London), **194**, 927 (1962)。
- 8) J.R. O'Brien, *J. Clin. Path.*, **15**, 452 (1962)。
- 9) F. Rodriguez-Erdmann, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **269**, 306 (1959)。
- 10) R.R. Proctor, S.I. Rapaport, *Am. J. Clin. Path.*, **36**, 212 (1961)。
- 11) 福武勝博，鈴木弘文，“新版日本血液学全書 13，血液学的検査・正常値，”新版日本血液学全書刊行委員会編，丸善，東京，1977，pp.372—375。
- 12) 木村昌行，佐藤 旬，上野雅晴，堀越 勇，桜川信男，薬誌，**103**，accepted。
- 13) J.J. Gershanik, B. Boecler, W. George, A. Sola, M. Leitner, C. Kapadia, *Clin. Res.*, **29**, 895 A (1981)。
- 14) W.J. Brown, N.R.M. Buist, H.T. Cory Gipson, R.K. Huston, N.G. Kennaway, *Lancet*, **I**, 1250 (1982)。