

セファロスポリン剤による直接クームス試験陽性に関する基礎的研究

宮川千恵子・田沢房子・峯島博子

順天堂大学中検

小酒井 望

順天堂大学臨床病理学教室

セファロスポリン剤投与により直接クームス試験が陽性になると Molthan ら¹⁾は報告し、特に Cephalothin (CET) について試験管内におけるクームス試験を陽性にする薬剤濃度、その他の基礎的実験を報告している。わが国においても数種類のセファロスポリン剤が使用されているので、Cephalexin (CEX), Cefazolin (CEZ) を中心として数種の薬剤について、試験管内でのクームス試験が陽性になる薬剤濃度について基礎的実験を行なうとともに、用いる抗ヒトグロブリン血清により異なるかどうか検討した。実験の結果、クームス試験が陽性とてたことに関して私どもはセファロスポリン剤を媒介として、赤血球に血漿蛋白が結合し、これに抗ヒトグロブリン血清を加えると凝集し、クームス試験が陽性化したものと考えている。

I 実験材料

- (1) 抗生物質
CEX, CET, Cephaloridine (CER),
Cephaloglycin (CEG), CEZ および PC-G,
KM, Nafcillin
- (2) 抗ヒトグロブリン血清
Ortho, Pfizer, 東京標準血清, ミドリ十字の各製品
- (3) Alsever 溶液
成書²⁾に従って作成した。
- (4) 生理食塩液
0.85%を使用
- (5) 被検血液
採血直後の正常人全血を用いた。保存は Molthan ら¹⁾に従った。

II 実験方法

実験方法は Ley ら³⁾と Molthan ら¹⁾を参考として図1のごとく行なつた。すなわちまず A)のごとく Alsever 血液を作成し、これを用いて B)のごとくセファロスポリン剤を赤血球に感作した。その際 CEX, CEG のよ

うに溶解度の低いものについては、イ), ロ)の方法で行ない、CET, CER, CEZ のように溶解度の高いものについてはロ)の方法のみを用いた。感作血球(II)を用いて、型通りのクームス試験を行なつた。

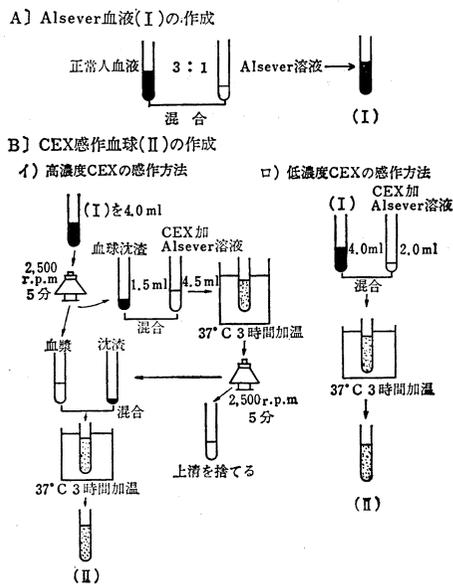


図1 正常人血球に CEX を感作する方法

III 実験結果

1. セファロスポリン剤と赤血球、血漿蛋白の結合状態

クームス試験がセファロスポリン剤により陽性になるのは、セファロスポリン剤を介して赤血球に血漿蛋白が結合すると考えられるので、まず次の実験を行なつた。(a)は赤血球を生理食塩液でよく洗浄した後セファロスポリン剤を感作したもの、(b)は洗浄した赤血球にセファロスポリン剤を感作後、生理食塩液でよく洗浄し、更に血漿蛋白を加えて反応させたもの、(c)は図1-B)による方法で作つた感作血球である。これらを用いて、型通りクームス試験を行なつたのが表1である。表から明らか

表1 抗生物質の結合状態

抗生物質	抗ヒトグロブリン血清 mg/ml 反応方法 薬剤濃度	Ortho			Pfizer			東京標準血清			ミドリ十字		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
CET	3.33	-	+	+	-	±	+	-	+	+	-	+	+
CER	16.7	-	+	±	-	+	+	-	+	+	-	+	+
CEX	7.5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
CEG	7.5	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	±	+
CEZ	16.7	-	±	+	-	+	+	-	±	+	-	±	+

なように、(a)のごとく血漿蛋白の存在しない場合はクームス試験は陽性にならないが、(b)のごとく後に血漿蛋白を作用させると陽性になる。このことより、血漿蛋白の存在なしでも、セファロスポリン剤が赤血球に吸着することがわかる。また、(b)、(c)ではいずれも血漿蛋白が存在するが、感作時に血漿蛋白が存在する方が反応が強かった。

2. 直接クームス試験を陽性にするセファロスポリン剤の最低濃度

私たちはまず直接クームス試験を陽性にする CEX の最低濃度について実験した。表2は多数の正常人について実験したうちの6人の成績を示したが、CEXにより直接クームス試験が陽性になる最低濃度は3.33~7.5 mg/mlの範囲で多少個人差がみられる。これらを表3のごとく市販されている抗ヒトグロブリン血清の2種類を用いて比較したところ、抗ヒトグロブリン血清によりかなり差がみられた。

さらに4種類の市販抗ヒトグロブリン血清を用いて、5種類のセファロスポリン剤による直接クームス試験を陽性にする最低濃度について繰り返し実験した結果が表4である。抗ヒトグロブリン血清の種類により最低濃度に差のみられるのは表3と同様である。しかし、同一抗ヒト

グロブリン血清を用いた場合、CEX, CET, CER, CEGでは Ortho 1.67~7.5 mg/ml, ミドリ十字 0.167~0.666 mg/ml と近似値の範囲にあり、Pfizer, 東京標準血清では CER で多少最低濃度が低いが、それぞれ 0.333~6.66 mg/ml, 0.167~3.33 mg/ml と近似している。CEZ のみ他のセファロスポリン剤に比べ最低濃度が高い。また Molthan^らとの成績の比較では私たちがの方が最低濃度が高い。

3. 直接クームス試験を陽性にする他の抗生物質の濃度

セファロスポリン剤による直接クームス試験の対照として同様の実験を PC-G, KM, Nafcillin について行なった結果が表5である。これらの最低濃度は Molthan^らの成績と同様、セファロスポリン剤に比してずつと高い。抗ヒトグロブリン血清による最低濃度の差はセファロスポリン剤の場合と同様である。

考 察

セファロスポリン剤の媒介で赤血球と血漿蛋白が結合することにより、直接クームス試験が陽性になるが、試験管内で陽性になるセファロスポリン剤の最低濃度は、正常人の血液でも多少個人差がみられ、使用する抗ヒト

表2 直接クームス試験を陽性にする CEX の濃度

試験管 No. CEXの濃度	1	2	3	4	5	6	7	最低濃度 mg/ml
正常人血液	7.5 mg/ml	5.0	3.33	1.67	0.666	0.333	0.167	
A	+	+	±	±	-	-	-	5.0
B	+	+	±	±	±	-	-	5.0
C	+	+	+	±	±	-	-	3.33
D	+	±	±	-	-	-	-	7.5
E	+	±	-	-	-	-	-	7.5
F	+	+	-	-	-	-	-	5.0

表3 2種の抗ヒトグロブリン血清による直接クームス試験を陽性にする CEX の濃度の比較

試験管 No. 抗ヒトグロブリン血清	CEXの濃度 mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	最低濃度 mg/ml
		7.5	5.0	3.33	1.67	0.666	0.333	0.167	
正常人血液	Ortho	+	+	±	±	-	-	-	5.0
	ミドリ十字	+	+	+	+	+	-	-	0.666
A	Ortho	+	+	±	±	±	-	-	5.0
	ミドリ十字	+	+	+	+	+	-	-	0.666
B	Ortho	+	+	±	±	±	-	-	5.0
	ミドリ十字	+	+	+	+	+	+	±	0.333
C	Ortho	+	+	+	±	±	-	-	3.33
	ミドリ十字	+	+	+	+	+	±	±	0.666
D	Ortho	+	±	±	±	-	-	-	7.5
	ミドリ十字	+	+	+	+	+	+	±	0.333

表4 直接クームス試験を陽性にするセファロsporin剤の最低濃度

抗生物質	抗ヒトグロブリン血清				MOLTHAN <i>et al.</i> mg/ml
	Ortho mg/ml	Pfizer mg/ml	東京標準血清 mg/ml	ミドリ十字 mg/ml	
CEX	3.33~7.5	0.666~1.67	0.333~1.67	0.167~0.333	—
CET	3.33~6.66	6.66	1.67~3.33	0.333~0.666	0.666
CER	1.67~6.66	0.333	0.167	0.167~0.333	0.521
CEG	3.33~5.0	1.67~3.33	3.33	0.666	—
CEZ	16.7	16.7	16.7	0.167~0.666	—

グロブリン血清の種類によつてかなりの差が生じる。しかし、同一抗ヒトグロブリン血清で行なうと、CEX, CET, CER, CEG は近似した最低濃度になり、CEZのみ高い濃度で陽性である。MOLTHAN *ら*¹⁾は、CET を投与された多くは直接クームス試験が陽性となり (55人中41人 75%)、輸血を困難にしたとのべ、また CET 投与後では31人中25人が直接クームス試験が強陽性になつたとのべている。GRALNIK *ら*⁴⁾も20人の患者にCETを投与したところ8人が直接クームス試験が陽性であつたが、これら8人は全て窒素血症患者で、CETを多量に投与したとのべている。金沢⁵⁾はCET 1000 mg 静注1時間

後の血中濃度は21 mcg/ml であるとし、QUINN⁶⁾はCER 1000 mg 筋注した時の1時間値は23.4~55.7 mcg/ml であるとのべ、この際6~12時間毎に筋注すると血中濃度は1.5~2倍に上がるとのべている。5種類のセファロsporin剤によりクームス試験が陽性になる濃度はOrtho 1.67~16.7 mg/ml で、Orthoの抗ヒトグロブリン血清を用いた場合にはクームス試験が陽性にできるとは考えられない。しかし、東京標準血清、ミドリ十字の製品を用いれば、注射直後や、注射部位では血中濃度が高くなるので直接クームス試験が陽性になることがある。特にミドリ十字の抗ヒトグロブリン血清では0.167

表5 直接クームス試験を陽性にする他の抗生物質の濃度

抗生物質	抗ヒトグロブリン血清				MOLTHAN <i>et al.</i>
	Ortho	Pfizer	東京標準血清	ミドリ十字	
PC-G	33.3 mg/ml	16.7 mg/ml	6.66~3.33 mg/ml	1.67 mg/ml	>35.7 mg/ml
KM	66.6	16.7~33.3	33.3~66.6	3.33	>16.7
Nafcillin	>6.66	>6.66	>6.66	>6.66	>8.3

～0.666 mg/ml であるから陽性になる可能性が強い。

これら抗ヒトグロブリン血清は製品により最低濃度が異なるので、抗ヒトグロブリン血清の性質や力価⁷⁾について検討を行ない別に報告⁸⁾した。なお本現象の本態、直接クームス試験を陽性にする血漿蛋白の分画については今後の検討を要する。

結 論

セファロスポリン剤により直接クームス試験が陽性になる最低濃度を検討したところ、CET, CER, CEG, CEX は同一抗ヒトグロブリン血清を用いると近似値をとるが、抗ヒトグロブリン血清の相違によりかなりの開きがみられた。CEZ は他のセファロスポリン剤と比べかなり大きな値を示した。以上の成績から使用する抗血清によつては、セファロスポリン剤使用中（とくに血中濃度の高くなる注射薬の場合）、直接クームス試験が陽性になり得ることを知つた。

本研究の要旨は第18回日本化学療法学会総会にて発表した。

文 献

1) MOLTHAN, L., *et al.*: Positive direct Coombs

tests due to Cephalothin. *New Engl. J. Med.* 277: 123~125, 1967

- 2) 鈴木 鑑: 臨床検査技術講座(第2集)血清学; 63~64, 金原出版, 1965
- 3) LEY, A. B.; HARRIS, J. P., BRINKLEY, M. & LILES, B.: Circulating antibody directed against Penicillin. *Science* 127: 1118~1119, 1958
- 4) GRALNIK, H. R.; WRIGHT, L. D. & MCGINNESS, M. H.: Coombs' positive reaction associated with sodium Cephalothin therapy. *J. A. M. A.* 199: 725~726, 1967
- 5) 金沢 裕, 他: Cephalosporin C 製剤の基礎的臨床的検討. *Jap. J. Antibiotics* 21: 1~9, 1967
- 6) E. L. QUINN, *et al.*: Cephaloridine, laboratory and clinical evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1966: 88~95, 1967
- 7) 黒川正身, 他: クームス血清基準, 生物学的薬剤基準: 191~195, 厚生省, 1967
- 8) 宮川千恵子, 他: 市販クームス試薬の検討, 現在投稿中

FUNDAMENTAL STUDIES ON THE POSITIVE DIRECT COOMBS TEST DUE TO CEPHALOSPORINS

CHIEKO MIYAKAWA, FUSAKO TAZAWA and HIROKO MINESHIMA

Clinical Laboratories, Juntendo University Hospital

NOZOMU KOSAKAI

Department of Clinical Pathology, Juntendo University School of Medicine

It has been observed by MOLTHAN *et al.* that the direct Coombs test is positive in patients receiving Cephalothin (CET). This is considered to be caused by plasma protein binding to the erythrocyte to which CET has adhered.

We carried out *in vitro* experiments with CET, Cephaloridine (CER), Cephaloglycin (CEG), Cephalexin (CEX), and Cefazolin (CEZ) to determine the concentration of each antibiotic at which the direct Coombs test was positive.

Four Cephalosporins except CEZ showed similar values, but these values were somewhat different according to the kind of antiglobulin serum. When Ortho's antiglobulin serum was used for these four Cephalosporins, we had a positive direct Coombs test at similar concentrations ranging from 1.67 to 7.5 mg/ml. However, when Green Cross's antiglobulin serum was used, four Cephalosporins showed the values ranging from 0.167 to 0.666 mg/ml.

CEZ showed a rather high value than other Cephalosporins, ranging from 0.666 to 16.7 mg/ml.