

Cefamandole の *in vitro* クームス反応陽性化作用

原田 稔・竹内三津男

塩野義製薬株式会社研究所

Cefamandole の *in vitro* クームス反応陽性化作用をヒトとマウスの赤血球を用いて検討し、対照薬物 (Penicillin G, Cephalothin, Cefazolin) のそれと比較した。

使用した赤血球サンプルやクームス試薬、あるいは検定術式によって若干変動するが、Cefamandole は 20~40 mg/ml の濃度でクームス反応を陽性化させることが多かった。

この作用は、Cephalothin (通常 5 mg/ml 前後で陽性化を示す) と、Cefazolin (40 mg/ml またはそれ以上を要する) との中間に位し、Penicillin G のそれとはほぼ同程度であると評価される。

緒 言

β -ラクタム抗生物質には、*in vitro* クームス反応を陽性化させるものがある。この反応は、血清蛋白質が非特異的に赤血球表面に結合し、そこへクームス試薬が添加されることにより生じるものである。血清蛋白質の赤血球への結合様式としては、薬剤が赤血球へ結合したあと薬剤分子に血清蛋白質が結合すること¹⁾、薬剤の作用を受けた血球表面に蛋白質が直接結合すること²⁾、あるいは、薬剤と蛋白質の複合体が血球表面に結合すること³⁾等が考えられている。いずれにせよ、この反応には薬剤に対する特異抗体は必要でなく、いわゆる、薬剤の過敏性副作用とは直接的な関連性はないとも言える。しかし、新しい抗生物質のより安全な臨床使用を期すため、その特殊毒性の1つとして、クームス反応陽性化作用についても検定を行なうことが望ましい。本報では、Cefamandole sodium (CMD) の作用を、ヒトとマウスの赤血球を用いて検定した結果を報告する。

材料および方法

1. マウス赤血球のクームス反応

(1) 材料

JCL:ICR マウス (6~8 週令, ♀) の血液を用いた。採血は抗凝固剤を含む注射筒を使い、心臓穿刺によって行なった。抗凝固剤として ALSEVER 液を用いる場合は、ALSEVER 液と等量の血液を採り、ヘパリンを用いる場合はヘパリン注射液 (5,000 単位/ml, 武田薬品) で内面を湿らせた注射筒で採血した。ヘパリン加血液には等量の Phosphate buffered saline (PBS, pH 6.8) を加えて、ALSEVER 液の場合と同じ液量になるようにした。通常、3 匹のマウスの血液をプールして使用した。薬剤としては、CMD と 3 種の対照薬物——Penicillin G (PCG, 日本化薬), Cephalothin (CET, 塩野義, ケフリン) および Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品, セファメジン®)——を使用し、クームス試薬としてはウサギ抗マウスグロブリン血清 (生化学工業, 10 倍希釈液) を

使用した。

(2) クームス反応の術式

MOLTHAN らの方法⁴⁾と宮川らの方法⁵⁾に準じて検定を行なった。

(i) MOLTHAN 法: 抗凝固剤で凝固を阻止した血液 0.2 ml に、PBS に溶かした各薬剤溶液 (最高濃度を 80 mg/ml とし、以下、2 倍段階希釈した) 0.2 ml を加え、37°C にて 3 時間インキュベートした。その後、PBS で 3 回洗滌し、最後に PBS を加えて 1.5% 赤血球懸濁液を調製した。その 0.1 ml を小試験管に分注し、クームス試薬 0.1 ml を加えてよく攪拌したあと室温にて一夜静置し、凝集を起こす各薬剤の最低濃度を求めた。なお、対照として、薬剤処理しない血球にクームス試薬を添加した管、および薬剤処理した血球に正常ウサギ血清の 10 倍希釈液を添加した管を置いた。

(ii) 宮川法: ヘパリン液で湿らせた注射筒で採血し、血液の 1.5 倍量の PBS を加えたあと遠心分離によって血球と血漿 (4 倍に薄まっている) に分けた。血球を 3 回洗滌した後、血液の 2 倍量の液量に戻した。この懸濁液 0.2 ml に薬剤溶液 0.2 ml を加え、37°C にて 3 時間インキュベートした。その後、3 回洗滌して薬剤を除いたあと、PBS 0.2 ml を添加して再懸濁させ、さきに分離しておいた血漿 0.2 ml を添加し、再び 37°C にて 3 時間のインキュベーションを行ない、赤血球と血漿蛋白質を反応させた。次に PBS で 3 回洗滌して過剰の蛋白質を除去し、PBS を加えて赤血球の 1.5% 懸濁液を調製した。こうして、赤血球: 薬剤の比率や赤血球: 蛋白質の比率が MOLTHAN 法におけるとほぼ同様になるように調整した。この赤血球懸濁液 0.1 ml にクームス試薬 0.1 ml を加えて凝集の有無を観察した。

2. ヒト赤血球のクームス反応

O 型の血球 (Y.N., M.T., O.S., S.T.) と A 型の血

球 (M.H., H.N.) を用いた。クームス試薬としては、オルソー、ミドリ十字、国際試薬、および武田薬品の4つのメーカーのものを使用した。採血法やクームス反応の術式はマウスの赤血球の場合と同様である。

実験結果

1. マウス赤血球のクームス反応

まず、抗凝固剤によって結果が異なるかどうかをMOLTHAN法でしらべてみた。Table 1に示したように、CETについてもCMDについても、ALSEVER液を使用する方がヘパリンを用いるよりクームス反応が若干強く出る傾向が観察されたが、大きな差にはならなかった。

そこで、ヘパリン加血液を使用して、4種の薬剤の作用を比較した。MOLTHAN法においても、宮川法においても、作用の強さは、CET>CMD>PCG>CEZの順であった (Table 2)。

2. ヒト赤血球のクームス反応

ヒト赤血球のクームス反応は、血球サンプルやクームス試薬によって多少の変動がみられるが、その差は小さく、比較的安定した結果が得られた。Table 3および4に示したように、ヘパリン添加血液の場合も、ALSEVER液添加血液の場合も、MOLTHAN法でしらべると、CETの作用が最も強く、CEZの作用が最も弱かった。CMDとPCGはそれらの中間で、ある場合はCMDがわずかにPCGより強く、またある場合はその逆になり、さらに、ある血球サンプルでは両者はほぼ等しい作用を認めた。

これらの結果を総括すると、CET>CMD≒PCG>CEZの順で作用が強いと結論してもよからう。なお、抗凝固剤としてヘパリンを使用した場合と、ALSEVER液を使用した場合の差は明瞭ではなかった。これらの結果は、

Table 1 Activities of CET and CMD to induce direct COOMBS' reaction in the mouse blood containing different anti-coagulants

Antibiotics ¹⁾		COOMBS' reaction ²⁾ of the blood with	
		Heparin	ALSEVER's solution
CET	20 mg/ml	+	+
	10	+	+
	5	+	+
	2.5	±	+
	1.25	—	±
	0.63	—	—
CMD	40 mg/ml	+	+
	20	±	+
	10	—	±
	5	—	—
	2.5	—	—
	1.25	—	—

1) Final concentration

2) Assayed by means of MOLTHAN's method

Table 2 The activities of the four antibiotics to induce COOMBS' reaction in the mouse blood assayed by means of MOLTHAN's and MIYAGAWA's methods

Antibiotics	Minimal essential drug concentration	
	MOLTHAN's method	MIYAGAWA's method
CET	2.5 mg/ml	2.5 mg/ml
CMD	20	20
CEZ	> 40	> 40
PCG	40	40

Heparin was used as the anticoagulant.

Table 3 The minimal essential concentration of the four antibiotics to induce COOMBS' reaction in the human blood assayed by MOLTHAN's method

Antibiotics	COOMBS' reagent	Heparinized blood				Blood with ELSEVER's soln.	
		Type 0 (O.S.)	Type 0 (S.T.)	Type 0 (Y.N.)	Type A (M.H.)	Type 0 (O.S.)	Type 0 (S.T.)
CET	A	5 mg/ml	—	5 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	—
	B	10	5	5	10	10	2.5
	C	20	10	10	10	10	10
	D	—	—	5	5	—	—
CMD	A	>40	—	>40	40	40	—
	B	>40	>40	>40	40	40	40
	C	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	D	—	—	40	40	—	—
CEZ	A	>40	—	>40	>40	>40	—
	B	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	C	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	D	—	—	>40	>40	—	—
PCG	A	40	—	20	40	20	—
	B	40	40	20	40	40	10
	C	40	>40	20	40	40	>40
	D	—	—	20	40	—	—

COOMBS' reagent: A; Ortho, B; Midori-Juji, C; Kokusai-shiyaku, D; Takeda

Table 4 Comparison of the two assay methods with the human heparinized blood

Antibiotics	COOMBS' reagent	MOLTHAN's method		MIYAGAWA's method	
		Type 0 (M.T.)	Type A (H.N.)	Type 0 (M.T.)	Type A (H.N.)
CET	A	5 mg/ml	2.5 mg/ml	2.5 mg/ml	2.5 mg/ml
	B	5	5	2.5	2.5
	C	5	2.5	5	5
	D	5	2.5	2.5	2.5
CMD	A	20	10	20	40
	B	20	10	40	>40
	C	20	10	40	>40
	D	20	10	40	40
CEZ	A	>40	>40	20	40
	B	>40	>40	20	>40
	C	>40	>40	40	>40
	D	>40	>40	40	40
PCG	A	40	40	>40	>40
	B	40	20	>40	>40
	C	40	40	>40	>40
	D	40	40	>40	>40

前述のマウスの赤血球について得られた成績と概ね一致する。

宮川法での検定結果を、同一血液サンプルについてのMOLTHAN法による結果と併せて、Table 4に示した。宮川法においても作用の最も強い薬剤はCETであり、その用量作用関係もMOLTHAN法と変わりがなかった。他の3つの薬剤に関してはMOLTHAN法と幾分異なった結果を得た。すなわち、CMDとPCGについては、宮川法でしらべる方が反応が多少弱くなり、CEZに関しては、逆に、若干強くなる傾向があった。

考 察

β-ラクタム抗生物質の*in vitro* クームス反応に影響を与える要因としては、赤血球の種類(動物種や血液型等)、抗凝固剤の種類、検定術式、クームス試薬等が考えられる⁹⁾。ことに、ヒト赤血球のクームス反応ではク

ームス試薬による変動はかなり大きいとされている⁹⁾。本報の実験結果でも、これらの要因による多少の変動が観察されている。例えば、宮川法によるCMD、CEZ、PCGの作用がMOLTHAN法による検定結果と僅かながら相違していた。この相違の原因は明らかでないが、血漿蛋白質の赤血球への結合が、CMDやPCGの存在下では非存在下よりも起こり易く、CEZについては薬剤の存在下の方が起こり難いということによるのかもしれない。しかし、この差異は小さく、余り問題視する必要はないように思われる。また、クームス試薬による変動もみとめられるが、本実験ではその差も小さく、たとえ差があっても、薬剤濃度の1希積分の差でしかないことが多かった。これらのことを考えると、今後、類似の抗生物質のクームス反応陽性化作用をみる場合、ヘパリン加ヒト血液を材料とし、手順の簡単なMOLTHAN法に

よる検定を行なうだけでその薬物の作用を概略的に評価し得ると判断される。

CMD の作用は CET に比べればかなり低い、PCG のそれと比肩される程度であることが示された。こうした *in vitro* での作用が、*in vivo* でも発現されるのかどうかについての検討は行なっていないが、次のような理由から否定的にならざるを得ない。すなわち、作用の最も強い CET についてしらべた我々の予備検討によると、陽性反応を得るには、MOLTHAN 法の場合、血液と薬剤のインキュベーション時間を 3 時間とする必要があり、それ以下では不十分であった。宮川法における赤血球と薬剤との第一次インキュベーションも、赤血球と血漿の第二次インキュベーションも、やはり 3 時間ずつ行なうことが必要であった。一方、CET を静注した場合、血中の薬剤濃度の半減期はわずか 10 数分間であるといわれる⁹⁾。したがって、CET をかなり大量に静注しても、排泄が速く、クームス反応を陽性化するのに必要な濃度、すなわち、2.5~5 mg/ml を 3 時間も維持するということは困難であろう。CET より作用の弱い CMD では、より高い濃度を保たねばならないことになり、結局、*in vivo* では *in vitro* と同じような状態は起こり得ないのではなかろうかと推察される。また、仮に *in vivo* において赤血球に自己蛋白質が結合したとしても、それが何らかの症状につながるかどうかは疑問である。というのは、通常、生体には自己蛋白質に対する抗体が備わっていると考え難いからである。このように考えると、*in vitro* において見出された CMD のクームス反応の生物学的意義は明白でない。しかし、自己蛋白質と反応する抗体をもつ自己免疫疾患においては、赤血球の凝集や溶解などの副作用の原因になり得るかもしれない。

い。また、ある薬剤が自己物質と結合することで自己物質の異物化が起こり、自己免疫性の副作用を呈することも知られている⁶⁻⁷⁾が、 β -ラクタム抗生物質と自己赤血球あるいは自己蛋白との結合についても同様のことが起こらないとも限らない。今後、これらの薬物による *in vitro* 直接クームス反応の生物学的意義を検討する基礎的な研究が必要ではないかと考える。

謝 辞

本実験を行なうにあたり、塩野義研究所 西本宏史氏に技術面で御協力を賜った。心から謝意を述べたい。

文 献

- 1) 峯 靖弘：セファロsporin C 抗生物質の免疫学的研究
特に Cefazolin の免疫学的特性について。アレルギー 20: 798~808, 1971
- 2) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct COOMBS' test due to cephalothin. New Eng. J. Med. 277: 123~126, 1967
- 3) 宮川千恵子, 田沢房子, 峯島博子, 小酒井 望：セファロsporin 剤による直接クームス試験陽性に関する基礎的研究。Chemotherapy 18: 497~500, 1970
- 4) 吉田 正：Personal communication
- 5) WORLLEDGE, S. M.; K. C. CARSTAIRS & J. V. DACIE: Auto-immune hemolytic anemia associated with α -methyl dopa therapy. Lancet 2: 135~139, 1966
- 6) HAMILTON, M.; G. C. JENKINS & A. L. TURNBULL: Methyl dopa and hemolytic anemia. Lancet 2: 549, 1966
- 7) HOFFMAN, D. R. & D. H. CAMPBELL: Model systems for the study of drug hypersensitivity. II. Studies on the acetylation mechanism for aspirin intolerance. J. Immunol. 104: 582~584, 1970

ACTIVITY OF CEFAMANDOLE TO PRODUCE *IN VITRO* COOMBS' REACTION

MINORU HARADA and MITSUO TAKEUCHI

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

The activity of cefamandole (CMD) to produce *in vitro* Coombs' reaction was compared with those of penicillin G (PCG), cephalothin (CET) and cefazolin (CEZ). CMD produced the positive reaction at the concentration of 20 or 40 mg/ml in most experiments, though some variation was observed depending on the blood samples, anticoagulants, Coombs' reagents and assay methods. The activity of CMD was comparable with that of PCG and ranked between CET and CEZ with the most potent and meager activity respectively.