免疫性溶血性貧血に関する研究

第二報 In vitro における抗グロブリン試験におよぼす 薬剤の影響に関する研究

藤 本 秀 江

東北大学医学部附属病院中央検査部 (主任教授 福岡良男)

(昭和55年 8 月 7 日 受付)

STUDIES ON THE IMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA

II. *In Vitro* Studies on the Association of Positive Antiglobulin Reactions and the Red Cell Membrane Alterations by Drugs

Hidee Fujimoto

Central Clinical Laboratories, Tohoku University School of Medicine

(Director: Professor Yoshio Fukuoka)

It is well known that the therapeutic drugs such as α -methyldopa, penicillins and cephalosporins may elicit the positive direct antiglobulin test. But the immunopathologic mechanisms for the positive direct antiglobulin test following the administration of cephalosporins have not been clear yet. It has been suggested that the immune response develops due to adsorption of serum proteins to the red cell membranes affected by cephalosporins.

In vitro studies was performed covering the three aspects of the antiglobulin reactions observed by drug-coated red cells: (1) the minimum concentration sufficient to give a positive direct antiglobulin test, (2) the nature of the serum proteins adsorbed onto the red cell membranes, and (3) the intensity of the agglutination of cephalosporin-coated red cells with normal serum applied was tested by the method of antiglobulin test.

1) The minimum concentration of five kinds of cephalosporins which gave a positive antiglobulin test was from 1.67 (*cephalothin*) to 40 mg/ml (*cefotiam*). The intensity of the positive direct antiglobulin test was dependent upon the concentration of cephalosporins employed. On the other hand, penicillins and α -methyldopa employed, no positive direct antiglobulin test was observed. Therefore, no adsorption of serum proteins onto the red cell membranes coated by the above mentioned two drugs might be suspected.

The mechanisms of the positive direct antiglobulin tests with cephalosporins were considered to be different from those of penicillins and α -methyldopa *in vitro*.

2) No specificity of immuglobulin class could be detected in the serum proteins adsorbed onto the cephalosporin-coated red cell membranes.

3) The wide range of intensity of positive antiglobulin reactions was largely influenced not by the cephalosporin-coated red cells but by the individual serum used in the test.

The immunopathological mechanisms of this phenomenon might be considered to be nonspecific adsorption of the serum proteins onto the red cell membranes altered by cephalosporins. However, *in vitro* studies suggested the possibilities of existence of cross-reacting antibodies and specific antibodies to that drugs in the sera of normal population.

はじめに

ある種の薬剤の投与により直接抗グロブリン試験が陽性化し、しばしば溶血性貧血をおこすことから、薬剤による直接抗グロブリン試験陽性化の機序を究明することは、臨床的に、重要となって来た。

直接抗グロブリン試験陽性化を惹起する薬剤として最も知られているのは、 α -methyldopa と penicillins であるが、最近臨床的に繁用されている cephalosporin 系薬剤も直接抗グロブリン試験陽性化を来す薬剤として知られている。著者は、これら薬剤による直接抗グロブリン試験陽性化の機序を究明するため *in vitro* にて実験を試みた。

実験方法

実験材料

15例の健常人脱線維素血および血清を用い、*in vitro* における薬剤による赤血球の膜変化についてモデル実験を試みた。

使用抗血清

1) 広域スペクトラムの抗グロブリン血清は、Ortho 社、Dade 社、東京大学医科学研究所松橋直教授より分与されたもの、および臼井らの方法¹⁾による自家製のものを使用した。

2) 抗 IgG, 抗 IgA, 抗 IgM, 抗 C3・C4 などの特異抗グロブリン血清は、ヘキスト社、東京大学医科学研究所松橋直教授より分与されたもの、および臼井らの方法¹⁾による自家製のものを使用した。

3) 薬剤による赤血球膜の抗原性の変化の有無を知る目的の1つとして、MNSs 式の赤血球抗原の変化を、抗M, 抗N, 抗S, 抗s (Ortho 社) の抗血清を用いて検討した。

使用薬剤

α -methyldopa, penicillins (sulbenicillin, peni-

cillin G), Cephalosporins (cefotiam, cefazolin, cephalothin, cephaloridin, SCE-129) を用いた。

術式

被検血液として Dacie の方法²⁾により作製した健常人の脱線維素血をヘマトクリット値45%に調整したものと、脱線維素血を生理食塩液にて4回洗浄し、ヘマトクリット値45%に調整した赤血球の生理食塩液浮遊液を使用した。これら2種類の被検血液と最終濃度を、40, 30, 20, 15, 7.5, 5.0, 3.33, 1.67, 0.66, 0.33, 0.16mg/dl となるように調整した各種薬剤とを混合し、37°C 3時間反応させた。

血清学的検査

上記の赤血球を十分洗浄後直接抗グロブリン試験を行ない、その陽性の強さを肉眼的に凝集の強さにより1+〜3+に分けて判定した³⁾。

特異抗血清による直接抗グロブリン試験によって、赤血球膜に付着しているタンパクの性状を検査した。

脱線維素血を洗浄し、生理食塩液浮遊液とした血球を上記の各種薬剤とを反応させのち、これを健康人血清の生理食塩液希釈列に加え、間接抗グロブリン試験と同様に、37°C 1〜2時間反応させた後の抗グロブリン試験を行ない、その陽性の強さを検討した。

薬剤による赤血球膜抗原の変化の有無を血液型 MNSs 式について検討した。

Cephalosporin 系薬剤による赤血球膜の変性について、Ham 試験⁴⁾、砂糖水試験⁵⁾にて検討した。

実験結果

1. Cephalosporin 系薬剤 (cefotiam, cefazolin, cephalothin, cephaloridin, SCE-129) の各々と6例の健常人脱線維素血とを反応させた場合の直接抗グロブリン試験陽性化について (表1)。

表1 直接抗グロブリン試験陽性化に要する薬剤の最少濃度

Cephalosporin (mg/ml)	抗グロブリン血清		
	Ortho	Kokusai	Dade
Cefotiam	40		
Cefazolin	30~		30~
Cephalothin	1.67~ 3.33	3.33~ 7.50	1.67~ 7.50
Cephaloridin	1.67~ 7.50	1.67~ 7.50	1.67~15.00
SCE-129	1.67~15.00	7.50~30.00	3.33~20.00
Penicillins (Sulbenicillin, Penicillin G): (-)			
α -methyldopa: (-)			

(N=6)

Cefotiam は40mg/ml で2例 (Ortho 社抗グロブリン血清) のみ陽性化した。Cefazolin は最少陽性濃度はいずれも30mg/ml で、Ortho 社抗グロブリン血清で1例、Dade 社抗グロブリン血清で2例陽性化した。Cephalothin による直接抗グロブリン試験陽性化が最も強く、最少陽性濃度は、Ortho社、Dade 社の各抗グロブリン血清で1.67mg/mlであり、高濃度になるにつれて陽性反応の強さも増加した。Cephaloridin の場合は、cephalothin と比較すると、やや陽性化の度合いが弱いようであったが、陽性最少濃度は1.67mg/ml と同じであった。SCE-129の陽性最少濃度も1.67mg/mlであったが、cephalothin や cephaloridin に比較して、陽性化の度合いが弱いようであった。Sulbenicillin, penicillin G, α -methyldopa の薬剤では全例陰性であった。以上の結果、cephalosporin 系薬剤の中では cephalothin が直接抗グロブリン試験を陽性化する作用が最も強く、かつ dose dependent で、penicillin 系薬剤や α -methyldopa などの薬剤の場合は全例陽性化しなかった。このように直接抗グロブリン試験陽性化の機序が、in vitro においても、各々異なることが示唆された。

2. Cephalosporin 系薬剤 (cephalothin, cephaloridine) による直接抗グロブリン試験陽性化に関与する赤血球膜上のタンパクの性状について (表2)。

検査し得たかぎりでは、殆んどの特異抗血清と反応し、明らかな特異性は見出し得なかった。

表2 Cephalosporin処理赤血球膜の吸着血清タンパクの性状

Cephalosporin	被検血球	直接抗グロブリン試験			
		抗IgG	抗IgA	抗IgM	抗C3・C4
Cephalothin (20mg/ml)	1	3+	3+	3+	+
	2	3+	3+	3+	+
Cephaloridin (20mg/ml)	1	2+			+
	2	+			+
	3	+			-
	4	+			-

3. 脱線維素血を洗滌し、生理食塩液浮遊液とした被検血球と薬剤とを同じように反応させた場合の直接抗グロブリン試験は、cephalosporins, penicillins, α -methyldopa のいずれの薬剤も全例陰性であった。

4. 洗浄血球を薬剤と反応させた後に健常人血清の生理食塩液希釈列と反応させた血球の抗グロブリン試験について (表3, 4)

Cephaloridin (50mg/ml) と反応させた A, B, C 3例の血球を No. 1~8 の8例の健常人血清の生理食塩液希釈列と反応させたところ、いずれも抗グロブリン試験が陽性化した。A, B, C 3例の血球の抗グロブリン試験の反応の強さには殆んど差異が認められなかったが、No. 1~8例の血清による抗グロブリン試験の陽性の強さは血清によって差が認められた。

Cephalothin (20mg/ml) と反応させた C, D, E 3例の血球を No. 9~15の7例の健常人血清の生理食塩液希釈列と反応させた場合も、いずれも抗グロブリン試験が陽性化した。C, D, E 3例の血球の抗グロブリン試験の反応の強さには殆んど差異が認められなかったが、No. 9~15の7例の血清による抗グロブリン試験の陽性の強さは血清によって差が認められ、また、cephaloridin より cephalothin の方が抗グロブリン試験の強さがより顕著と思われた。

Sulbenicillin と penicillin G についても同様の実験を行なったが、陽性例は得られなかった。

5. 薬剤による赤血球膜抗原性の変化について血液型 MNSs 式について検討したが、変化は

表3 Cephaloridin 処理赤血球の抗グロブリン試験における健常人血清の影響

赤血球 血清希 被検血清	A				B				C			
	×1	×2	×4	×8	×1	×2	×4	×8	×1	×2	×4	×8
1	2+	2+	+	—	2+	+	—	—	2+	+	+	—
2	+	+	—	—	+	—	—	—	2+	+	—	—
3	2+	+	—	—	2+	+	—	—	3+	2+	+	—
4	2+	+	—	—	2+	+	—	—	2+	+	—	—
5	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
6	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
7	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
8	2+	2+	+	—	2+	+	+	—	3+	2+	+	—

(Cephaloridin : 50 mg/ml)

表4 Cephalothin 処理赤血球の抗グロブリン試験における健常人血清の影響

赤血球 血清希 被検血清	C				D				E			
	×16	×32	×64	×128	×16	×32	×64	×128	×16	×32	×64	×128
9	+	+	+	—	2+	+	+	—	+	+	+	—
10	2+	2+	+	—	2+	+	+	+	2+	2+	+	+
11	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
12	2+	+	+	+	3+	2+	2+	+	3+	2+	2+	+
13	2+	+	+	—	2+	+	—	—	+	—	—	—
14	3+	2+	+	+	3+	3+	2+	+	3+	2+	—	—
15	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—

(Cephalothin : 20 mg/ml)

認められなかった。

6. Cephalosporin 系ならびに penicillin 系薬剤について、Ham 試験、砂糖水試験を行なったが、陽性例は得られなかった。

考 案

薬剤による赤血球の免疫学的障害は、その機序より4つの type に分類されている⁶⁾⁷⁾。

1) 薬剤投与によりそれに対する抗体が産生され、その抗体と対応する薬剤を投与した場合、immune complex が生じ、これが非特異的にヒト赤血球に付着し、補体系が活性化され溶血する。

2) Hapten の性質を持っている薬剤が、赤血球の膜タンパクと結合し、それに対応する抗体が

産生され、その薬剤の再投与により赤血球膜に結合した薬剤と抗体が反応し、その結果網内系にて破壊される。

3) 薬剤 (cephalosporins) 投与により赤血球膜が変化し、自己血清タンパクが非特異的に吸着し、直接抗グロブリン試験が陽性化する。しかし、その溶血の機序は多くの報告があるにもかかわらず明確にはされていない。

4) 薬剤により赤血球自己抗体が産生され自己免疫性溶血性貧血がおこる。

1954年の Stibophen (Fuadin) の報告以来各種の薬剤による免疫溶血性貧血が知られるようになった⁸⁾。これらの薬剤の中で貧血の発生機序が不

明な cephalosporin 系薬剤と、 α -methyldopa について直接抗グロブリン試験を中心に赤血球膜変化について実験を行なった。

Cephalosporin 系薬剤と脱線維素血とを反応させた場合の直接抗グロブリン試験は cefotiam (40 mg/ml) で6例中2例陽性、cefazolin は最少陽性濃度はいずれも 30mg/ml で Ortho 社の抗グロブリン血清で2例、Dade 社の抗グロブリン血清で2例が陽性化した。Cephalothin による直接抗グロブリン試験陽性化が最も強く、1.67mg/ml で、Ortho 社と Dade 社の抗グロブリン血清で陽性化し、濃度に応じて強さも増加した。Cephaloridin と SCE-129 の最少陽性濃度は1.67mg/ml であったが、cephalothin よりやや陽性の度合いは弱かった。Cephalosporin 系の薬剤の種類により直接抗グロブリン試験陽性化が異なり、かつ dose dependent であった。

Penicillin 系薬剤、 α -methyldopa では全例直接抗グロブリン試験は陰性で、cephalosporin 系薬剤との直接抗グロブリン試験陽性化の機序は明らかに異なるといえる。

Cephalosporin 系薬剤による直接抗グロブリン試験陽性化に関与する血清タンパクは殆んどの特異抗グロブリン血清と反応し、IgG, IgA, IgM, C3・C4 が非特異的に吸着することが明らかである。しかし、その他の血清タンパク成分については、特異的な抗グロブリン血清の精製ならびに入手が困難なために明らかにすることが出来なかった。

洗浄血球と薬剤とを反応させた場合の直接抗グロブリン試験は、cephalosporin 系、penicillin 系、 α -methyldopa の薬剤とも全例陰性であり、膜に変化がおきても吸着するタンパクがないためと考えられる。

洗浄血球と cephaloridin (50mg/ml) を反応させた血球3例と8例の健常人血清の生理食塩液希釈列を37°C 2時間反応させた後に抗グロブリン試験を行なったところ、陽性化した。使用した血球間には陽性の強さの差がみられなかったが、使用した血清によって陽性の強さは明らかに異なる結

果が得られた。同時に cephalothin (20mg/ml) の場合も陽性化し、血球による差はみられないが、血清による陽性の強さは cephaloridin よりも顕著と思われた。従って cephalosporin 系薬剤により赤血球膜に単に血清タンパク成分が非特異的に吸着するのみではなく、cephalosporin 系薬剤と交差反応を示す抗体あるいは cephalosporin 系薬剤に対する特異的な抗体の存在の可能性も否定出来ないと思われる。

薬剤により赤血球膜抗原の変化の有無を検索したが、MNSs 式血液型に関するかぎり変化はなかった。

Cephalothin と健常人の赤血球とを in vitro で反応させると、赤血球の acetylcholine esterase 活性の低下や、発作性夜間血色素尿症の患者赤血球と同様に Ham 試験が陽性となるという報告⁹⁾¹⁰⁾があるが著者の実験では Ham test, sugar water test いずれも陰性であり、cephalosporin 処理による発作性夜間血色素尿症様の血球膜の変化は得られなかった。

まとめ

健常人赤血球膜に及ぼす薬剤の影響を cephalosporin 系、penicillin 系および α -methyldopa の薬剤について、抗グロブリン試験を用いて検討した。

1) Cephalosporin 系薬剤の種類により、直接抗グロブリン試験の陽性化が異なり、かつ、dose dependent であった。

2) Cephalosporin 系薬剤と penicillin 系薬剤や α -methyldopa とは in vitro において直接抗グロブリン試験の陽性化の機序が明らかに異なるといえる。

3) Cephalosporin 系薬剤による直接抗グロブリン試験陽性化の機序は、IgG, IgA, IgM 等の血清タンパク成分の非特異的吸着によることは明らかであるが、単に吸着するのみでなく、cephalosporin 系薬剤と交差反応を示す抗体あるいはそれに対する特異的な抗体の存在の可能性も示唆された。

4) 薬剤による MNSs 式の血液型抗原性には

変化がなかった。

5) Cephalosporin 系薬剤によって発作性夜間血色素尿症様の赤血球の膜変化を造ることは出来なかった。

文 献

- 1) 臼井美津子, 成内秀雄, 松橋 直: ヒト免疫グロブリンに対する抗体のつくり方. 医化学実験法講座4, 免疫化学 (石田俊介 編集), 東京, 中山書店, 1972, p. 51—63.
- 2) Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: Practical Haematology, 5. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1975, p. 603.
- 3) 福岡良男: 免疫血清学的検査, 免疫学叢書 10, 免疫血液病 (畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直編集), 東京, 医学書院, 1972, p. 27—66.
- 4) Dacie, J.V. and Lewis, S.M.: Practical Haematology, 5. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1975, p. 305—307.
- 5) Hartman, R.C. and Jenkins, D.E. Jr.: The

sugar water test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New Engl. J. Med.*, 275: 155, 1966.

- 6) Garratty, G. and Petz, L.D.: Drug-induced hemolytic anemia. *Am. J. Med.*, 58: 398—407, 1975.
- 7) Worlledge, S.M.: Immune drug-induced hemolytic anemias. *Semin. Hemat.*, 10: 327—343, 1973.
- 8) 高橋芳右, 塚田恒安: 急性血管内溶血および急性腎不全を伴ったトリウムテレンによる免疫性溶血性貧血. *臨床血液*, 20: 965—977, 1979.
- 9) Ferrone, S., Zanella, A. and Scalapogno, M.: Red cell metabolism in positive direct coombs test after cephalothin therapy. *Experientia*, 27: 194—195, 1971.
- 10) Sirchia, G., Mercuriali, F. and Ferrone, S.: Cephalothin-treated normal red cells: A new type of PNH-like cells. *Experientia*, 24: 495—496, 1968.