

Cefazolin の抗原性に関する研究

Benzylpenicillin, Ampicillin および Cephaloridine との免疫学的交叉性ならびに Direct antiglobulin test について

峯 靖弘・西田 実

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

五島 瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

新しい Cephalosporin 誘導体, Cefazolin は Cephalosporin 母核の 3 位および 7 位にユニークな側鎖構造をもち, 抗菌活性および吸収排泄の面で, 市販の Cephalosporin とはある程度異なつた特性をもっている^{1,2,3}。

本報では, この物質の抗原性について検討を加えたので, これについて報告する。

実験材料および実験方法

(1) Cefazolin タンパク結合物の調製法

Cefazolin 200 mg とウサギ血清アルブミン (RSA) 50 mg (またはウソ血清 γ -グロブリン (BGG) 50 mg) を 5 ml の Veronal buffer (pH 8.5) に溶解し, 1N NaOH で pH 8.5~11.0 に修正しながら 37°C, 24 時間 incubate する。これを pH 8.0 の生理食塩水で 6 日間, 4°C で透析した後, 未反応の Cefazolin を除去したものを抗原として使用した。Benzylpenicillin, Ampicillin および Cephaloridine も同様に調製した。

(2) 免疫方法と抗血清の作成

抗原 (RSA・結合物) と Freund's Complete adjuvant を等量加え, emulsion にしたものを, 白色ウサギ (体重 2.0~2.3 kg) の筋肉, 腹部皮下, 背皮下に感作して得られた血清を抗体として使用した。

(3) 赤血球凝集反応

LEY 等⁴⁾の方法に従い, 各抗生物質の 120 mg を含む ALSEVRS 溶液 4 ml に等量のウサギ血液を加え, 37°C, 1 時間 incubation した後, 遠心分離した。沈渣の赤血球を生理食塩水で洗浄し, 生理食塩水に 2% 浮遊液にした感作血球を抗原とした。各抗血清を生理食塩水で 0.3 ml の 2 倍希釈系列を作り, その各々に感作血球を 1 滴加え, 37°C, 2 時間 incubation した後, 更に 4°C, 20 時間静置した。これを鏡検で凝集を観察して, 凝集を示す抗血清の最大希釈倍数を, 交叉性の凝集力価として表わした。

(4) 血球凝集阻止反応

種々のハプテンを 500 mM/ml になるように生理食塩水 (pH 7.0) に溶解し, 0.5 ml ずつの 2 倍希釈系列を作る。その各々に, 4 単位の抗血清 0.5 ml を加え, 37°C, 2 時間 incubate した後, その反応混合液の 0.3 ml に, 抗体と homologous な感作血球 1 滴を加えた。以降, 血球凝集反応と同様に処理した。血球凝集反応を 100% 阻止するに必要な最小ハプテン濃度でもつて交叉性を表わした。

(5) 定量沈降ハプテン阻止反応

通常の方法で定量沈降反応により当量域となる抗原 (BGG・結合物), 抗体量を決定した。ハプテンを 200 mM/ml になるように冷食塩加リン酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し, 0.4 ml ずつの適当な希釈系列を作つた。その各々に抗血清 0.5 ml を加え, 4°C, 20 時間 incubate した後, あらかじめ決定した抗原量を加え, 更に 4°C, 48 時間 incubate した。これを 3000 r. p. m. 20 分, 4°C 遠心分離し, 沈降タンパクを冷食塩加リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後, 沈降タンパク量を FOLIN-CILOCALTEAU 法⁵⁾により測定した。各抗体に対するハプテン相互の阻止力を比較する為, 沈降反応を 50% 阻止するに必要なハプテン濃度で表わした。

(6) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応

OVARY の方法⁶⁾に従い, 1 群 5 匹のモルモットの背部皮下に 3 種の抗血清と対照の生理食塩水を接種し, 18 時間後抗原 (BGG・結合物) と Evans blue を足静脈に注射した。30 分後に Evans blue 色素斑の直径を測定した。また原田等⁷⁾の方法に従い, 色素抽出し, その色素量で相互の交叉性を比較した。

(7) 試験管内直接クームス試験

(Direct antiglobulin test)

MOLTHAN 等⁸⁾の方法に従い試験管内クームス反応を検討した。生理食塩水に溶解した種々の濃度の Cefazolin 1 ml に血液凝固阻止剤を加えた "O" 型血液 (正常人) を

等量加え、37°C、3時間 incubate した後遠心分離した。沈渣の赤血球を多量の生理食塩水で洗浄し、血清成分を除去した後、生理食塩水で2%浮遊液とした。その各々1滴にクームス試薬を加え、凝集の有無を観察した。他の抗生物質についても同様の方法で行なった。また各抗生物質の試験管内クームス陽性度をクームス試薬の製品(ミドリ十字, Ortho, 武田クームス試薬)による違い、ならびに抗凝固剤(ALSEVEN's 溶液および EDTA 溶液)の影響についても検討した。

実験結果

(1) 赤血球凝集反応

表1に示すように、Cefazolin はタンパクと結合して Cephaloridine および Benzyl penicillin と同様に、血球凝集抗体を産生し、且つ各抗体に対して免疫学的交差反応は、弱いながらも認められた。

(2) 赤血球凝集阻止反応

表2に示すように、Cefazolin は、抗 Benzyl penicillin 抗体および抗 Cephaloridine 抗体に対して凝集を100%阻止するためには、Benzyl penicillin および Cephaloridine ハプテンに比べ、かなり大量が要求され

ることから非常に交叉性が弱いことがわかる。また抗 Cefazolin 抗体に対しても Cefazolin ハプテンに比べ Cephaloridine および Benzyl penicillin ハプテンが大量に要求されることから、抗 Cefazolin 抗体に Benzyl penicillin および Cephaloridine は、交叉性が弱い。それに反して Benzyl penicillin と Cephaloridine の間にはかなり強い交叉性が認められた。

(3) 定量沈降ハプテン阻止反応

現在のペニシリンアレルギーの大半をしめると言われている抗 Benzyl penicillin 抗体と、Benzyl penicillin・BGG 抗原との沈降反応を50%阻止するに必要なハプテン濃度で、その交叉性を比較した。結果は図1および表3に示す。Benzyl penicillin ハプテンは、2.5 mM で最も強く、Cephaloridine は10mM で Benzyl penicillin の約1/4の阻止力、Ampicillin は32 mM で約1/13の阻止力を示した。一方、Cefazolin は85 mM で Benzyl penicillin の1/34と非常に弱い阻止力を示した。この結果から、Cefazolin は抗 Benzyl penicillin 抗体との交叉性は非常に弱かった。また同様に抗 Cephaloridine 抗体、抗 Ampicillin 抗体についても、Cefazolin は非常に弱い交叉性を示した。一方、抗 Cefazolin

表1 Cross reaction of hemagglutination of pooled rabbit antisera immunized with PC-G : RSA, CER : RSA & CEZ : RSA

Antigen Antibody	Serum Hemagglutinin Titers			
	PC-G Sensitized RBC	CER Sensitized RBC	CEZ Sensitized RBC	Unsensitized RBC
Anti-PC-G	×16	×8	×2	0
	×64	×16	×8	0
Anti-CER	×4	×16	×4	0
	×4	×32	×8	0
Anti-CEZ	×8	×4	×16	0
	×32	×8	×64	0

表2 Hapten concentrations required for 100% inhibition of hemagglutination

Antigen-Anti- body system	Hapten*		
	PC-G	CER	CEZ
PC-G	31.25	62.5	250
CER	0.024	0.012	12.5
CEZ	50	50	0.39

* Hapten concentrations are expressed as the lowest concentration in millimoles per milliliter which was required for 100% inhibition of hemagglutination.

抗体においても Benzyl penicillin, Cephaloridine および Ampicillin との交叉性は弱かった。

(4) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA 反応)

表4に示すように、PCA反応により抗 Benzyl penicillin 抗体に対し、Cephaloridine は58.7%の強い交叉性を認めたが、Cefazolin では認められなかつた。また抗 Cephaloridine 抗体に対して Benzyl penicillin は21.4%の交叉性を認めたが、Cefazolin では9.7%と非常に弱い交叉性が認められた。一方、抗 Cefazolin 抗体に対して Cephaloridine および Benzyl penicillin は交叉性を示さなかつた。

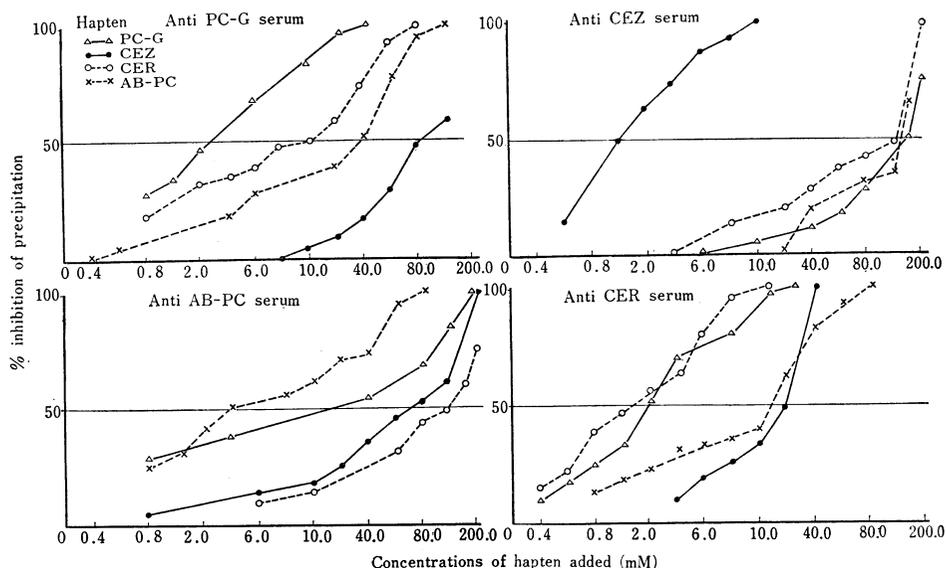


図1 Hapten inhibition of the precipitation of pooled rabbits antisera against PC-G, CER, AB-PC & CEZ-RSA conjugate by PC-G, CER, AB-PC & CEZ-BGG

表3 Hapten concentrations required for 50% inhibition of quantitative precipitin reaction against PC-G-, CER-, CEZ- & AB-PC-antiserum

Antigen-Anti-body system	Hapten (mM/ml)			
	PC-G	CEZ	CER	AB-PC
PC-G	2.5	85	10	32
CER	1.9	20	1.2	14
CEZ	150	1.1	100	125
AB-PC	15	64	115	3.8

表4 Cross reaction of passive cutaneous anaphylaxis of pooled rabbit antisera against PC-G, CER & CEZ

Antigen \ Antibody	Antigen	Antibody		
		PC-G:BGG	CER:BGG	CEZ:BGG
Anti-PC-G	Zone (mm)	37.3—33.6	26.2—23.9	—
	Evans (μ g)	46	27	—
	Cross rate(%)	100	58.7	0
Anti-CER	Zone (mm)	31.3—30.6	35.9—34.1	20.9—18.2
	Evans (μ g)	22	103	10
	Cross rate(%)	21.4	100	9.7
Anti-CEZ	Zone (mm)	—	—	24.5—21.3
	Evans (μ g)	—	—	19
	Cross rate(%)	0	0	100

Each value represents the average of five guinea pigs.

(5) 試験管内直接クームス試験

表5に示すように、血液凝固阻止剤およびクームス血清の種類により若干の差が認められるが、Cephalothinでは2.5 mg/ml, Benzyl penicillinで5 mg/ml, Cephaloridineで10 mg/ml濃度でクームス陽性を認めた。これに対し、Cefazolinでは20~40 mg/mlで、Orthoおよび武田クームス血清でのみ弱い陽性が認められた。これらの結果よりクームス陽性の強度は、Cephalothin > Benzyl-penicillin > Cephaloridine > Cefazolinの順に認められ、Cefazolinは非常に弱かった。

結 論

Cefazolinは、ペニシリンおよび他のセファロスポリン系抗生物質と同様、アルカリ条件でcarrier proteinと結合して特異沈降抗体、血球凝集抗体およびPCA抗体を産生する。一方、赤血球凝集反応および阻止反応、定量沈降ハプテン阻止反応およびPCA反応により、Benzyl penicillinとCephaloridineとは強い交叉性を示すのに対し、CefazolinのBenzyl-penicillinおよびCephaloridineとの交叉性は非常に弱い。さらに試験管内直接クームス試験で、Cephalothin,

表5 Direct antiglobulin test of antibiotic-coated human red blood cells

Antibiotic	Final conc. (mg/ml)	Coombs' reagents					
		Midori		Ortho		Takeda	
		Alsev.	EDTA	Alsev.	EDTA	Alsev.	EDTA
Cephalothin (CET)	40	++	++	+	+++	+++	+++
	20	++	++	+	++	++	++
	10	++	++	+	+	+	++
	5	+	+	±	+	±	+
	2.5	-	-	±	±	-	±
	1.25	-	-	-	-	-	-
Benzylpenicillin (PC-G)	40	+++	++	+	++	+	+
	20	++	++	+	+	±	+
	10	+	++	±	+	±	±
	5	-	-	-	±	±	±
	2.5	-	-	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-	-	-
Cephaloridine (CER)	40	++	++	+	++	+	±
	20	+	+	±	±	±	±
	10	±	-	±	±	±	±
	5	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-	-	-
Cefazolin (CEZ)	40	-	-	-	±	±	±
	20	-	-	-	±	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	2.5	-	-	-	-	-	-
	1.25	-	-	-	-	-	-

Benzyl penicillin および Cephaloridine は強く陽性を示すのに対し, Cefazolin は非常に弱い。

稿を終るに当り, 本実験に御援助をいただきました当研究所長, 中野博士および熊田部長に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) KARIYONE, K.; H. HARADA, M. KURITA & T. TAKANO: Cefazolin, a new semisynthetic Cephalosporin antibiotic. I. Synthesis and che-

mical properties of Cefazolin. J. Antibiotics 23: 131-136, 1970

- 2) NISHIDA, M.; T. MATSUBARA, T. MURAKAWA, Y. MINE, Y. YOKOTA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Cefazolin, a new semisynthetic Cephalosporin antibiotic. II. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity. J. Antibiotics 23: 137-148, 1970
- 3) NISHIDA, M.; T. MATSUBARA, T. MURAKAWA, Y. MINE, Y. YOKOTA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Cefazolin, a new semisynthetic Cephalosporin antibiotic. III. Absorption, excretion and tissue distribution in parenteral administration. J. Antibiotics 23: 184-194, 1970
- 4) LEY, A. B.; HARRIS J. P., BRINKLEY, M., LILES, B. & JACK, J. A.: Circulating antibody directed against Penicillin. Science May 9, 127: 1118-1119, 1958
- 5) FOLIN, O. & CIOCALTEAU, V.: Tyrosine and tryptophan determination in proteins. J. Biol. Chem. 73: 627-650, 1927
- 6) OVARY, Z.: Progress in Allergy, 5: 459, 1958 (S. Karger, Basel, New York)

- 7) 原田 稔, 竹内三津男, 片桐 謙: Passive Cutaneous Anaphylaxis の定量化並びにモルモットのアナフィラキシーに及ぼす抗ヒスタミン剤の影響。アレルギー. 15: 1-7, 1966
- 8) MOLTHAN, L.; REIDENBERG, M. M. & EICHMAN, M. F.: Positive direct Coombs tests due to Cephalothin. New England Journal of Medicine 277: 123-125, 1967

STUDIES ON IMMUNOGENICITY OF CEFAZOLIN

YASUHIRO MINE and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. Osaka

SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine, Tokyo

The antigenicity of Cefazolin and its cross reactivity with Benzylpenicillin, Ampicillin and Cephaloridine were studied and the following results were obtained. Cefazolin showed a sensitizing activity, as evidenced by the elicitation of specific precipitin antibodies and of hemagglutinating antibodies in experimental animals immunized with protein conjugates of this antibiotic, as do conjugates of Penicillins and Cephalosporins. Cefazolin gave a minimal cross reactivity, not only with Benzylpenicillin but also with Ampicillin and Cephaloridine. Quantitative hapten inhibition of precipitation, against anti-Benzylpenicillin antibodies, by haptens of 7-aminocephalosporanic acid and 6-aminopenicillanic acid was only minimal. This finding suggests the possibility that the cross reaction between Cephalosporin derivatives and related Penicillins against Benzylpenicillin is mediated mainly by the acyl side chain of the molecules.

Cefazolin was tested for its reactivity in direct antiglobulin test *in vitro* in comparison to other related antibiotics. The positive antiglobulin reaction occurred in order of descending powers of Cephalothin, Benzylpenicillin, Cephaloridine, and Cefazolin.