

Ceftezole の抗原性および免疫学的交差性について

野々山重男・峯 靖 弘・西 田 実

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

Ceftezole は化学構造が Cefazolin に類似し、その *in vitro* および *in vivo* 抗菌活性も Cefazolin にきわめて類似した新しい注射用 Cephalosporin である。Ceftezole の抗原性および他の Cephalosporin 類、Penicillin G との免疫学的交差性を検討したのでその結果を報告する。

実験材料および実験方法

1. 抗原

Ceftezole (藤沢薬品中央研究所, CTZ), Cefazolin (藤沢薬品中央研究所, CEZ), Cephalothin (Eli Lilly Co., CET), および Penicillin G (万有製薬, PC G)。

2. Carrier protein 類および Adjuvant

Bovin γ -globulin (BGG, Bovin plasma 分画 II, Armour pharm. Co., Ltd.), Rabbit serum albumin (RSA, Nutritional Biochem. Corp.), FREUND'S complete adjuvant (Difco Laboratories)。

3. Ceftezole タンパク結合体の調製

200 mg の CTZ と RSA または BGG の 50 mg を 5 ml の Veronal buffer (pH 8.5) に溶解し、37°C, 24 時間反応させた。反応液の pH は 8.5~11.0 に調製した。これを pH 8.0 の緩衝液に対し、4°C で 6 日間透析し、未反応の CTZ を除去した。CEZ, CET, PC G についても同様に処理してタンパク結合体を調製した。

4. 動物および免疫方法

白色ウサギが実験に用いられ、既報の方法によって免疫された¹⁾。CTZ-RSA 結合体の 2 ml を FREUND'S complete adjuvant の 2 ml と混合乳化した。この乳化液の 2 ml をそれぞれ 3 羽のウサギの背部数ヶ所に皮下投与した。投与は 7 日間隔で 4~8 回行なった。最終投与から 5 日目に得られた血清を抗体として用いた。CEZ-RSA, CET-RSA および PC G-RSA は同様な方法で処理し、各々の抗体を得た。

5. 赤血球凝集反応

健康なウサギ赤血球を CTZ, CEZ, CET および PC G によって既述のとおりそれぞれ処理し、血球表面をこれらの抗生物質で感作した²⁾。生理食塩水で洗浄後、赤血球を 1% となるように生理食塩水に懸濁した。この赤血球浮遊液の 25 μ l を抗血清の 2 倍系列希釈液 0.3 ml にそれぞれ加え、37°C, 1 時間静置後さらに 4°C, 一夜放置した。検鏡によって凝集性を判定した。

6. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

各種ハプテンを 100 mM になるように生理食塩液に溶解し、0.5 ml の 2 倍希釈系列を作り、そのそれぞれに 4 単位の抗血清 0.5 ml を加えた。これを、37°C, 2 時間 incubate した後、この反応混合液の 0.3 ml に、抗体と homologous な感作血球 25 μ l を加えた。以後赤血球凝集反応と同様に行ない、凝集反応を 100% 阻止するのに必要な最小ハプテン濃度を求めた。

7. 定量沈降ハプテン阻止反応

通常の方法で、定量沈降反応によって当量域となる抗原 (BGG 結合物) および抗体量を決定した³⁾。ハプテンを冷却食塩加リン酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し、0.5 ml ずつの希釈系列を作った。そのそれぞれに上記で決定した抗血清を加え、4°C で 20 時間静置した後、当量となる抗原を加え、さらに 4°C で 48 時間静置した。通常の方法に従い沈降抗体量から 50% 阻止するのに必要なハプテン mM 数を求めた。

8. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

1 群 5 匹のモルモット (ハートレー, 300~350 g, ϕ) を用いて OVARY の方法に準じて行なった³⁾。すなわち抗血清の 2 倍連続希釈液をそれぞれ 0.1 ml 背部皮内に感作し、4 時間後に抗原 (BGG 結合物) および 1% Evans blue を静注した。30 分後に反応部位の色素出現を観察し、反応を示す血清の最大希釈倍数でもって PCA 抗体力価とした。

実験結果

1. 抗原性

Table 1 に示すように、CTZ-RSA 結合物で免疫し

たウサギ血清には CTZ に対する特異抗体が見出された。この事実は赤血球凝集反応, PCA 反応, 赤血球凝集ハプテン阻止反応および定量沈降ハプテン阻止反応によって証明された。

2. 免疫学的交差性

CTZ 抗体に対する CEZ, CET および PC G の交差性の程度は Table 2 および 3 のとおりである。すなわち, CTZ-RSA 結合物で免疫したウサギ CTZ 抗血清は, CTZ および CEZ 感作赤血球を同程度に凝集した。しかし CET および PC G 感作血球との反応は弱かった。また PCA 反応においても CTZ 抗血清は CTZ および CEZ 抗原と同程度に強い反応を示した

が, CET および PC G 抗原とは弱い反応を示したにすぎない。いっぽう, 赤血球凝集ハプテン阻止反応および定量沈降ハプテン阻止反応においても, それぞれの反応を 100% または 50% 阻止するのに必要なハプテン量で比較すると, CTZ および CEZ ハプテンはいずれも低濃度で阻止するが, CET および PC G ハプテンはそれに比べて約 10 倍以上の高濃度を要した。以上の成績から CTZ 抗体に対し CEZ は強い交差性を示すが, CET および PC G は比較的交差性が弱いことが明らかとなった。

同様に CEZ 抗体に対する, CTZ, CET および PC G の交差性の程度は, Table 4 および 5 に示すとおり

Table 1 Antigenicity of ceftazole

Passive hemagglutination titer	× 512
Passive cutaneous anaphylaxis	× 512
Precipitation	Positive
Hapten inhibition (100%) of hemagglutination	0.1 mM
Hapten inhibition (50%) of quantitative precipitation	0.27 mM

Pooled sera obtained from 3 rabbits immunized with CTZ : RSA conjugates were used as antiserum.

CTZ sensitized RBCs or CTZ : BGG was used as antigen.

Table 2 Cross-reactivity of penicillin G, cephalothin and cefazolin to antiserum to ceftazole

Antigen *	Hemagglutination titers or PCA titers (reciprocal)			
	Ceftazole	Cefazolin	Cephalothin	Penicillin G
Passive hemagglutination	512	512	32	32
Passive cutaneous anaphylaxis	512	256	8	4

* Antigen : Passive hemagglutination ; Antibiotic coated erythrocytes

Passive cutaneous anaphylaxis ; Antibiotic : BGG conjugates

Table 3 Hapten inhibition of antiserum to ceftazole

Hapten Inhibition of reaction	Concentrations(mM) of hapten required for inhibition			
	Ceftazole	Cefazolin	Cephalothin	Penicillin G
Passive hemagglutination	0.1	0.1	1.56	1.56
Quantitative precipitation	0.27	0.38	1.51	4.68

Inhibition of passive hemagglutination ; 100% inhibition

Inhibition of quantitative precipitation ; 50% inhibition

である。すなわち CEZ と CTZ との間には強い交差性が認められたが、CEZ と CET および PC G との間には軽度の交差性が認められるにすぎなかった。

CET 抗体に対する CTZ, CEZ および PC G の交差性は、Table 6 および 7 に示すとおりである。すなわち、CET と PC G との間には比較的強い交差性が認められたが、CTZ および CEZ との間には弱い交差性が認められたにすぎない。

PC G 抗体に対する、CTZ, CEZ および CET の交差性は、Table 8 および 9 に示す。すなわち、いずれの反応においても PC G は CET との間に比較的強い免疫学的交差性が認められたが、CTZ および CEZ との間には軽度の交差性が認められたにすぎない。

考 察

CTZ は他の Cephalosporin や Penicillin 類と同

様、通常の方法により実験動物で特異抗体を産生する。Penicillin と Cephalosporin 系抗生剤との免疫学的交差性に関する *in vitro*, *in vivo* および臨床成績についてはかなりの報告がみられる。それらは一般に、CET, CER が PC G と比較的強い交差性を有することを示している¹⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。著者らは CEZ と PC G との免疫学的交差性が弱いことを報告したが¹⁾²⁾、1975 年の Interscience conference における Cephalosporin についてのシンポジウムにおいて、CEZ が他の Cephalosporin 系抗生剤にくらべ、臨床的にもアレルギーの少ないことが報告された。

また Penicillin と Cephalosporin 間の免疫学的交差性の程度は、その 6 位または 7 位のアシル側鎖の構造に最も強く影響をうけることが知られている¹⁾⁴⁾。著者らは CTZ について PC G, CET および CEZ との

Table 4 Cross-reactivity of ceftazole, cephalothin and penicillin G to antiserum to cefazolin

Antigen * Reaction	Hemagglutination titers or PCA titers (reciprocal)			
	Cefazolin	Ceftazole	Cephalothin	Penicillin G
Passive hemagglutination	128	128	4	2
Passive cutaneous anaphylaxis	256	256	8	0

*Antigen: Passive hemagglutination; Antibiotic coated erythrocytes

Passive cutaneous anaphylaxis; Antibiotic and BGG conjugates

Table 5 Hapten inhibition of antiserum to cefazolin

Hapten Inhibition of reaction	Concentrations(mM) of hapten required for inhibition			
	Cefazolin	Ceftazole	Cephalothin	Penicillin G
Passive hemagglutination	0.16	0.16	6.25	6.25
Quantitative precipitation	0.4	0.46	3.30	2.07

Inhibition of passive hemagglutination; 100% inhibition

Inhibition of quantitative precipitation; 50% inhibition

Table 6 Cross-reactivity of ceftazole, cefazolin and penicillin G to antiserum to cephalothin

Antigen * Reaction	Passive hemagglutination titers or PCA titers (reciprocal)			
	Cephalothin	Ceftazole	Cefazolin	Penicillin G
Passive hemagglutination	512	32	32	128
Passive cutaneous anaphylaxis	512	32	32	256

*Antigen: Passive hemagglutination; Antibiotic coated erythrocytes

Passive cutaneous anaphylaxis; Antibiotic: BGG conjugates

免疫学的交差性を検討し、CTZ は CEZ と強い交差性を示すが、PC G および CET との交差性は弱いことを認めた。この交差性の弱さは CTZ の 7 位側鎖、tetrazolylacetyl 基が PC G の phenylacetyl 基、CET の thienylacetyl 基などと免疫学的に異質の構造であることによると考えられる。CTZ と CEZ との間の強い交差性は、当然両者が同じ 7 位側鎖を有することによるが、この両者が完全に交差性を示さない事実がある。これについては、すでに著者らが報告したように 3 位側鎖が交差性の程度に弱いながら影響を及ぼすことに原因するものと考えられる⁷⁾。

結 語

1. *In vitro* で血清タンパクと結合させた CTZ をウサギに免疫すると、特異赤血球凝集抗体、沈降抗体および PCA 抗体の産生が認められた。
2. CTZ は PC G および CET との間に弱い免疫学

的交差性を認めたにすぎない。

3. CTZ は CEZ と強い免疫学的交差性を示した。

文 献

- 1) MINE, Y.; NISHIDA, M., GOTO, S. & KUWAHARA, S.: Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. IV. Antigenicity of cefazolin and its cross reactivity with benzylpenicillin, ampicillin and cephaloridine. *J. Antibiotic* 23: 195~203, 1970
- 2) 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(10): 798~808, 1971
- 3) KABAT, E. A. & MAYER, M. M.: *Experimental immunochemistry*. 2nd Ed. 22~96 (Chap. 2) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A. 1961

Table 7 Hapten inhibition of antiserum to cephalothin

Inhibition of reaction \ Hapten	Concentrations (mM) of hapten required for inhibition			
	Cephalothin	Ceftezole	Cefazolin	Penicillin G
Passive hemagglutination	0.1	0.78	0.78	0.39
Quantitative precipitation	0.42	2.78	3.20	0.50

Inhibition of passive hemagglutination; 100% inhibition

Inhibition of quantitative precipitation; 50% inhibition

Table 8 Cross-reactivity of ceftezole, cefazolin and cephalothin to antiserum to penicillin G

Reaction \ Antigen *	Hemagglutination titers or PCA titers (reciprocal)			
	Penicillin G	Ceftezole	Cefazolin	Cephalothin
Passive hemagglutination	64	4	4	64
Passive cutaneous anaphylaxis	128	2	2	64

* Antigen: Passive hemagglutination; Antibiotic coated erythrocytes

Passive cutaneous anaphylaxis; Antibiotic: BGG conjugates

Table 9 Hapten inhibition of antiserum to penicillin G

Inhibition of reaction \ Hapten	Concentrations (mM) of hapten required for inhibition			
	Penicillin G	Ceftezole	Cefazolin	Cephalothin
Passive hemagglutination	0.1	5.0	5.0	0.1
Quantitative precipitation	0.35	24.0	12.5	1.00

Inhibition of passive hemagglutination; 100% inhibition

Inhibition of quantitative precipitation; 50% inhibition

- 4) SHIBATA, K. ; ATSUMI, T., HORIUCHI, Y. & MASHIMO, K. : Immunological cross-reactivities of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin. *Nature* 212: 419~420, 1966
- 5) BATCHELOR, F.R.; JANET, M.D., WESTON, R.D. & WHEELER, A.W. : The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 10: 21~33, 1966
- 6) GRIECO, M.H. : Cross-allergenicity of the penicillins and the cephalosporins. *Arch. Intern. Med.* 119: 141~146, 1967
- 7) 峯靖弘, 野々山重男, 西田実 : ペニシリン, セファロsporin系抗生物質の免疫学的研究 一特に Cephalexin 抗体との交差性における構造との相関性について—
第20回西日本化学療法学会支部総会 (福岡), 1972

ANTIGENICITY OF CEFTEZOLE AND ITS IMMUNE CROSS-REACTIVITY WITH CEFAZOLIN, CEPHALOTHIN AND PENICILLIN G

SHIGEO NONOYAMA, YASUHIRO MINE and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

The immunological properties of ceftezole (CTZ) were studied *in vitro* and in experimental animals. Specific antisera to CTZ were produced in rabbits immunized with protein conjugates of this antibiotic. Its activity was demonstrated by passive hemagglutination, hapten inhibition of hemagglutination, hapten inhibition of quantitative precipitation and PCA reaction. CTZ gave a minimal cross-reactivity with penicillin G and cephalothin, whereas a strong cross-reactivity with cefazolin. This suggests that a strong cross reaction between CTZ and cefazolin may be correlated to the identity of 7-acyl side chain of two compounds.