

Cefoxitin の抗原性と免疫学的特異性に関する検討

木村義民・竹内良夫・西村葉子

日本医科大学微生物学免疫学教室

Cefoxitin (CFX) は1972年に米国 Merck Sharp & Dohme Research Laboratories で開発された新規の半合成セファマイシン系抗生物質で、試験管内で広域の抗菌スペクトラムを示すのみでなく種々な感染症に対し優れた治療効果があるとされている^{1)~10)}。

私共は本剤の抗原性ならびに免疫学的特異性を検討すると共に、その抗原性を Cephalothin (CET), Cephaloridine (CER), Cefazolin (CEZ) および Ampicillin (ABPC) と対比検討した。

I. 材料と方法

1. 供試薬剤: Cefoxitin (MSDRL), Cephalothin (塩野義製薬), Cephaloridine (塩野義製薬), Cefazolin (藤沢薬品) および Ampicillin (富山化学) を使用した。

2. 供試動物: 体重 2.2~2.5 kg の雌性ウサギ, 体重 180~200 g の Wistar 系雌性ラットならびに体重 240~250 g の Hartley 系雌性モルモットを使用した。

3. ウサギ免疫用抗原の作製と免疫方法:

1) 抗原Aの作製と免疫方法: 10 ml の生理食塩水に溶解した 600 mg の CFX と 10 ml の生理食塩水に溶解した 100 mg の BSA を混合し, 1 N NaOH を加えて pH 7.5 に調整し 37°C で 24 時間保ってから pH 7.2 の 0.01 M リン酸緩衝液で 4°C で 6 日間透析した。ついで Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーで CFX-BSA の結合分画を分離精製した。精製分画としてえられた CFX-BSA 分画は透析の後, 凍結乾燥し抗原Aとした。

抗原Aによるウサギの免疫は, JOSEPHSON の方法¹¹⁾ に準じて行なった。すなわち抗原 A (40 mg) を生理食塩水 1 ml に溶解し, FREUND の complete adjuvant (FCA: Difco) と 1:1.5 の割でエムルジョンとし, その 0.1 ml を足蹠部数カ所に分けて注射し, 10 日後に 0.5 ml を筋注した。さらに第 20 日, 23 日および 26 日目に CFX (20 mg/ml) 1 ml を静注し, 最終注射後 10 日目に採血した。

2) 抗原Bの作製と免疫方法: CFX (100 mg) を生理食塩水 1 ml に溶解し, FREUND の complete adjuvant (FCA) と 1:1.5 の割でエムルジョンを作製し, その 0.1 ml を足蹠部に注射するとともに背筋部皮内数カ所に注射した。10 日後に同量を筋注, 更に第 20, 23 および 26 日目に CFX (100 mg/ml) 1 ml を静注し, 10 日後に

採血した。

3) 抗原Cの作製と免疫方法: CFX (100 mg) を生理食塩水 (1 ml) に溶解し, FREUND の incomplete adjuvant (FIA: Difco) と 1:1.5 の割でエムルジョンを作製し, 抗原Bによる免疫方法に準じてウサギを免疫した。

4. モルモットおよびラットの免疫用抗原 (抗原D) の作製と免疫方法: MURPHEY らの方法¹²⁾ に準じ, CFX (200 mg) を生理食塩水 (1 ml) に溶解したものと, Al(OH)₃ (80 mg) を生理食塩水 (1 ml) に溶解したものを混合し 37°C で 1 時間保ってから洗滌遠心を繰り返し遊離の CFX を除き, 生理食塩水 (1 ml) に懸濁する (抗原D)。モルモットおよびラットにはこの抗原Dを 1 回 0.5 ml の割合で足蹠部に分割注射し, とくにラットには同時に百日咳ワクチン (1 ml 中に *B. pertussis* 40 億を含む) 0.5 ml を腹腔内に投与した。注射後 14~21 日後に実験に供した。

5. 感作血球凝集反応による抗体価の測定:

1) 感作血球用抗原 (hapten-蛋白結合物) の作製: 抗生物質 (CFX, CET, CER, CEZ および ABPC) の各 180 mg を 6 ml の生理食塩水に各々溶解したものと, ウサギ血清アルブミン (RSA) 溶液 (60 mg の RSA を 6 ml の生理食塩水に溶解) を混合し, 1 N NaOH で pH 7.5 に調整し 37°C で 24 時間 incubate された。ついで pH 7.2 の 0.01 M リン酸緩衝液中で 4°C 6 日間透析ののち, 凍結乾燥された。これら各抗生剤と RSA との結合物はそれぞれ CFX-RSA, CET-RSA, CER-RSA, CEZ-RSA および ABPC-RSA と名付けられた。

2) 感作血球凝集反応の術式: MINE らの方法¹³⁾ に準じタンニン酸処理ヒツジ赤血球を用いて感作血球を作製した。すなわち型のとおりタンニン酸で処理されたヒツジ赤血球の 1.5% 浮遊液と pH 6.4 の 0.1 M リン酸緩衝食塩水中に溶解した抗生剤-RSA 結合物 (200 mg/ml) の各等量を加えて 37°C に 20 分間保ってから, 1% の正常ウサギ血清 (正常ヒツジ血球で吸収) で 3 回洗滌後, 最終濃度が 1.5% 血球浮遊液となるよう 1% 正常ウサギ血清中に懸濁した。被検抗血清は上記 1% 正常ウサギ血清をもって 2 倍稀釈系列とし, マイクロタイター法によって感作血球凝集価を測定した。

6. 感作血球凝集阻止反応：正常ウサギ血清を1%の割合に含む生理食塩水中に各抗生剤 (CFX, CET, CEZ, CER および ABPC) を 100 mM の濃度に溶解し、前記 1%ウサギ血清で各管 0.5 ml 宛の 2 段階希釈液を作製した。ついで 4 単位のウサギ抗 CFX・BSA 血清 (CFX・RSA 感作血球による感作血球凝集価 128 倍) を 0.5 ml 宛各抗生剤の希釈系列に加え、37°C で 2 時間保ち、CFX・RSA 感作血球を用いマイクロタイター法で感作血球凝集価を測定した。前記条件下における感作血球凝集反応の完全に阻止される添加抗生剤濃度を以て示した。

7. Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)

OVARY (1958) の方法¹⁴⁾に準じ、モルモットを用いてウサギ抗 CFX・BSA 血清について PCA を行なった。PCA は抗血清の希釈系列をモルモットの腹部皮内に 0.1 ml 宛注射し、3 時間および 48 時間後に CFX・RSA, CET・RSA, CER・RSA, CEZ・RSA, ABPC・RSA, および対照として RSA (各 2 mg) と Evans blue の混合液 0.5 ml を静注し 30 分後における青色帯発現の有無およびその径を測定した。

8. 寒天ゲル内沈降反応：OUCHTERLONY の方法¹⁵⁾に準じて行なった。寒天ゲルは special agar powder (和光純薬) を 0.8%, NaCl を 0.85%, NaN₂ を 0.01% に含むよう調製したものを用い、抗原と抗血清の well 間の距離を 8 mm とした。

9. ウサギにおける ARTHUS 反応：最終感作後 8 日目の試血に先立ち、ウサギの皮膚を剪毛し ARTHUS 反応の出現如何を検討した。惹起抗原としては、CFX・RSA, CET・RSA, CER・RSA, ABPC・RSA および RSA (各 10 mg/ml) とし、その各 0.1 ml を皮内注射し、24 時間後における発赤の径を測定した。

10. 能動性感作モルモットにおけるアナフィラキシー・ショック：能動性感作モルモット群について、2% CFX・RSA の 0.5 ml を静脈内に注射し、アナフィラキシー・ショックの発来性を検討した。

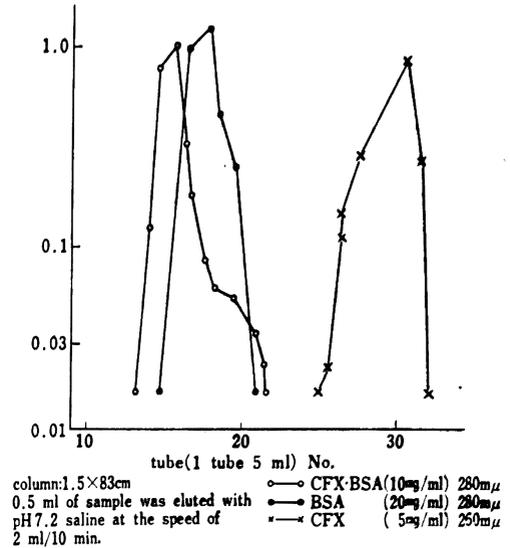
II. 実験結果

1. CFX・BSA 結合物の Sephadex G-25 による分離精製

CFX・BSA (10 mg/ml), BSA (20 mg/ml) および CFX (5 mg/ml) の各 0.5 ml を Sephadex G-25 column にかけて、流出量 10 分間 2 ml の条件下で pH 7.2 の生理食塩水で elute した。

実験結果は Fig. 1 に示すように、CFX・BSA の elution pattern は free の BSA あるいは CFX とは少々異なっている。以下本実験に用いるハプテン・蛋白結合物の分離精製には Sephadex G-25 column を通した

Fig. 1 Elution pattern of CFX・BSA conjugates fractionated by passage through Sephadex G-25 column



ものを使用した。

2. 抗血清の感作血球凝集価

ウサギ、モルモットおよびラットの各抗血清について感作血球凝集反応を行なった結果を一括すると、Table 1 に示す通りである。すなわち、CFX・RSA 感作血球に対し抗原 A で免疫されたウサギ抗 CFX・BSA 血清は感作血球凝集価 128 倍を示したのに対し、抗原 B または抗原 C で免疫されたウサギ抗血清はどれも 2~4 倍以下であった。

更に CFX と他の抗生剤との交叉反応性について検討するため、CET・RSA, CEZ・RSA, CER・RSA および ABPC・RSA による感作血球を用いて感作血球凝集反応を行なったところ、抗原 A で免疫されたウサギ抗 CFX・BSA 血清に対し、CET・RSA 感作血球は 16~32 倍、CER・RSA は 16 倍を示したが、CEZ・RSA および ABPC・RSA 感作血球では 4 倍以下であった。

また抗原 D をもって MURPHEY らの方法¹²⁾で感作されたモルモットおよびラット血清においてはいずれの感作血球に対しても 2 倍以下であった。

3. 感作血球凝集阻止反応による CFX と他の抗生剤との共通抗原に関する検討

抗原 A で免疫されたウサギ抗 CFX・BSA 血清と CFX・RSA 感作血球による感作血球凝集価 (128 倍) を指標として 4 単位のウサギ抗 CFX・BSA 血清を作製した。前記抗血清と CFX・RSA 感作血球による感作血球凝集反応が阻止されるに要した抗生剤の最少阻止濃度を

Table 1 Hemagglutination titers of sera in rabbits, guinea pigs or rats immunized with antigen A, B, C or D

| Sera of animals immunized with | Hemagglutination titers | | | | | |
|-------------------------------------|---|---------|---------|---------|----------|-----|
| | Reacting antigen: Sheep red cells sensitized with | | | | | |
| | CFX·RSA | CET·RSA | CEZ·RSA | CER·RSA | ABPC·RSA | RSA |
| Rabbit anti-sera immunized with | | | | | | |
| Antigen A | | | | | | |
| No. 1 | 128 | 32 | <2 | 16 | <2 | — |
| No. 2 | 128 | 16 | 4 | 16 | <2 | — |
| Antigen B | | | | | | |
| No. 1 | <4 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | — |
| No. 3 | 2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| Antigen C | | | | | | |
| No. 1 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| Rat anti-sera immunized with | | | | | | |
| Antigen D | | | | | | |
| No. 1 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 3 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 4 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 5 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| Guinea pig anti-sera immunized with | | | | | | |
| Antigen D | | | | | | |
| No. 1 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 2 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 3 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 4 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |
| No. 5 | <2 | <2 | <2 | <2 | <2 | — |

Table 2 Minimum inhibitory concentrations of antibiotics in hemagglutination inhibition test

| Antibiotics | CFX | CET | CEZ | CER | ABPC |
|--|-----|------|-----|-----|------|
| Minimum inhibitory conc. of antibiotics (mM) | 3.2 | 12.5 | >50 | 50 | >50 |

mM で表わすと、Table 2 に示すとおりで、CET と最も強い共通抗原性が示唆され、ついで CER と最も共通抗原性が認められた。

4. PCA

Table 3 に示すように抗原 A で免疫されたウサギ抗 CFX·BSA 血清と CFX·RSA を惹起抗原とする系に

おいて 3 時間 PCA が 64 倍を示したが、これ以外の実験系においては PCA の価がすべて 2 倍以下であった。

5. CFX 免疫ウサギにおける ARTHUS 反応

抗原 A, B および C で免疫されたウサギに惹起抗原として CFX·RSA, CET·RSA, CEZ·RSA, CER·RSA および ABPC·RSA を用いて型のとおり ARTHUS

Table 3 Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs

| Anti-sera Antigen | PCA titers | |
|----------------------|------------------------------|---|
| | Rabbit anti-CFX·BSA serum | Anti-serum of rabbits immunized with antigen B |
| CFX·RSA | 64 | <2 |
| CET·RSA | <4 | <2 |
| CER·RSA | <2 | <2 |

Table 4 Arthus reactions in the rabbits immunized with antigen A, B or C of CFX

| Rabbits sensi- tized with | Arthus reaction (diameter of redness) | | | | | |
|------------------------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|----------|--------|
| | Inducing antigen | | | | | |
| | CFX·RSA | CET·RSA | CEZ·RSA | CER·RSA | ABPC·RSA | Saline |
| Antigen A | | | | | | |
| No. 1 | 12mm | 5 | — | 4 | 4 | — |
| No. 2 | 17 | 6 | — | 5 | 4 | — |
| Antigen B (CFX) | | | | | | |
| No. 1 | — | — | — | — | — | — |
| No. 2 | — | — | — | — | — | — |
| Antigen C (CFX) | | | | | | |
| No. 1 | — | — | — | — | — | — |
| No. 2 | — | — | — | — | — | — |

Table 5 Anaphylactic shock in the guinea pigs actively sensitized with antigen D (CFX)

| No. of guinea pigs tested | Inducing antigen | Sign or symptom | No. of death / No. tested |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------|
| 10 | 0.5 ml of 2% CFX·BSA | —~± | 0/10 |

反応の発現如何を検討したが、CFX·RSA とは顯著に、また CET·RSA、CER·RSA および ABPC·RSA とは軽度に発赤を呈した (Table 4)。

6. CFX 感作モルモットにおけるアナフィラキシー・ショックの発来性に関する検討

MURPHEY らの方法¹²⁾に準じ CFX で感作されたモルモットに 2% CFX·BSA を惹起抗原として静注しアナフィラキシー・ショックの発来性を検討したが、軽度の不安症状あるいは立毛を呈した以外何らアナフィラキシー・ショック症状を示したものは認められなかった (Table 5)。

III. 考 察

Cefoxitin は cephamycin 系の半合成抗生剤で広域な抗菌スペクトルと治療効果が報告されている¹⁾⁻¹⁰⁾が、その抗原性ないし免疫学的報告は見当らない。類似抗生剤の抗原性に関する報告としては、BRANDRISS¹⁶⁾、

SCHNEIERSON¹⁷⁾および BATCHELOR¹⁸⁾が、Cephalothin および Cephaloridine にウサギに対して抗体産生がみられることを報告しているが、Cephalothin、Cephaloridine および benzylpenicillin の間の交叉反応性については必ずしも意見の一致をみていない。

本研究は Cefoxitin の抗原特異性、抗体産生能について検討するとともに、同系列抗生剤との共通抗原性についても明らかにすることを目的とした。実験結果を総括すると、Cefoxitin はそれ単独の免疫によっては動物に抗体産生能がないが、予め *in vitro* で蛋白と結合せしめて免疫すると、弱いながらも Cefoxitin に対する特異的抗体の産生がみられることがわかった。すなわち Cefoxitin に対する抗体は単に Cefoxitin と FREUND の complete または incomplete adjuvant との emulsion を以って免疫したウサギにおいては実証できなかったが、Cefoxitin を予め *in vitro* で蛋白と結合せしめた

CFX・BSA を用いて FREUND の complete adjuvant と共に免疫すると、高い力価の抗血清をうる事ができた。CFX で免疫されたウサギ、ラットおよびモルモット血清について抗生剤と RSA の結合物を用いてタンニン酸処理ヒツジ血球を感作し、感作血球交叉反応を各感作抗原と抗血清の組み合わせにおいて調べたところ、CFX・RSA 感作血球に対し抗原 A (CFX・BSA+FCA) で免疫されたウサギ抗血清は最も高い価 (128 倍) を示した。

また CET・RSA, CER・RSA による感作血球を用いての感作血球凝集反応および CET, CER による感作血球凝集阻止反応の結果から、CFX と CET, CER との間に共通抗原の存在することが明らかにされた。さらに抗原抗体系としてウサギ抗 CFX・BSA 血清と CFX・RSA を用いてモルモットの PCA を検討したが、3 時間 PCA において明らかに陽性成績が得られた。

一方、CFX・BSA 感作ウサギについての ARTHUS 反応およびゲル内沈降反応の結果から、CFX・RSA に対する明らかな ARTHUS 反応陽性と CET あるいは CER に対する軽度の交叉反応性が実証された。

モルモットを用いての CFX によるアナフィラキシー・ショックの発来性についての検討は、MURPHEY らの方法¹²⁾に準じて作製した抗原 D を用いてモルモットを感作し、誘発抗原として CFX・RSA を用い静注したが、軽度の不安状態または立毛のみられた症例以外は、何らの定型的ショック症状を呈したものがなかった。

結 論

Cefoxitin の抗原性ないし免疫学的特異性について検討し、次の結論を得た。

1. Cefoxitin・BSA 結合物と FREUND の complete adjuvant の emulsion を以てウサギを免疫することにより、感作血球凝集反応、PCA、ゲル内沈降反応 および ARTHUS 反応により Cefoxitin に対する力価の低い抗体の産生されることが実証された。

2. 上記の抗体の産生は、予め Cefoxitin を *in vitro* で蛋白と結合せしめることなく、Cefoxitin 単独あるいは Cefoxitin と adjuvant の emulsion で免疫したときは抗体の産生は認められなかった。

3. 感作血球凝集反応および感作血球凝集阻止反応により、Cefoxitin と Cephalothin, Cephaloridine の間に軽度ながら共通抗原性が存在することが示唆された。

4. Cefoxitin 感作モルモットについてアナフィラキシー・ショックの発来性を検討したが、全例において何ら定型的アナフィラキシー・ショック症状を呈したものはなかった。

以上の結果から、Cefoxitin の抗原性は弱くかつ単独

感作によっては抗体産生が全く認められず、*in vitro* で蛋白と結合せしめたものを以て免疫することにより特異抗体の産生がみられ、CET あるいは CER との間に軽度の共通抗原性が存在することが実証された。

なお、本研究は昭和 50 年 10 月から 51 年 2 月に実施された。

文 献

- 1) WALLICK, H. & D. HENDLIN: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotics: susceptibility studies. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 5: 25~32, 1974
- 2) BRUMFITT, W.; J. KOSMIDIS, J.M.T. HAMILTON-MILLER & J.N.G. GILCHRIST: Cefoxitin and cephalothin: antimicrobial activity, human pharmacokinetics, and toxicology. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 6: 290~299, 1974
- 3) HAMILTON-MILLER, J.M.T.; D.W. KERRY & W. BRUMFITT: An *in vitro* comparison of cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin, with cephalothin. *J. Antibiotics* 27: 42~45, 1974
- 4) ONISHI, H.R.; S.B. ZIMMERMAN & E.O. STAPLEY: Observations on the mode of action of cefoxitin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235: 406~425, 1974
- 5) NEU, H.C.: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by Gram-negative beta-lactamases. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 6: 170~176, 1974
- 6) MILLER, A.K.; E. CELOZZI, B.A. PELAK, E.O. STAPLEY & D. HENDLIN: Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics. III. *in vitro* studies. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 2: 281~286, 1972
- 7) MILLER, A.K.; E. CELOZZI, Y.KONG, B.A. PELAK, D. HENDLIN & E.O. STAPLEY: Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotics, *in vivo* evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 5: 33~37, 1974
- 8) ZIMMERMAN, S.B. & E.O. STAPLEY: Relative morphological effects induced by cefoxitin and other beta-lactam antibiotics *in vitro* *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 9: 318~326, 1976
- 9) UNE, T. & S. MITSUHASHI: Antimicrobial evaluation of cefoxitin: a new semisynthetic cephamycin. *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* 27: 89~93, 1977
- 10) GOODWIN, C.S. & J.P. HILL: Lysis of Enterobacteria by cefoxitin, cefuroxime, and cephalothin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 11: 26~30, 1977
- 11) JOSEPHSON, A.S.: The development of antibodies to penicillin in rabbits. *J. Exp. Med.* 111: 611~620, 1960
- 12) MURPHEY, S.M.; S. BROWN, N. MIKLOS & P.

- FIREMAN: Reagin synthesis in inbred strains of rats. *Immunology* 27: 245~258, 1974
- 13) MINE, Y.: Immunological studies on antibiotic "cephalosporin C" especially on immunological characteristics of cefazolin. *Jap. J. Allergy* 20: 798~808, 1971
- 14) OVARY, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antigen antibody interactions. *Progr. Allergy* 5: 459, 1958
- 15) OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5: 1~78, 1958
- 16) BRANDRISS, M.W.; J.W. SMITH & H.G. STEINMAN: Immunologic cross-reactivities of three diverse penicillins. *Postgrad. Med. J.* 40 (Suppl.): 157, 1964
- 17) SCHNEIERSON, S.S.; E. PERLMAN & B. SHORE: Cephalothin antigenicity and cross-reactivities with penicillin G. *Clin. Med.* 71: 1933, 1964
- 18) BATCHELOR, F.R.; J.M. DEWDNEY & D. GAZZARD: Penicillin allergy: the formation of the penicilloyl determinant. *Nature (Lond.)* 206: 362~364, 1965

STUDIES ON THE ANTIGENICITY AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CEFOXITIN (CFX)

YOSHITAMI KIMURA, YOSHIO TAKEUCHI and YOKO NISHIMURA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

Cefoxitin is a new semisynthetic cephamycin analog, a new cephalosporin-like antibiotic, with broad antibacterial activity. This work was carried out in order to clarify the immunogenicity and immunological characteristics of cefoxitin. Experiments were also carried out on the immunogenic relation to cephalothin, cephaloridine, cefazolin and ampicillin. The results obtained were as follows.

Cefoxitin has only a weak antibody-forming activity and specific antigenicity. The highest antibody titers were observed in the sera of rabbits immunized with CFX · BSA complexes and FREUND's complete adjuvant. The titers of indirect hemagglutination reaction between rabbit anti-CFX · BSA sera and CFX · RSA coated red cell suspension were 1:128, and the 3-hour PCA titer with rabbit anti-CFX · BSA in sera CFX · RSA in guinea pigs was 1:64. Slight cross reactions between rabbit anti-CFX · BSA sera and CET · RSA or CER · RSA coated red cell suspensions were also observed. The cross antigenicity between cefoxitin and cephalothin or cephaloridine was also demonstrated by the indirect hemagglutination inhibition test, agar precipitation test or Arthus reaction.

However, antibody formation could not be demonstrated in rabbit, guinea pig and rat immunized with only cefoxitin itself and adjuvant, if cefoxitin was not previously conjugated with protein *in vitro*. In guinea pig sensitized with cefoxitin according to the modified Murphey method, not a sign of anaphylactic shock was observed.