

## Cefaclor の免疫学的特性

原田 稔・竹内 三津男・松本 光史

小池 昌子・江幡 光雄

(塩野義製薬研究所)

新しい経口用抗生物質 Cefaclor (CCL) の免疫学的性質を検討した。(1) CCL の水溶液と Freund's complete adjuvant (FCA) とからなるエマルジョンを 6 回反覆注射した場合、C<sub>3</sub>H/He, C<sub>57</sub>BL/6J および JCL・ICR の 3 つの系統のマウスのいずれにおいても、抗体産生はみとめられなかった。同じ条件で、対照薬の CET や PCG に対しては、ある頻度をもつて、抗体が検出された。したがって、少なくとも、CCL の抗体産生能がこれら対照薬のそれよりも弱いということは明白である。(2) CCL や他のβ-ラクタム抗生物質の BGG 結合体を免疫原として C<sub>3</sub>H/He マウス、モルモット、ウサギを免疫し、得られた抗血清に各薬剤抗原(薬剤の BSA 結合体)を作用させて、CCL と他剤の免疫学的交差反応性をしらべた。検定は主に PCA によって行なったが、その他、モルモットの能動アナフィラキシー試験、ならびに、ウサギ抗血清の沈降反応や間接赤血球凝集試験も行なった。抗体を産生する動物の種や、検定方法等により不一致な点もみられたが、総括すると、CCL との交差反応性は CEX が最も高く、CET や ABPC が交差反応を示すことも多かった。PCG や CEZ が交差反応性を示すこともあったが、ごく少数の反応系に限られていた。(3) CCL は水に難溶なので飽和状態に近い濃度でヒト血液に作用させたが、*in vitro* 直接クームス反応は陰性であった。

## 緒 言

経口用の新セファロsporin 抗生物質セファクロール (Cefaclor, CCL) の免疫学的挙動を実験動物レベルで検討することは、この薬剤の副作用対策の 1 つとして欠くことのできない検査項目である。本報告では、同薬剤の (i) 抗体産生能、(ii) 市販されている他のβ-ラクタム抗生物質との免疫学的交差反応性、及び、(iii) *in vitro* 直接クームス反応陽性化作用の 3 点についての検定結果を述べる。

## 材料と方法

## 1. 実験動物

感作に供する動物としては、ウサギ(ラビトン、アルビノ、2.5~3.0 kg, ♀)、モルモット(静岡農協 SLC、アルビノ、300~350 g, ♀)、並びに、5 つの系統のマウス(塩野義油日ラボラトリーで育成されている C<sub>3</sub>H/He, C<sub>57</sub>BL/6J, A/J, AKR の 4 つの近交系と日本クレア JCL の ICR マウス、いずれも 6~8 週令、主に ♀)を使用した。また Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test のレシピエント動物としては、近交系 Wistar ラット(塩野義油日ラボラトリー、8~9 週令、♀)、JCL・ICR マウス(6~8 週令、♀)、及び、モルモット(SLC、300~350 g, ♀)を用いた。

## 2. 抗生物質と異種蛋白質との結合体の調製法

CCL 及び市販の対照薬と異種動物の血清蛋白質との

結合体は LEVINE *et al.*<sup>1)</sup> の方法に準拠して調製された。対照薬としては、ペニシリン G (PCG, 明治製菓)、アンピシリン (ABPC, 万有製菓, ペントレックス®)、セファロチン (CET, Eli Lilly—塩野義, ケフリン)、セファレキシン (CEX, Eli Lilly—塩野義, ケフレックス®) 及び、セファゾリン (CEZ, 藤沢薬品工業, セファメジン®) を使用し、蛋白質としては、ウシγ-グロブリン (BGG, Fraction II, NBC) とウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V, Armour) を用いた。蛋白質結合体調製法の要点のみを記すと、CCL の場合は pH 9.4 において、他の薬剤の場合は pH 8.8~9.0 において、700 mg の蛋白質に 4,200 mg の薬剤を加えて、室温で 24 時間反応させ、その後 5 日間透析を行ない、透析内液を凍結乾燥した。得られた結合体の薬剤ハプテン結合率は EBATA *et al.*<sup>2)</sup> の方法に従って測定した。本実験に使用された結合体の組成は次の通りである。

CCL <sub>22</sub> ・BSA	CCL <sub>29</sub> ・BGG
PCG <sub>6</sub> ・BSA	PCG <sub>17</sub> ・BGG
ABPC <sub>12</sub> ・BSA	ABPC <sub>17</sub> ・BGG
CET <sub>17</sub> ・BSA	CET <sub>26</sub> ・BGG
CEZ <sub>7</sub> ・BSA	CEZ <sub>17</sub> ・BGG
CEX <sub>5</sub> ・BSA	

## 3. 動物感作法

(1) 薬物自体を免疫原とした場合

CCL あるいは対照薬 (CET と PCG) を磷酸緩衝液

添加生理食塩水 (PBS, pH 7.0) に溶解させ、等量の FREUND's complete adjuvant (FCA, Difco) を加えてエマルジョンを調製し、マウスの腹腔内に注射した。注射は週 2 回の割合で 3 週間行ない、1 回の薬剤投与量を 1 mg/animal とした。最終回注射の 4 週後に採血し、血清抗体検出に使用した。

(2) 薬剤と異種蛋白質との結合体を免疫原とした場合  
ウサギ及びモルモットの場合、各薬剤の BGG 結合体を PBS に溶解 (水に難溶の CET・BGG と CEZ・BGG は懸濁) させ、等容量の FCA を添加してエマルジョンをつくり、それを筋肉内に注射して感作した。ウサギの場合は、1 回の免疫原量を 10 mg/animal とし、週 1 回の割合で 3 回ないし 4 回注射をくり返し、最終注射の 4 週後に採血を行なった。モルモットにおいては、免疫原量を毎回 1 mg/animal とし、週 1 回で 2 回注射し、その後 2 週で採血した。ただし、能動全身アナフィラキシー誘発試験においては、注射は 1 回、免疫期間を 2 週間とした。マウスの場合、C<sub>3</sub>H/He マウスを使用し、免疫原 1 μg を吸着した水酸化アルミニウムゲル (1 mg) を、腹腔内に、週 1 回で 3 回注射し、最終注射の 2 週後に採血を行なった。ただ、ハプテン阻害実験に用いられた抗 CCL・BGG 血清は 1 mg の CCL・BGG と FCA とから成るエマルジョンを 1 回注射し、2 週後に得たものである。ウサギは、各免疫原につき、2~3 羽を使用した。抗体価の個体差が小さかったので、それぞれ、代表的な血清 1 つを使用した。モルモットの場合は、1 群 3 頭とし、3 頭の血清を等量ずつ混合して使った。マウスは 1 群 5~10 頭とし、それらの血清をプールして使用した。

#### 4. 抗体の検定

抗体活性は主として PCA によって検定した。この他に、補助的手段として、ゲル内沈降反応、間接赤血球凝集反応、モルモットの能動アナフィラキシー・ショック試験をも行なった。いずれの反応においても、反応誘発抗原としては各薬剤の BSA 結合体を使用した。反応術式は概ね既報<sup>3)</sup>の通りであるが、参考のため、以下、要点を記す。

##### (1) マウスにおける PCA

マウスの IgG<sub>1</sub> 抗体の検出を同種 PCA によって行なった。マウスの血清 (非希釈, 0.05 ml) を JCL・ICR マウスの皮内に注射し、1 時間の感作時間の後、誘発抗原 1 mg と色素エバレス 青 1 mg とを静注し、30 分後の色素漏出反応をしらべた。テストは、常に、2 例のレシピエントを使った Duplicate test とし、2 例のレシピエントのどちらにも、直径 5 mm またはそれ以上の青色斑が形成される場合を陽性反応とした。

##### (2) ラットにおける PCA

マウスの IgE 抗体の検定をラット PCA によって行なった。ラットの背部皮内に、血清の 2 倍段階希釈液 0.05 ml を注射、24 時間後に、2 mg の誘発抗原と 10 mg の色素を静注し、1 時間の色素漏出を観察した。マウスの場合と同様、Duplicate test とし同様の基準によって結果を判定した。

##### (3) モルモットにおける PCA

モルモットやウサギの抗血清を 10 倍段階希釈して、その 0.05 ml をモルモット皮内に注射し、4 時間後に、誘発抗原 2 mg と色素 10 mg を静注、30 分間の色素漏出をしらべた。この場合も、通常 Duplicate test としたが、必要に応じて、Triplicate test とした。マウスやラットの PCA におけると同様の基準にしたがって抗体活性を判定した。

##### (4) ラット PCA のハプテン阻害

CCL と異種蛋白質との結合体をつくったのと同じ要領で CCL と ε-アミノカプロン酸 (ε-ACA) との結合体をつくり、これを 1 価ハプテンとして、抗原抗体反応のハプテン阻害をしらべた。即ち、C<sub>3</sub>H/He マウスの抗 CCL・BGG 血清で、24 時間皮膚局所を感作されたラットに、誘発抗原 CCL・BSA 1 mg を投与して PCA を惹起する際、抗原チャレンジの直前に CCL-ε-ACA 20 mg を静注し、ハプテンを投与しない対照群と PCA の程度を比較した。PCA の強さを定量的に表現するため、既報<sup>4)</sup>の方法により皮内漏出色素量を測定した。なお、CCL-ε-ACA の阻害作用が CCL 反応系に対する特異的阻害であるかどうかを検討する目的で、CCL とは特異性を異にすると考えられる卵白アルブミン (OVA) と、それに対する AKR マウスの血清 (OVA 1 mg の FCA エマルジョンを 1 回注射された後、14 日目の血清) とによるラット PCA に対する阻害作用をしらべた。

##### (5) モルモットの能動全身アナフィラキシー誘発試験

各薬剤の BGG 結合体と FCA とでつくったエマルジョンを 1 回注射し、2 週後に心臓から少量の血液を採り、数時間して 2 mg の誘発抗原を静脈内に投与し、ショック症状の発現を観察した。ショックの強さを次のような 5 段階に分けた。

陰 性: 何ら症状がみられないもの。

軽 度: 不安状態を呈し、口をもぐつかせ、顔や耳をこする動作、立毛、軽い吃逆発作を示すもの。

中等度: 吃逆発作かなり強く、チアノーゼを呈するが横転には至らないもの。

強 度: 強い吃逆発作が生じ、横転し、衰弱が著し

いもの。

死亡:呼吸困難のため,抗原チャレンジの2~3分後に死亡するもの。

#### (6) ゲル内沈降反応

Immunoplate® (Pattern C, Hyland) を使用し,希釈しないウサギの抗血清と各種の BSA 結合体 (250 µg/ml) とを組み合わせ,室温にて 24 時間の沈降線形成を観察した。

#### (7) 間接赤血球凝集反応

西岡<sup>9)</sup>の方法に従い,4万倍タンニン酸処理ヒツジ赤血球に各 BSA 結合体を被覆させ,マイクロタイター法によってウサギ抗血清の凝集価を測定した。

#### 5. In vitro 直接クームス反応陽性化作用の検定

ヘパリン・ナトリウム注射液 (5,000 単位/ml, 武田薬品工業) で内面を湿らせた注射筒で採った健康人 5 名 (血液型 O 型ならびに A 型) の血液を使用,オルソー,国際試薬株式会社及び東京標準血清株式会社の 3 つのメーカーのクームス試薬を用い, MOLTHAN 法によって検定した。実験条件の詳細については既報<sup>9)</sup>を参照されたい。

## 成 績

### (I) 抗原性の検定

#### 1. マウスにおける免疫原性

3 つの系統のマウスにおける CCL そのものの抗体産生能をしらべ,対照薬 CET 及び PCG のそれと比較した。Table 1 に示すように,薬剤 1 mg を含むエマルジョンの 6 回注射という免疫条件では,CCL に対する抗体は,どの系統のマウスにおいても,IgE クラス,IgG<sub>1</sub> クラスのいずれのものも全く検出されなかった。CET に対しては,C<sub>57</sub>BL/6J マウスにおいて,おおよ

Table 1 Antibody response to plain antibiotics in the mouse

Antibiotics	Mouse strain	Antibody positive/Total	
		IgE Ab	IgG <sub>1</sub> Ab
CET	C <sub>57</sub> BL/6J (♀)	21/42	18/42
		(♂) 9/23	11/23
PCG	C <sub>57</sub> BL/6J (♀)	2/12	3/12
	C <sub>3</sub> H/He (♀)	2/6	4/6
	A/J (♀)	2/11	5/11
CCL	C <sub>57</sub> BL/6J (♀)	0/11	0/11
	C <sub>3</sub> H/He (♀)	0/10	0/10
	JCL:ICR (♀)	0/9	0/9

そ 50% の率で IgE ならびに IgG<sub>1</sub> 抗体の一方あるいは双方がみとめられたし,PCG に対しては,テストした 3 系統のいずれにおいても,ある頻度を以て両クラスの抗体が検出された。この結果から,マウスにおいて,CCL の免疫原性が他の 2 種類の抗生物質のそれよりも低いといえることができる。

#### 2. 他の β-ラクタム抗生物質との免疫学的交差反応性

##### (1) マウス IgE 抗体を用いた検定

水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして免疫されたマウスの抗血清の中には,誘発抗原のキャリアー部分,即ち,Plain BSA によって,ある程度 PCA を惹起するものがあつたので,この実験においては,すべてのレシピエント・ラットに,抗血清の皮内注射の直前に BSA 2 mg を静注しておくことにした。既に報告したように<sup>9)</sup>,この処置によって,抗ハプテン抗体価には殆ど影響を与えることなく,キャリアー部分の関与を完全に消去することができる。事実,Table 2 に示したように,この処置を受けたラットは,24 時間感作後に BSA をチャレンジしても PCA を全く起こさなかった。したがって,Table 2 に見られる PCA は,ハプテンと抗ハプテン抗体との会合によって誘起されるものとみなしえ

Table 2 Cross-reactivity between CCL and other antibiotic haptens in the elicitation of rat PCA mediated by mouse IgE antibodies

Antiserum	Elicitor	PCA titer
Anti-CCL-BGG	CCL-BSA	1:128
	PCG-BSA	Neg.
	ABPC-BSA	Neg.
	CET-BSA	1:32
	CEZ-BSA	Neg.
	CEX-BSA	1:64
Anti-PCG-BGG	BSA	Neg.
	PCG-BSA	1:128
	CCL-BSA	Neg.
Anti-ABPC-BGG	BSA	Neg.
	ABPC-BSA	1:128
	CCL-BSA	1:16
Anti-CET-BGG	BSA	Neg.
	CET-BSA	1:64
	CCL-BSA	1:2
Anti-CEZ-BGG	BSA	Neg.
	CEZ-BSA	1:32
	CCL-BSA	Neg.
	BSA	Neg.

Table 3 Hapten-inhibition of rat PCA

Antiserum	Elicitor	Intensity of PCA*		Inhibition (%)	
		Control (Without hapten)	Hapten-injected		
Anti-CCL·BGG	CCL·BSA	1:4	67±4	4±1	94
		1:8	43±1	3±1	93
		1:16	27±8	3±0	89
Anti-OVA	OVA	1:16	29±8	35±5	-24
		1:32	15±4	13±3	13

\*) Expressed in terms of the average dye amount ( $\mu\text{g}$ ) in the duplicate test

る。このことを裏付けるために PCA の 1 価ハプテンによる抑制を検討した。Table 3 は抗 CCL·BGG 血清と CCL·BSA との組合せによって生じる PCA に及ぼす CCL- $\epsilon$ -ACA の影響を示している。本実験では、誘発抗原量 1 mg に対し、ハプテン投与量を 20 mg とし、色素漏出時間を 30 分としたが、この条件で、PCA はほぼ完全に阻害された。同一条件下で、OVA とそれに対する抗体とによる PCA は全く阻害されなかった。これらの結果から、CCL- $\epsilon$ -ACA による阻害は CCL 反応系に特異的であり、ひいては、PCA 惹起に関与するのは CCL ハプテン部分だけであることが確かめられた。

以上のような吟味の上で Table 2 を見ると、抗 CCL 血清は対応抗原 (CCL·BSA) と反応するとき 1:128 の IgE 抗体価を示すが、CEX·BSA と組合せた場合も 1:64 の抗体価を示した。即ち、CEX と CCL との間に高い交差反応性がみとめられた。CET·BSA を誘発抗原とした場合もかなり高い交差反応性が観察されたが、PCG, ABPC, CEZ の BSA 結合体は交差反応を惹起しなかった。一方、他剤に対する抗血清は、それぞれ、対応抗原との間に 1:128~1:32 の IgE 抗体価を示したが、この中、抗 ABPC 及び抗 CET 血清は、CCL·BSA を誘発抗原とした場合にも若干交差反応を起こした。なお、CEX の BGG 結合体を FCA とともにエマルジョンにしたり、あるいは、水酸化アルミニウムゲルに吸着させたりして  $\text{C}_3\text{H}/\text{He}$  マウスを免疫したが、他剤に対する抗血清の場合に匹敵する抗 CEX 抗体価をえることができず、抗 CEX 抗体と CCL 抗原との間の交差反応を検定することは成功しなかった。

(2) モルモット能動全身アナフィラキシーによる検定  
免疫モルモットに各種の抗原を静注した場合のショックの発現を Table 4 に示した。CCL·BGG 感作群は、対応抗原 CCL·BSA を静注すると、はげしいショック

症状を呈し、数分後に死亡した。Negative control として BSA を静注した場合は何らショック症状はみとめられなかった。対応抗原以外では、CET·BSA が強く反応して致死性のショックを惹起したが、他の 3 種類の BSA 結合体は何の症状もひき起さなかった。一方、他剤の BGG 結合体で感作されたモルモットは、それぞれ、対応抗原によってショックが誘発されるが、CEZ·BGG 感作群以外の 3 群は CCL·BSA をチャレンジした場合にもショックを起こすことが見出された。特に CET·BGG 感作群では致死性のショックが観察された。

ショック誘発の数時間前に感動物から採っておいた血清の IgG<sub>1</sub> 抗体を PCA によって検定したところ、ABPC·BGG 或いは CEZ·BGG で感作した動物の血清には、明確な抗ハプテン抗体活性をみとめることができなかったが、抗 PCG·BGG と抗 CET·BGG 血清では 1:100 の抗体価を得た。そこで、この 2 種類の抗血清については CCL·BSA との交差反応性を検討したが、能動アナフィラキシーの結果と相違し、交差反応性はみとめられなかった。

(3) モルモット IgG<sub>1</sub> 抗体を用いた反応系による検定  
上述のように、モルモットに ABPC や CEZ の BGG 結合体の FCA エマルジョンを 1 回注射しただけでは抗ハプテン抗体の産生が不良であったので、どの免疫原についても免疫注射を 2 回とし、その後 2 週間して採った血清を使用して検定を行なった。Table 5 に示したように、抗 CCL·BGG 血清は CEX·BSA ならびに CET·BSA と交差反応を起こした。CET·BSA の場合はレシピエントによって反応の終末点が異なり、抗体価が 1:10 となる例と 1:100 となる例があった。他の抗原では交差反応は観察されなかった。他剤に対する抗血清の中では、抗 ABPC·BGG 血清と抗 CET·BGG 血清とが若干交差反応性を示した。モルモット IgG<sub>1</sub> 抗

Table 4 Cross-reactivity between CCL and other antibiotic haptens in the provocation of active systemic anaphylaxis in the guinea pig

Immunogen	Elicitor	Total No. of animals	No. of animals showing anaphylactic shock				
			Negative	Light	Moderate	Severe	Fatal
CCL-BGG	CCL-BSA	2					2
	PCG-BSA	3	3				
	ABPC-BSA	4	4				
	CET-BSA	2					2
	CEZ-BSA	3	3				
	BSA	4	4				
PCG-BGG	PCG-BSA	3		1			2
	CCL-BSA	3	1	1	1		
	BSA	3	3				
ABPC-BGG	ABPC-BSA	4		2	2		
	CCL-BSA	3		2	1		
	BSA	3	3				
CET-BGG	CET-BSA	2				1	1
	CCL-BSA	5				2	3
	BSA	3	3				
CEZ-BGG	CEZ-BSA	3		1			2
	CCL-BSA	3	3				
	BSA	3	3				

体レベルでの、このような検定結果は、前述のマウス IgE 抗体レベルでの成績と一致し、モルモットの全身アナフィラキシーでの結果とも類似している。

#### (4) ウサギ抗血清による検定

ウサギの抗血清を用いる場合、(i) モルモットにおける PCA、(ii) ゲル内沈降反応、及び、(iii) 間接赤血球凝集反応の 3 つの方法で検定を行なった。なお、抗 CCL・BGG 及び、抗 PCG・BGG 血清は、免疫注射を 3 回反覆した動物から採ったものであり、他の抗血清は注射を 4 回行った動物からえたものである。

(i) モルモット PCA による検定；抗 CCL・BGG 血清は対応抗原 CCL・BSA と反応する他、CEX・BSA とかなり強く交差反応を起こした (Table 5)。しかし、マウス抗体やモルモット抗体を用いた場合と異なり、CET・BSA を誘発抗原としたとき交差反応は生じなかった。一方、他の動物由来の抗体による検定結果と同様、抗 ABPC・BGG 血清や抗 CET・BGG 血清に CCL・BSA を作用させるときはかなりの交差反応が惹き起された。ウサギでは、この他に、抗 CEZ・BGG 血清も CCL・BSA と反応し得ることが観察された。

(ii) ゲル内沈降反応による検定；Immunoplate の小孔に抗原や抗血清を注入した後、24 時間の沈降線形成

を観察し、強陽性 (++)、陽性 (+)、擬陽性 (±)、陰性 (-) の 4 段階に分類した (Table 6)。PCA でえられたのと同様の交差反応パターンがみとめられた。

(iii) 間接赤血球凝集反応による検定；使用したウサギの抗血清は、いずれも、タンニン酸処理赤血球に対する非特異凝集価がかなり高かった。このようなバックグラウンドレベルが高い実験系は交差反応性検定法としては余り好ましいものではないが、抗血清を、それに対応した抗原で被覆された赤血球と組み合わせると、非特異凝集を大きく上廻る凝集価が得られたので、この系による交差反応性の検討をも試みた。Table 7 に見られるように、抗 CCL・BGG 血清は CCL・BSA 被覆赤血球に対しては高い特異凝集を示すが、他剤抗原被覆赤血球に対しては、タンニン酸処理赤血球や、キャリア蛋白質被覆赤血球に対する凝集価以上のハプテン特異凝集を示さなかった。一方、他剤ハプテンに対する抗血清の中、抗 ABPC ならびに抗 CEZ 血清は CCL・BSA 被覆赤血球に対して、バックグラウンドレベルを僅かながら上廻る凝集反応を呈したが、抗 PCG・BGG 血清は CCL・BSA 被覆赤血球に対し交差反応を示さなかった。これらの結果は、PCA や沈降反応でえられた成績と一致している。ただ、抗 CET・BGG 血清が CCL・BSA 被覆

Table 5 Cross-reactivity between CCL and other antibiotic haptens in the elicitation of guinea pig PCA mediated by guinea pig IgG<sub>1</sub> and rabbit IgG antibodies

Antiserum	Elicitor	PCA titer	
		Guinea pig Ab	Rabbit Ab
Anti-CCL-BGG	CCL-BSA	≥1:1,000	≥1:1,000
	PCG-BSA	Neg.	Neg.
	ABPC-BSA	Neg.	Neg.
	CET-BSA	1:10-1:100	Neg.
	CEZ-BSA	Neg.	Neg.
	CEX-BSA	1:100	1:100-1:1,000
	BSA	Neg.	Neg.
Anti-PCG-BGG	PCG-BSA	≥1:1,000	≥1:1,000
	CCL-BSA	Neg.	Neg.
	BSA	Neg.	Neg.
Anti-ABPC-BGG	ABPC-BSA	1:100	1:100
	CCL-BSA	1:10	1:100
	BSA	Neg.	Neg.
Anti-CET-BGG	CET-BSA	1:1,000	1:1,000
	CCL-BSA	1:1-1:10	1:100
	BSA	Neg.	Neg.
Anti-CEZ-BGG	CEZ-BSA	1:100	1:1,000
	CCL-BSA	Neg.	1:10-1:100
	BSA	Neg.	Neg.

赤血球を凝集せず、他のテストと相違する結果を示した。

#### 〔Ⅱ〕 In vitro 直接クームス反応陽性化作用

O型(男性1名及び女性1名)ならびにA型(男性3名)の健康人の血液を使用し、MOLTHAN法で検定した結果をTable 8に示した。

CCL及びCEXは水に難溶であったので室温放置、或いは50°Cに数分加温した場合の飽和溶液(それぞれ7 mg/ml, 10 mg/ml弱といえる)を血液に添加した。3種類のクームス試薬を使用したか、どの試薬を用いてもほぼ一致した結果をえることができた。対照薬の中ではCETの作用が最も強く、終濃度5 mg/mlで殆ど全ての場合クームス反応は陽性化した。PCGも弱いながら作用を示し、40 mg/mlで反応を陽性化したか、CEZは40 mg/mlでも作用を示さなかった。CEXとCCLは、テスト可能な濃度範囲の上限、即ち、3.5あるいは5 mg/mlでもクームス反応をひき起こさなかった。

#### 考 察

CCLは経口用セファロsporin剤であるが、その免疫学的性質を検定するのに、本報では、同薬剤を注射に

よって動物に投与した。それは、酵素製剤や接触過敏症を起こすジニトロクロロベンゼン<sup>7)</sup>等の場合と異なり、CCLの場合は、投与経路を変えても免疫応答性や誘発抗原性の質的变化は起こらないであろうと考えたからである。むしろ、経口投与して消化器管から吸収させるよりも、一定量を注射する方が実験的に薬剤量を正確に規定できるという利点があるとも云えよう。このような考え方に従って、CCL 1 mgをFCAエマルジョンの形にしてマウスに注射したが、3つの系統のいずれにおいても、抗CCL抗体の産生は全くみとめられなかった。まして、アジュバントを用いずに薬剤のみを注射したり、あるいは、経口的に投与した場合は抗体産生を起こすことはないであろうと判断される。もちろん、あらゆる動物の中でヒトが最も感作され易いとされていること<sup>8)</sup>を考慮すると、マウスでの結果をそのままヒトに適用することは妥当ではない。しかし、同じ免疫条件で、対照薬として用いたCETやPCGに対しては、個体によって、明らかに抗体産生が観察されたので、少なくとも、CCLの抗体産生能が市販されているこれらの薬剤のそれと比べてかなり弱いということは間違いない。

CCLと他のβ-ラクタム抗生物質との免疫学的交差反

Table 6 Cross-reactivity between CCL and other antibiotic haptens in the production of precipitin reaction using rabbit antisera

Antiserum	Elicitor	Precipitin reaction
Anti-CCL-BGG	CCL-BSA	++
	PCG-BSA	-
	ABPC-BSA	-
	CET-BSA	-
	CEZ-BSA	-
	BSA	-
Anti-PCG-BGG	PCG-BSA	+
	CCL-BSA	±
	BSA	-
Anti-ABPC-BGG	ABPC-BSA	-
	CCL-BSA	+
	BSA	-
Anti-CET-BGG	CET-BSA	++
	CCL-BSA	+
	BSA	-
Anti-CEZ-BGG	CEZ-BSA	++
	CCL-BSA	+
	BSA	-

反応性の検定は、抗体試料として各薬剤の BGG 結合体に対する抗血清を、また、反応誘発抗原として薬剤の BSA 結合体を使用して行なわれた。FCA エマルジョンにより感作されたウサギやモルモットの抗血清の場合には、Plain BSA との反応性は全く観察されなかったが、本文中にも記したように、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを使って感作したマウスの抗血清には、Plain BSA と反応して、ある程度の PCA を惹起するものもあった。もっとも、このキャリアー蛋白質部分の関与は、レシピエントとして用いるラットに、抗血清の皮内注射の直前に BSA を静注しておくことによって完全に消去された。この処置は抗血清の抗ハプテン抗体価にはほとんど影響を与えなかったため、ハプテン相互間の交差反応性を検定するのに極めて好都合であった。さらに、念の為、どの抗血清と組み合わせても PCA を起こさない卵白アルブミン (OVA) をキャリアーとし、種々の薬剤の OVA 結合体をつくり、それらを誘発抗原として再検討したが、上述の BSA 結合体を使用した場合と同様の交差反応パターンがえられ、検定が正当に行なわれたことを裏付けることになった。

CCL と他剤との交差反応性は反応系によって必ずしも一致しなかったため統一的に論じることは容易でない

Table 7 Cross-reactivity of CCL and other antibiotic haptens in the passive hemagglutination test using rabbit antisera

Antiserum	SRBC tanned and coated with	PHA titer (-log <sub>2</sub> Titer)
Anti-CCL-BGG	CCL-BSA	16
	PCG-BSA	7
	ABPC-BSA	7
	CET-BSA	7
	CEZ-BSA	7
	BSA	6
	None	6
Anti-PCG-BGG	PCG-BSA	12
	CCL-BSA	6
	BSA	7
	None	6
Anti-ABPC-BGG	ABPC-BSA	13
	CCL-BSA	8
	BSA	5
	None	6
Anti-CET-BGG	CET-BSA	12
	CCL-BSA	6
	BSA	7
	None	6
Anti-CEZ-BGG	CEZ-BSA	12
	CCL-BSA	8
	BSA	6
	None	4

が、実験成績を総括して次のことが云えよう。CCL との交差反応性が最も著しかったのは CEX であり、試験したどの実験系でも、CEX・BSA を誘発抗原とした場合の抗 CCL・BGG 血清の抗体価は、対応抗原 CLL・BSA を用いた場合のそれと近似していた。CEX と CCL は化学構造が互いに酷似している (セファロsporin 核 3 の位置における CH<sub>3</sub> と Cl の相違のみ) ので交差反応性が高く当然である。CEX について CET や ABPC との交差反応性が注目された。これらの 2 種類のハプテンとの交差反応は多くの反応系でみとめられたが、反応系によっては観察されないこともあった。この 2 者の中では CET との交差反応の方がより顕著であった。一般に、β-ラクタム抗生物質の免疫学的特異性の決定には、ペニシリン核やセファロsporin 核の構造よりも、6 位 (ペニシリン) や 7 位 (セファロsporin) 側鎖の構造が大きな役割を演じている<sup>9)</sup> と推定されている。ABPC は CEX や CCL と同じく、側鎖としてフェニルグリシル基を有しているが、このことが交

Table 8 Minimal essential concentration (mg/ml) of antibiotics to produce *in vitro* direct COOMBS' reaction

Blood donor (Blood group type)	Coombs reagent*	CET	PCG	CEZ	CEX***	CCL**	CCL***
M.T. (Type O)	A	5	40	>40		>5	
	B	5	40	>40		>5	
	C	5	40	>40		>5	
Y.N. (Type O)	A	10	>40	>40		>5	
	B	10	40	>40		>5	
	C	5	40	>40		>5	
H.N. (Type A)	A	5	40	>40		>5	
	B	5	40	>40		>5	
	C	5	40	>40		>5	
M.H. (Type A)	A	5	40	>40	>3.5		>3.5
	B	5	40	>40	>3.5		>3.5
	C	5	40	>40	>3.5		>3.5
M.M. (Type A)	A	5	40	>40	>3.5		>3.5
	B	5	40	>40	>3.5		>3.5
	C	5	40	>40	>3.5		>3.5

\*) A: Kokusai-Shiyaku, B: Tokyo Hyojun-Kessei, C: Ortho

\*\*) Dissolved by incubating at 50°C for 5 minutes

\*\*\*) Dissolved at room temperature

差反応性の主要因であるとは考え難い。というのは、どの反応系においても、抗 CCL 抗体は ABPC・BSA 抗原と反応しなかったからである。また、同じ側鎖をもつ ABPC 以上に、側鎖の異なる CET の方が強い交差反応性を示したことからみても、側鎖部分ばかりでなく、むしろ、核の部分や分子全体の立体的構造の方が特異性決定因子としてより重要な場合もあるということが示唆される。さらに、ABPC や CET 以外の抗生物質が交差反応性を示すこともあった。即ち、ウサギの抗 CEZ・BGG 血清が CCL・BSA と反応して PCA を起こし、また、沈降線を形成したし、PCG・BGG 感作モルモットに CCL・BSA を静注するとアナフィラキシー・ショックが観察された。もっとも、PCG や CEZ と CCL との交差反応は少数の反応系に限ってみとめられたに過ぎなかった。このように、上記の結果を通覧すると、程度の上で、また、一般性の上で差はあるものの、CCL は用いた 5 種類の対照薬物のいずれとも、何らかの反応系において交差反応を起こすと見なされる。一口でいうと、CCL ハプテンの特異性は、他の  $\beta$ -ラクタム抗生物質で経験しているより、かなり低いように思われる。それは、特異性決定に CCL ハプテン分子全体の概略的な立体的輪廓が関与するところが大きいからではないかと推察される。

検定方法によって交差反応のパターンが必ずしも一致

しないという点に関しては、現在のところ、適切な説明を下すことはできないが、最も主要な要因としては、まず、抗体産生動物の種の違いをあげることができよう。動物によって生じた抗体の特異性に差が出ることは他にも例がある<sup>3,10</sup>が、CCL の場合、他の例に比べてかなり多様であった。次に考慮すべきは抗血清採取時期、云いかえると、免疫の強さである。我々の予備実験によると、CCL・BGG の FCA エマルジョンで免疫されたモルモットの血清と CET・BSA との交差反応が、初期血清については弱く、高度免疫状態では高いことが示された。このような現象が他剤に対する抗血清についても起こりえるとすれば、たとえ、同じ動物種由来の抗血清でも、血清調製の条件によって異なった交差反応パターンを与えることになるかもしれない。この点に着目して再検討を行なう必要も生じるかもしれない。さらに興味深いのは、同じ種、同じ免疫条件であっても検定法の相違によって結果が変動する場合があるということ、たとえば、PCG・BGG や CET・BGG で感作されたモルモットのアナフィラキシー試験では CCL・BSA が交差反応を呈するの、これらの感作動物の血清による PCA 試験では CCL・BSA は誘発原とならなかった。このくいちがいのについては、能動的組織感作が IgG<sub>1</sub> 型の Homocytotropic antibody によるのではなく、特異性の幅を異にする IgE 抗体によって達成されているからではない

かという可能性が考えられ、目下、検討中である。

以上の論議は、あくまでも、薬剤の蛋白結合体を免疫原や誘発抗原として使用した実験的反応系での交差反応に関するものである。実際の臨床適用のように薬剤そのものを投与するという条件では事情は異なり、交差反応が起こる可能性は著しく低くなるものと予想される。というのは、CET<sup>11)</sup> や PCG<sup>12)</sup> には、薬剤そのものに誘発抗原性があるということが報告されているが、CCL には誘発抗原性がみられないということが C<sub>3</sub>H/He マウスの抗 CCL・BGG 血清によるラット PCA で明らかになされたからである。

CCL は CEX と同様、水に難溶であり、したがって、他の対照薬剤と同じような濃度でクームス反応陽性化作用を検定することはできなかった。できるだけ高濃度で作用させるということを目的として、室温飽和あるいはやや加温して溶解させた溶液を血液に加えたが反応は陰性であった。さらに、血液に直接溶かし込む(この場合の濃度は約 7 mg/ml と推定された)という試みも行なったが、やはり反応は陰性であった。上述の結果より、少なくとも、CCL の作用は、CET のそれを越えるものではないと考えられる。既に報告したように<sup>6)</sup>、直接クームス反応を陽性化させるには、作用の最も強い CET の場合でも、血液とのインキュベーションを 3 時間行なうことが必要であった。CCL の排泄は速やかであり、ヒトに、通常量を投与する場合、3.5 或いは 5 mg/ml という血中濃度が 3 時間も維持されるということは考え難く、この薬剤の臨床使用において、クームス反応陽性化作用を介した副作用が惹起されるという可能性は小さいものと推察される。

## 文 献

- 1) LEVINE, B. B. & Z. OVARY: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D- $\alpha$ -benzyl penicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for the hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875~904, 1961
- 2) EBATA, M.; Y. MIYAKE & J. UCHIDA: A quantitative assay of covalently bound cephalosporin derivatives in cephalosporin-protein conjugates. J. Antibiot. 29: 665~666, 1976
- 3) 原田 稔, 竹内三津男, 新家泰子, 江幡光雄: Cefamandole の抗原性。Chemotherapy, 27(S-5) : 627~634, 1979
- 4) HARADA, M.; M. TAKEUCHI, T. FUKAO & K. KATAGIRI: A simple method for the quantitative extraction of dye extravasated into the skin. J. Pharm. Pharmacol. 23: 218~219, 1971
- 5) 西岡久寿弥, 岡田英親: 凝集反応。蛋白質・核酸・酵素 11: 1506~1508, 1966
- 6) 原田 稔, 竹内三津男, : Cefamandole の *in vitro* クームス反応陽性化作用。Chemotherapy 27 (S-5): 635~638, 1979
- 7) CHASE M. W: Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. Proc. Soc. Exp. Biol Med. 61: 257~258, 1946
- 8) 村中正治: 免疫学からみた薬剤アレルギーの基本問題。臨床免疫 6: 89~96, 1974
- 9) SHIBATA, K.; T. ATSUMI, Y. HORIUCHI & K. MASHIMO: Immunological cross-reactivities of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin (penicillin G). Nature 212: 419~420, 1966
- 10) 新家泰子, 竹内三津男, 原田 稔:  $\beta$ -ラクタム抗生物質に対するウサギの Homocytotropic antibody (I) anti-BPO 抗体の産生とその性質。アレルギー 28: 199, 1979
- 11) 竹内三津男, 新家泰子, 原田 稔: モルモットにおけるセファロシンの PCA 誘発能。アレルギー 28: 200, 1979
- 12) MURAKAWA, M.; H. IGARASHI, K. KOIZUMI, H. OKUMURA, K. TAKEDA & S. SUZUKI: Elicitation of homologous passive cutaneous anaphylactic reactions by a benzylpenicillin preparation. J. Allergy and clin. Immunol. 54: 329~338, 1974

## IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF CEFACLOR

MINORU HARADA, MITSUO TAKEUCHI, MITSUNOBU MATSUMOTO,  
MASAKO KOIKE, and MITSUO EBATA  
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

Some immunological properties of cefaclor (CCL) were examined in the experimental animals.

1) In the three mouse strains tested, multiple injections of plain CCL emulsified with FREUND's complete adjuvant failed to produce the antibodies of either class of IgE or IgG<sub>1</sub>. Under the same condition, plain Cephalothin (CET) and Penicillin-G (PCG) induced the definite antibody response in some mice of any strains tested. Therefore, it is at least safe to state that the immunogenicity of CCL is much lower than those of these two antibiotics.

2) Immunological cross-reactivity between CCL and other analogous antibiotics was determined using the protein conjugates of them as both immunogens and eliciting antigens. The results were not always consistent depending on the reaction systems such as the assay methods and origins of antibodies used (i.e., animal species and the timing for the antiserum preparation). But summarizing the results, the following comments would be presented. The cross-reactivity was highest between CCL and Cephalexin which was observed in all the reaction systems examined. Also, CET and Ampicillin cross-reacted with CCL in a number of reaction systems, but PCG and Cefazolin did not except for in a very few cases. So far as tested, plain CCL lacked eliciting antigenicity in the presensitized animals. Therefore cross-reactivity between plain CCL and other  $\beta$ -lactam antibiotics would be estimated to be much less than evaluated at the antibiotic-protein conjugate level.

3) CCL failed to produce the *in vitro* direct COOMBS reactions even at ca. 5 mg/ml which was the highest concentration testable because of its low solubility.