

Cefotaxime の主代謝産物 (Desacetyl-cefotaxime) の免疫学的挙動

田中幸子・井上 勉・桜井真夫・藤本和巳

ヘキストジャパン株式会社総合開発研究所

(昭和 55 年 4 月 7 日受付)

Cefotaxime (CTX) の主代謝産物である Desacetyl-CTX について、その免疫学的挙動を抗原性、CTX および他の抗生物質との交差反応性、試験管内直接クームス試験により検討した。

Desacetyl-CTX 自体を免疫原としてモルモットに投与したが、母化合物 (CTX) と同様抗体は産生されなかった。Desacetyl-CTX の蛋白結合物を免疫原とした時、CTX, cefazolin (CEZ), cephaloridine (CER), cephalothin (CET) および benzylpenicillin (PCG) の場合と同様に、その蛋白結合物に対する抗体が産生された。その PCA 抗体価は、CTX の場合の約 1/2 であった。

Desacetyl-CTX は、母化合物と交差反応性を示したが、CEZ, CER, CET および PCG との間に交差反応性は認められなかった。

試験管内直接クームス試験において、Desacetyl-CTX のクームス陽性化能は、CTX のそれらに比べて 1/2 以下であった。

摘 要

Cefotaxime(CTX) は、Hoechst 社と Roussel Uclaf 社により共同開発された、下記の化学構造を有する新しいセファロスポリン系抗生物質で、グラム陰性菌に対し強い抗菌力を示すとともに、広い抗菌スペクトルを有し、かつ β -Lactamase にも強い抵抗性を示すことが知られている¹⁾。

すでに著者らは、CTX の免疫学的挙動について検討し、本薬は他のセファロスポリン系抗生物質および PCG とほとんど交差反応性を示さず、クームス陽性化能も比較的弱いことを明らかにした²⁾。

CTX は 3 位に Acetoxymethyl 基を有するので、人に投与した時、母化合物に比べてはるかに低濃度ではあ

るが、血漿中に Desacetyl-CTX が検出され、尿中には投与量の約 15% が排泄される³⁾。

今回、この Desacetyl-CTX の免疫学的挙動を、母化合物および他の抗生物質と対比しながら、抗原性、交差反応性について検討するとともに、試験管内直接クームス試験を実施検討した。

実 験 材 料

(1) 抗生物質

Cefotaxime (Na 塩, CTX)

Desacetyl-CTX

Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品)

Cephaloridine (CER, 鳥居薬品)

Cephalothin (CET, 塩野義製薬)

Benzylpenicillin (PCG, 明治製薬)

(2) Carrier protein および Adjuvant

Bovine serum albumin (BSA, SIGMA)

Rabbit serum albumin (RSA, Fr. V, Miles)

Freund's complete adjuvant (FCA, Difco)

(3) 使用クームス血清

Ortho 製クームス血清

国際試薬製クームス血清

(4) 使用血液

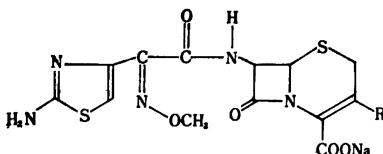
正常ヒト O 型血液 (血液凝固阻止剤: ACDA 液)

(5) 動物

ウサギ (白色在来種, 雄, 体重 3 kg 前後)

モルモット (Hartley 系, 雄, 体重 350 g 前後)

Fig. 1 Chemical structures of cefotaxime (CTX) and desacetyl-CTX



R=CH₂OCOCH₃ CTX

R=CH₂OH Desacetyl-CTX

R=CH₂OCOCH₃ CTX

R=CH₂OH Desacetyl-CTX

実験方法

I. Desacetyl-CTX-蛋白結合物の調製

Desacetyl-CTX 600 mg と BSA または RSA 100 mg を Veronal 緩衝液 (pH 8.5) 10 ml に溶解し, 1N-NaOH で pH 8.5~11.0 に調整しながら, 37°C, 24 時間 incubate した。この反応液を pH 8.0 の生理食塩液を用い, 6 日間 4°C で透析し, 未反応の Desacetyl-CTX を除去して得た, Desacetyl-CTX 蛋白結合物を抗原として用いた。CTX, CEZ, CER, CET および PCG-蛋白結合物も同様に調製した。

II. Desacetyl-CTX を免疫原とした場合の抗原性

1. モルモットの免疫

1 群 7 匹のモルモットを用いた。2% および 20% Desacetyl-CTX, あるいは 2% CTX の水溶液と FCA の等量 Emulsion 0.2 ml を, 隔日 3 回, 動物の足趾あるいは腋下皮下に投与した。最終投与から 3 週間後, 心穿刺により採血し血清を分離した。

2. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

1 群 3 匹のモルモットの除毛した背部皮膚に, 2 倍段階希釈した上述の Desacetyl-CTX, あるいは CTX 処置モルモット血清各 0.1 ml を皮内投与した。投与 4 時間後に, 各々の BSA 結合物と生理食塩液に溶解した 1% Evansblue の等量混合液 1 ml を, 耳介静脈から注射した。注射 30 分後に動物を放血致死させ, 背部皮膚を剥離し, 局所の毛細血管透過性亢進による漏出色素斑の直径を計測した。直径 5 mm 以上の青色斑を示す抗血清の最大希釈倍数を, PCA 抗体価とした。

III. Desacetyl-CTX-蛋白結合物の投与時における抗原性および交差反応性

1. 免疫方法および抗血清の作製

抗原 (Desacetyl-CTX-BSA 結合物) と FCA の等量 Emulsion 2 ml を, 週 2 回 4 週間, ウサギの足趾, 背部皮下および腎筋に分割投与した。最終投与 9 日後に, さらに Desacetyl-CTX だけ 60 mg を皮下投与し, その 6~12 日後採血, 血清を分離した。CTX, CEZ, CER, CET および PCG についても同様に実施した。

2. PCA

1 群 4~5 匹のモルモットを Recipient として用い, 除毛した背部皮膚に, 2 倍段階希釈した各抗血清および対照の正常ウサギ血清各 0.1 ml を注射した。注射 4 時間後に, 抗原 (各抗生物質-RSA 結合物) と生理食塩液に溶解した 1% Evans blue の等量混合液 1 ml を耳介静脈から注射し, その 30 分後に動物を放血致死させ, 背部皮膚を剥離し, II-2 の判定規準に従って PCA 抗体価を求めた。

IV. 試験管内直接クームス試験

MOLTHAN からの方法に従い, 血液凝固阻止剤を加えたヒト O 型血液 1 ml を, 生理食塩液に溶解した種々の濃度の抗生物質溶液 1 ml 中に加えた後, 37°C で 3 時間 incubate し, 遠心分離後, 赤血球沈渣を多量の生理食塩液で繰り返し 3 回洗浄した。この洗浄赤血球を生理食塩液で 2% 血球浮遊液とし, その 25 μ l にクームス血清を等量加え, 混和し, 4°C で 1 夜放置した後, 血球凝集の有無を観察し, 凝集の強さを 4 段階 (一, 土, +, 卍) 表示で示し, + 以上を陽性とした。なお血液は 2 人の Donor からの O 型血液を用い, クームス血清も 2 社のものを使用した。

実験結果

1. Desacetyl-CTX を免疫原とした場合の抗原性

モルモットに 2% および 20% Desacetyl-CTX, あるいは 2% CTX を処置しても, 同種 PCA 試験において抗体は検出されなかった。

2. Desacetyl-CTX 蛋白結合物投与時の抗原性及び交差反応性

Desacetyl-CTX の場合も他の対照薬の場合と同様に, その BSA 結合物に対する PCA 抗体が産生された。産生された抗血清の PCA 抗体価は, Desacetyl-CTX で 512~1,024, CTX ではその約 2 倍の 1,024~2,048 であった。PCG では 2,048~4,096 と最も高い値を示し, CET での抗体価は Desacetyl-CTX でのそれとほぼ等しかった。CEZ と CER では比較的低値で, それぞれ 128~256, 128 であった。

次に, これらの抗生物質間の交差反応性を PCA 反応で検討した。Desacetyl-CTX と CTX は互いに高い交差反応性を示し, その強さは Homologous な系の場合と全く変わらなかった。しかし, 両者とも他の抗生物質との交差反応性は認められなかった。CEZ はいずれの薬剤とも交差反応を示さなかった。一方, CER, CET および PCG の 3 薬物間では明らかな交差反応性がみられ, とくに CER, CET の交差反応性は, Homologous な系の反応性とほぼ同程度であった (Table 1)。

III. 試験管内直接クームス試験

実験結果は Table 2 に示した。使用したクームス血清の違いにより, クームス陽性化能には若干の違いはあったが, A, B 両血液とも同様の成績を示した。

Ortho 製クームス血清の場合, クームス陽性化に必要な濃度は Desacetyl-CTX で 80 mg/ml, CTX では 40 mg/ml で, Desacetyl-CTX は母化合物に比べて 2 倍の濃度を要した。国際製薬製クームス血清を使用したときには, CTX では 80 mg/ml を要し, Desacetyl-CTX では適用し得る最高の濃度である 80 mg/ml でも明らかな陽性化は認められなかった。

Table 1 Cross-reactions among desacetyl-CTX, CTX, CEZ, CER, CET and PCG in PCA reactions

Antibody	Animal No.	Antigen					
		Desacetyl-CTX-RSA	CTX-RSA	CEZ-RSA	CER-RSA	CET-RSA	PCG-RSA
Anti-desacetyl-CTX-BSA	1	1,024	1,024	—	—	—	—
	2	1,024	512	—	—	—	—
	3	1,024	512	—	—	—	—
	4	512	512	—	—	—	—
	5		512		—		
Anti-CTX-BSA	6	2,048	2,048	—	1	—	—
	7	2,048	2,048	—	—	—	—
	8	2,048	2,048	—	—	—	—
	9	1,024	1,024	—	—	—	—
	10		1,024				
Anti-CEZ-BSA	11	—	—	256	—	—	—
	12	—	—	128	—	—	—
	13	—	—	128	—	—	—
	14	—	—	128	—	—	—
	15						
Anti-CER-BSA	16	—	—	—	128	256	64
	17	—	—	—	128	256	32
	18	—	—	—	128	256	32
	19	—	—	—	128	128	32
	20					128	
Anti-CET-BSA	21	—	—	1	1,024	1,024	1,024
	22	—	—	1	1,024	1,024	512
	23	—	—	—	512	512	512
	24	—	—	—	512	512	512
	25						
Anti-PCC-BSA	26	—	—	—	2,048	1,024	4,096
	27	—	—	—	1,024	1,024	4,096
	28	—	—	—	1,024	1,024	4,096
	29	—	—	—	1,024	512	2,048
	30						

Each value represents PCA titer. Guinea pigs were used as recipients.

考 察

低分子薬物による薬剤 allergy の発現機序の1つとして、母化合物だけでなく代謝産物が生体内蛋白等の高分子化合物と結合することにより、抗原性を示す場合のあることが知られている¹⁾。従って、薬物の抗原性を検討するとき、母化合物だけでなく、その代謝産物の免疫学的挙動を検討することが重要となる。

すでに著者らは、母化合物 (CTX) の免疫学的挙動について検討し、次のことを明らかにした。

① CTX を免疫原として動物に処置し、CTX 単独を誘発抗原として用いた時、抗体は検出されなかった。

② CTX の蛋白結合物で免疫すると、従来の β -ラクタム系抗生物質と同様に抗体が産生される。

③ CTX は CEZ, CER, CET および PCG とほとんど交差反応性を示さない。

④ クームス陽性化能も、CEZ と同様に比較的弱い²⁾。

今回は、CTX の 3 位の Acetoxymethyl 基が脱 acetyl 化された Desacetyl-CTX の免疫学的性質について、母化合物および他の抗生物質と比較しながら検討した。

Desacetyl-CTX または CTX を処置したモルモットの血清により、それぞれの BSA 結合物を誘発抗原とし

Table 2 *In vitro* direct COOMBS' tests of antibiotic-sensitized human red blood cells

Normal human blood	COOMBS' reagent	Antibiotic	Final concentration (mg/ml)					
			0	5	10	20	40	80
A	Ortho ^a	Desacetyl-CTX CTX	-	-	-	-	-	+
			-	-	-	-	+	+
	International ^b	Desacetyl-CTX CTX	-	-	-	-	-	±
			-	-	-	-	-	+
B	Ortho	Desacetyl-CTX CTX	-	-	-	-	-	+
			-	-	-	±	+	+
	International	Desacetyl-CTX CTX	-	-	-	-	-	±
			-	-	-	-	-	+

^a Ortho Pharmaceutical Corporation

^b International Reagents Corporation

て PCA を行なったが、ともに抗体は検出されなかった。これは CTX とともに Desacetyl-CTX は免疫原性を持たないことを示している。

抗血清の抗体価は CTX の場合に比べてやや低かったが、Desacetyl-CTX の BSA との結合物では、CTX および従来のセファロスポリン系抗生物質の場合と同様に抗体産生がみられた。この事実は、蛋白と化学的に結合させた状態では、Desacetyl-CTX は CTX および他の抗生物質と類似の免疫学的挙動を示すものと考えられる。

今回の実験条件下では、Desacetyl-CTX は、CTX 以外の対照として用いた既知抗生物質との間に交差反応性は認められなかった反面、CTX との間でそれぞれの homologous な系における反応性とほとんど変わらない程度に強い交差反応性がみられた。これは、化学構造上 7 位の側鎖が全く同じで 3 位の側鎖だけ異なる Desacetyl-CTX と CTX は、極めて似た免疫学的特異性を有していることを示している。この事実は、セファロスポリン系抗生物質の免疫学的特異性は、主に 7 位のアシル側鎖に依存しているという考え^{6,7)} を支持するものであろう。

試験管内直接クームス試験において、Desacetyl-CTX で、クームス陽性化に CTX の 2 倍以上の濃度が必要であった事実は、赤血球に対する Desacetyl-CTX の作用は、CTX に比べてさらに弱いものと思われる。

以上のことから、Desacetyl-CTX の免疫学的挙動は CTX のそれと酷似しており、その抗原性および赤血球に対する作用は CTX のそれを凌ぐことはなく、むしろやや弱いものと考えられる。

文 献

- 1) HEYMES, R.; A. LUTZ & E. SCHRINNER: Experimental evaluation of HR756, a new cephalosporin derivative: Preclinical study. *Infection* 5: 259~260, 1977
- 2) 田中幸子, 北川 寛, 小峰 勇, 板井真夫, 藤本和巳: Cefotaxime (HR 576) の免疫学的挙動について。第 28 回日本化学療法学会総会抄録集, p.369, 1979
- 3) JOHNSON, P.; R. GLOMOT & M. KRAMER: HR 756. Kinetics, metabolism and toxicology. Interscience Conference on Antimicrobial Agents on Chemotherapy. Sept. 1978
- 4) MOLTAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct Coombs' tests due to cephalothin. *New Engl. J. Med.* 277: 123~125, 1967
- 5) 日本製薬工業協会安全性委員会編: 化学物質安全性評価の実際, 4. 薬物アレルギー, p.287, 薬業時報社, 1975
- 6) MINE, Y.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. IV. Antigenicity of cefazolin and its cross reactivity with benzylpenicillin, ampicillin and cephaloridine. *J. Antibiotics* 23: 195~203, 1970
- 7) SHIBATA, K.; T. ATSUMI, Y. HORIUCHI & K. MASHIMO: Immunological cross-reactivities of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin. *Nature* 212: 419~420, 1966

IMMUNOLOGICAL BEHAVIOR OF DESACETYL-CEFOTAXIME, A MAIN METABOLITE OF CEFOTAXIME

SACHIKO TANAKA, TSUTOMU INOUE, MASAO SAKURAI and KAZUMI FUJIMOTO
Research and Development Laboratories, Hoechst Japan Limited

Immunological behavior of desacetyl-cefotaxime, a main metabolite of cefotaxime (CTX), was investigated by testing it for antigenicity, cross-reactivity with CTX and other antibiotics, and *in vitro* direct COOMBS' reaction.

In guinea pigs, antibodies against desacetyl-CTX were not produced, like against the parent compound (CTX), when it was given without being conjugated with protein. However, they were formed, like against CTX, cefazolin (CEZ), cephaloridine (CER), cephalothin (CET) and benzylpenicillin (PCG), when the metabolite was administered in the form of conjugate with protein. Antisera against desacetyl-CTX showed 1/2 PCA titer of those against CTX.

Desacetyl-CTX cross-reacted with CTX but not with CEZ, CER, CET and PCG in PCA reaction. The metabolite had less than 1/2 the ability of CTX to give positive *in vitro* direct COOMBS' reaction.