

## 新しい注射用セファロスポリン、Ceftizoxime (CZX) の 免疫学的研究

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

Ceftizoxime (CZX, FK 749) の免疫学的性状を CEZ, CET および PCG を対照として比較した。CZX と血清タンパクとの結合体, あるいは CZX ハプテン溶液を Freund's complete adjuvant による乳化液としてウサギを免疫, または CZX と血清タンパクとの結合体を水酸化アルミニウムゲルと共にマウスを免疫すると, 本物質に特異的な抗体 (IgG, IgM および IgE 型) を産生する。CZX によるこれらの抗体の産生は CEZ と同程度で, CET および PCG より軽度であった。CZX と CEZ, CET および PCG との免疫学的交差性は弱かった。CZX のヒト血清アルブミンとの共有結合分子数は, タンパク1モル当り3.4モルで, CEZ と同程度であった。CZX の *in vitro* クームス陽性化能は CEZ と同程度で, CET および PCG より弱かった。

新しく開発された注射用 cephalosporin 誘導体, CZX の抗菌力および吸収排泄については, すでに報告した<sup>1,2)</sup>。今回, 本剤の免疫学的特性, すなわち抗原性, 他の cephalosporin 類および Penicillin G との免疫学的交差性, 人血清アルブミンとの共有結合性および *in vitro* クームス陽性化能について検討したので, その結果を報告する。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 使用抗生物質

Ceftizoxime (CZX, lot. 302174 S, 藤沢薬品工業・中央研究所), Cefazolin (CEZ, lot. ZA 6687 J, 藤沢薬品工業), Cephalothin (CET, lot. 478, 鳥居薬品工業), Potassium benzylpenicillin (PCG, lot. G 112134008, 台糖ファイザー), または lot. 000175 A, 藤沢薬品工業・中央研究所

#### 2. Carrier protein

Bovine  $\gamma$ -globulin (BGG, Bovine plasma FR II, Armour Pharm. Co., Ltd., lot. MIF 8969), Rabbit serum albumin (RSA, Nutritional Biochem. Co., Ltd., lot. 9740), Human serum albumin (HSA, Albumin human FRV, ICN Pharmaceutical Inc., lot. 9215)

#### 3. 抗ヒトグロブリン血清

オルソクームス血清 (lot. R 7871-2, Ortho Diagnostic Inc.), DADE クームス血清 (lot. G-222 YN, DADE Division American Hospital Supply Corp.)

#### 4. 免疫補助剤

Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories),

水酸化アルミニウムゲル (Alum) は, LEVINE & VAZ<sup>3)</sup>の方法に準じて調製した。

#### 5. 動物

正常家兎 (日本白色在来種, 雄, 2.0~2.3 kg), マウス (BALB/C, 雄, 11週令), ラット (JCL:SD 系, 雄, 8~11週令)

#### 6. 抗原の調製法

1) 免疫抗原: RSA の50 mg と抗生物質の200 mg を M/125 veronal buffer (pH 8.5) の5 ml に溶解し, 37°C で24時間反応させた。これを同じ buffer で4°C, 6日間透析し, 未反応の抗生物質を除去した。この操作で調製した免疫抗原の RSA モル当りの各抗生物質の共有結合モル数は, CZX で12.1モル, CEZ で16.5モル, CET で23.8モルおよび PCG で30.2モルであった。

2) 反応抗原: BGGの50 mg と抗生物質の200 mg を5 ml の M/125 veronal buffer (pH 8.5) に溶解し, 37°C で24時間反応させた。これを同じ buffer で4°C, 6日間透析し, 未反応の抗生物質を除去した。この操作で調製した反応抗原の BGG モル当りの各抗生物質の共有結合モル数は CZX で27.5モル, CEZ で20.1モル, CET で29.1モルおよび PCG で17.5モルであった。

#### 7. 免疫方法

##### 1) IgG および IgM 型抗体の産生

白色家兎を通常の方法により免疫した<sup>4)</sup>。すなわち, CZX: RSA 結合物, または CZX の40 mg/ml 溶液の4 ml を Freund's complete adjuvant の4 ml と混合し乳化した。この乳化液2 ml を, それぞれ4羽のウサギの

背部皮下, 数カ所に投与した。免疫は7日間隔で10回行ない, 初回免疫から7日, 20日, 34日, 49日および71日目に採血し, 抗体価を測定した。

## 2) IgE 型抗体の産生

タンパク量として10  $\mu$ g/ml の CZX:RSA 結合物の溶液と0.15 M 食塩を含む M/15 phosphate buffer (pH 7.0) に30 mg/ml の濃度に懸濁した水酸化アルミニウム (Alum) を等量混合した。この混合液の0.2 ml をマウスの腹腔内に投与した。投与から14日および21日目にマウスの眼窩静脈叢から, マイクロピペットで0.1 ml を採血し, 50単位のヘパリンを含む M/15 phosphate buffer saline (pH 7.0) の0.2 ml と混合した。この混合液の上清を, ヘマトクリット値を50%として計算し, 5倍希釈液を得た<sup>5)</sup>。

## 8. 赤血球凝集反応

Lev らの方法<sup>6)</sup>により抗生物質の感作血球を作製し, この1%感作血球生食浮遊液の25  $\mu$ l を, 56°C, 30分非働化した抗血清の2倍系列希釈液0.3 ml にそれぞれ加えた。37°C で1時間静置後, さらに4°C で1夜静置した。検鏡により凝集性を判定し, 凝集を示す血清の最大希釈倍数を凝集力価 (抗体価) とした。交差性は抗血清と異種の抗生物質により感作された感作血球 (抗原) との反応による凝集力価を同種の抗原抗体系による凝集力価と比較した。

## 9. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

各種のハプテン (抗生物質) 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, それぞれに4単位の非働化した抗血清0.5 ml を加えた。これを4°C で1夜反応させた後, 反応液の0.3 ml に抗体と同種の抗生物質で感作した1%感作血球の25  $\mu$ l を加えた。37°C で1時間静置後, さらに4°C で1夜静置した。検鏡により凝集性を判定し, 凝集反応を100%阻止するのに必要な最少ハプテン濃度を求めた。

## 10. 定量沈降ハプテン阻止反応

各種のハプテンを冷却した M/15 phosphate buffer saline (pH 7.8) に溶解し, 0.5 ml ずつの希釈系列を作った。それぞれに抗血清を加え, 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。通常の方法により, 沈降抗体量から50%阻止するのに必要なハプテンの濃度を求めた<sup>7)</sup>。

## 11. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA 反応)

### 1) IgG 型抗体の抗体価

モルモットの背部皮内に, 抗血清の2倍連続希釈液の0.1 ml を感作し, 3時間後抗原 (BGG 結合物) とエバンスブルー混合液を肢静脈内に投与した。30分後に皮膚裏面の反応部位の色素出現を観察し, 色素出現を示す抗

血清の最大希釈倍数で PCA 抗体価を表わした<sup>8)</sup>。

### 2) IgE 型抗体の抗体価

IgE 型抗体の抗体価の測定は, ラットによる PCA 反応により行った<sup>9)</sup>。すなわち, 5倍希釈抗血清を原液とし, その2倍連続希釈液のそれぞれ0.1 ml を, ラットの背部皮内に感作した。48時間後, 抗原 (BGG 結合物) の1 ml と5%エバンスブルー液0.25 ml の混合液を, ラット1匹当たり1 ml ずつ肢静脈内に投与した。30分後に背部皮膚面に現われた反応部位の色素出現を観察し, 直径3 mm 以上の反応を示す抗血清の最大希釈倍数で, IgE 型抗体価を表わした。

## 12. 共有結合分子数の測定

1) 抗原の共有結合分子数: 6で調製した抗原溶液を用い, cephalosporin 系抗生物質は Little らの方法<sup>10)</sup> で, Penicillin G は, penamaldate 法<sup>11)</sup> により算出した。

2) 生理条件下におけるヒト血清アルブミンとの共有結合性: human serum albumin の50 mg と抗生物質の200 mg を M/15 phosphate buffer (pH 7.0) の5 ml に溶解し, 37°C で24時間静置する。未反応の抗生物質を除去するため, M/15 phosphate buffer (pH 7.0) 中で4°C, 6日間透析する。この反応液について cephalosporin 系抗生物質は, Little の方法, Penicillin G は penamaldate 法により結合数を測定した。

## 13. *In vitro* クームス陽性化反応

正常ヒト“O型”血液の12 ml に ALSEVER'S 溶液4 ml を加え, 生理食塩水に溶解した抗生物質の種々の濃度液0.25 ml に, 血液0.5 ml をそれぞれ加え, 37°C で3時間放置した。反応後, 1,000 r. p. m. で3分間遠心し, 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。この感作血球の1滴にクームス試薬の1滴を加え, 1,000 r. p. m. で1分間遠心した後, 凝集の有無を観察した。凝集を示す抗生物質の最小濃度でクームス陽性化能を表示した。

## 実験結果

### 1. 抗原性

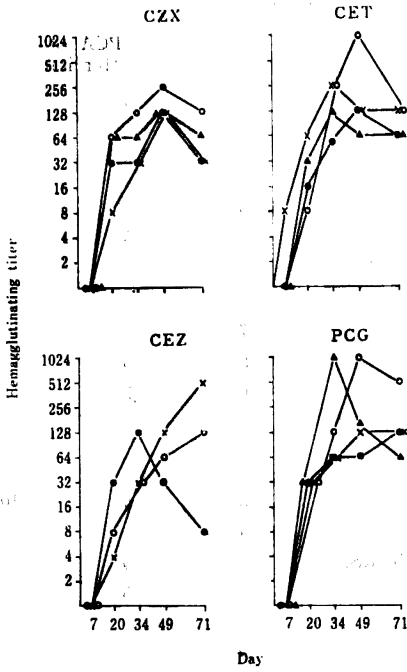
#### 1) CZX に対する IgG および IgM 型抗体の産生

##### (1) CZX:RSA 結合物による免疫

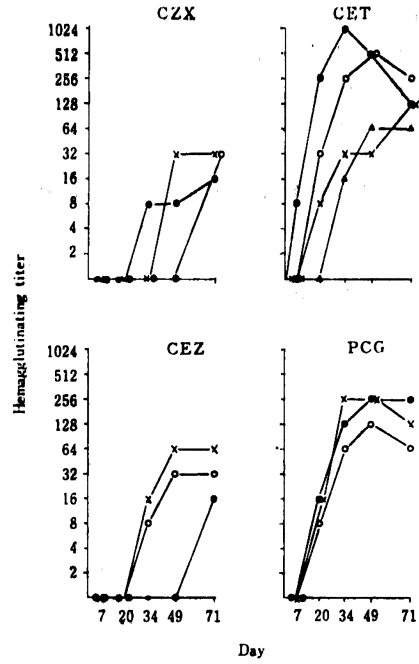
Fig. 1 は免疫原として CZX:RSA 結合物を用いた際の赤血球凝集抗体の産生の経過を各々のウサギ (4羽) について経日的に示した。対照として CEZ (3羽), CET (4羽) および PCG (4羽) を同様に処理して比較した。

CZX に対する赤血球凝集抗体は初回免疫開始から20日目にそれぞれのウサギに8~64倍の抗体価が認められ

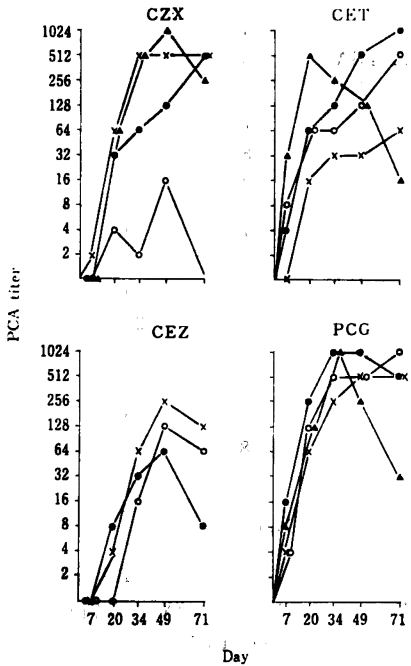
**Fig. 1** Production of hemagglutinating antibodies in rabbits immunized with CZX:, CEZ:, CET:, or PCG: RSA conjugates



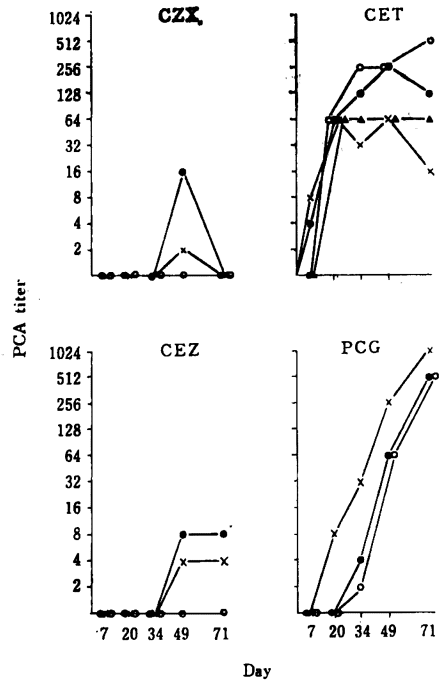
**Fig. 3** Production of hemagglutinating antibodies in rabbits immunized with CZX-, CEZ-, CET-, or PCG-hapten



**Fig. 2** Production of PCA antibodies in rabbits immunized with CZX:, CEZ:, CET:, or PCG: RSA conjugates



**Fig. 4** Production of PCA antibodies in rabbits immunized with CZX-, CEZ-, CET-, or PCG-hapten



た。抗体価は経日的に上昇し、免疫49日目には、最高128~256倍となった。

一方、CEZ, CET および PCG に対する抗体産生は、若干個体差がみられるが、免疫20日目頃から抗体の上昇が認められ、それぞれ最高128~512, 128~1024, 128~1024倍の抗体価を示した。

他方、同時に PCA 抗体の産生について検討し、Fig. 2 に示した。

CZX に対する抗体は、3例において最高512~1024倍、1例だけ16倍であった。同様に CEZ, CET および PCG についても若干個体差が認められるが、それぞれ最高64~256, 64~1024, 512~1024倍の抗体が得られた。

### (2) CZX ハプテンによる免疫

赤血球凝集抗体の産生は、Fig. 3 に示す。CZX は、CZX:RSA で免疫した時にくらべ、抗体産生が遅く、且つ抗体価が低かった(16~32倍)。また CEZ についても同様の傾向が認められ、最高16~64倍の抗体価を示した。それに反し、CET および PCG の場合、その抗体産生の上昇および抗体価は、それぞれの RSA 結合物で免疫した場合と近似し、それぞれ最高64~1024, 64~256倍を示した。

一方、PCA 抗体の産生は、Fig. 4 に示した。CZX は3例中2例に免疫49日目に最高2~16倍の抗体価が得られたが、RSA 結合物で免疫した場合にくらべ、はるかに低値であった。同様なことが CEZ についても認められ、16~64倍の抗体価が得られた。一方、CET および PCG の場合、その RSA 結合物で免疫した場合と同様、それぞれ64~512, 512~1024倍の高い抗体価を示した。

### 2) CZX に対する IgE 型抗体の産生

Table 1 に IgE 型抗体の産生を示した。CZX に対する抗体は、免疫14日目に9例中3例のマウスに認められ、抗体価は5倍であった。CEZ に対し9例中4例に5倍、CET に対し9例中5例に5~20倍および PCG に対し全例(9例)に5~40倍の抗体価が認められた。一方、免疫21日目の CZX に対し、新たに2例のマウスに5~10倍の抗体価が認められた。しかし、14日目に認められた2例のマウスには抗体は認められなかった。同様なことが CEZ (4例)、CET (4例) および PCG (6例) にも認められ5~10倍の抗体価を示した。以上の成績のように、マウスにおける IgE 型抗体産生能には、かなりの個体差が認められた。

### 2. 免疫学的交差性

抗原性の検討の項で得られた IgM および IgG 型抗体を用いて、交差性を検討した。

#### 1) 赤血球凝集反応

Table 1 Production of IgE type antibody in mice (BALB/C) immunized with CZX:, CEZ:, CET:, or PCG:RSA conjugates

Immunogen	Mouse number	PCA titers Days after immunization	
		14	21
CZX: RSA	1	—	—
	2	—	10
	3	—	—
	4	5	5
	5	—	5
	6	—	—
	7	—	—
	8	5	—
	9	5	—
CEZ: RSA	1	—	5
	2	—	—
	3	5	10
	4	—	5
	5	5	10
	6	5	—
	7	—	—
	8	—	—
	9	5	—
CET: RSA	1	20	—
	2	—	10
	3	5	5
	4	5	—
	5	10	—
	6	—	5
	7	—	—
	8	5	10
	9	—	—
PCG: RSA	1	20	5
	2	5	5
	3	20	—
	4	20	5
	5	10	5
	6	20	10
	7	40	N. D.
	8	20	—
	9	10	5

—; Negative, N. D.; Not done

赤血球凝集反応による交差性を Table 2 に示した。抗 CZX:RSA 血清に対し、CZX の感作血球は128倍の凝集力価を示し、CEZ, CET および PCG の感作血球は8~16倍を示した。すなわち、CZX 抗体に対する

Table 2 Extent of cross-reactions obtained between CZX, CEZ, CET and PCG in passive hemagglutination reactions

Antiserum to	Hemagglutinating titers			
	CZX : RBCs	CEZ : RBCs	CET : RBCs	PCG : RBCs
CZX : RSA	128	16	8	8
CEZ : RSA	8	64	8	8
CET : RSA	8	8	256	128
PCG : RSA	16	32	256	512

Table 3 Extent of cross-reactions obtained between CZX, CEZ, CET and PCG in hapten inhibition of passive hemagglutination reactions

Antiserum to	Antigen	Hapten concentrations required for 100% inhibition of passive hemagglutination*			
		CZX	CEZ	CET	PCG
CZX : RSA	CZX : RBCs	1.56	25.0	25.0	50.0
CEZ : RSA	CEZ : RBCs	25.0	0.2	12.5	12.5
CET : RSA	CET : RBCs	50.0	50.0	0.39	3.13
PCG : RSA	PCG : RBCs	50.0	12.5	0.39	0.1

\* mM (hapten concentration)

Table 4 Extent of cross-reactions obtained between CZX, CEZ, CET and PCG in hapten inhibition of quantitative precipitin reactions

Antiserum to	Antigen	Hapten concentrations (mM) required for 50% inhibition of precipitation			
		CZX	CEZ	CET	PCG
CZX : RSA	CZX : BGG	5.0	31.9	30.8	43.0
CEZ : RSA	CEZ : BGG	14.6	0.81	6.6	11.8
CET : RSA	CET : BGG	9.5	8.6	1.17	1.56
PCG : RSA	PCG : BGG	49.0	51.0	9.5	2.8

Table 5 Extent of cross-reactions obtained between CZX, CEZ, CET and PCG in passive cutaneous anaphylaxis

Antiserum to	PCA titers*			
	CZX : BGG	CEZ : BGG	CET : BGG	PCG : BGG
CZX : RSA	192	16	8	2.3
CEZ : RSA	5.3	670	7	1.24
CET : RSA	1.75	6.1	168	73
PCG : RSA	7	7	220	1,024

\* Each PCA reaction represents the average readings of five guinea-pigs.

CEZ, CET および PCG の交差性は CZX の $\frac{1}{16}$ ~ $\frac{1}{64}$ であった。一方、抗CEZ:RSA 血清、抗CET:RSA 血清および抗PCG:RSA 血清に対し、CZX 感作血球はいずれも8~16倍と低い凝集力価を示し、CEZ, CET およびPCG 抗体に対する CZX の交差性はそれぞれ homologous な抗原の $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ および $\frac{1}{32}$ であった。

### 2) 赤血球凝集ハプテン阻止反応

CZX, CEZ, CET および PCG の抗原抗体系の赤血球凝集反応を100%阻止するのに必要な各ハプテン濃度を Table 3 に示した。

CZX の抗原抗体系に対する CEZ, CET および PCG の必要ハプテン濃度は、それぞれ 25 mM, 25 mM および 50 mM で CZX の 1.56 mM に対し $\frac{1}{16}$ ~ $\frac{1}{32}$ の交差性を示した。一方、各抗生物質の抗原抗体系における CZX の必要阻止濃度は、CEZ 抗原抗体系では 25 mM, CET 抗原抗体系では 50 mM および PCG 抗原抗体系では 50 mM となった。これは、それぞれの抗原抗体系と同種のハプテンに対する CZX の交差性が、 $\frac{1}{25}$ ~ $\frac{1}{600}$ であることを示している。

### 3) 定量沈降ハプテン阻止反応

CZX の沈降抗体に対する交差性の程度を、CZX, CEZ, CET および PCG の抗原抗体系の沈降反応を50%阻止するのに必要な各抗生物質(ハプテン)の濃度で比較した (Table 4)。

CZX の抗原抗体系では、CZX が 5 mM で 50%阻止するのにに対し、CEZ は 31.9 mM, CET は 30.8 mM および PCG は 43 mM を必要とした。すなわち、CZX 沈降抗体に対し、CEZ および CET は CZX に比べ約 $\frac{1}{8}$ , PCG は約 $\frac{1}{6}$ の交差性を示した。一方、各抗原抗体系における CZX の必要阻止濃度は、CEZ 抗原抗体系で 14.6 mM, CET 抗原抗体系で 9.5 mM および PCG 抗原抗体系で 49.0 mM であった。すなわち、それぞれの抗原抗体系と同種のハプテンに対する CZX の交差性は約 $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{6}$ および $\frac{1}{6}$ であった。

### 4) PCA 反応

PCA 抗体に対する CZX の交差性を Table 5 に示した。

抗 CZX 血清に対し CZX は 192 倍 (5 例平均) の PCA 抗体価を示した。CEZ, CET および PCG はそれ

Table 6 Extent of covalent binding of CZX, CEZ, CET and PCG to human serum albumin

Antibiotic	Moles of antibiotic bound to 1 mole of human serum albumin
CZX	3.4
CEZ	3.5
CET	15.3
PCG	4.2

Table 7 *In vitro* direct Coomss' test of antibiotic coated human erythrocytes

Volunteer	Coomss' serum	Antibiotic	Concentrations(mg/ml) of antibiotic required for producing positive reaction
Y. M.	Ortho	CZX	50
		CEZ	50
		CET	12.5
		PCG	12.5
	DADE	CZX	25
		CEZ	25
		CET	3.13
		PCG	6.25
S. N.	Ortho	CZX	50
		CEZ	50
		CET	3.13
		PCG	12.5
	DADE	CZX	50
		CEZ	50
		CET	6.25
		PCG	25

それぞれ16倍、8倍、および2.3倍の抗体価を示した。すなわち、抗 CZX 血清に対し、CEZ、CET および PCG の交差性は CZX にくらべ約 $1/2$ ～ $1/3$ であった。

抗 CEZ 血清、抗 CET 血清および抗 PCG 血清に対し、CZX はいずれも1.75～7倍と低い抗体価を示した。すなわち、CEZ、CET および PCG の抗原抗体系に対する CZX の交差性は、それぞれ約 $1/20$ 、 $1/60$ および $1/40$ であった。

### 3. 生理条件下における human serum albumin との共有結合性

Table 6 に HSA と共有結合した CZX、CEZ、CET および PCG 分子数を示した。

CZX の HSA 1モル当りの結合分子数は、3.4モルで CEZ の3.5モルと同程度であった。一方、CET は15.3モルと最も高い結合数を示したが、PCG は4.2モルであった。

### 4. *In vitro* クームス陽性化能

Table 7 に結果を示す。陽性を認める最低濃度は、クームス試薬および正常ヒト血液の種類により若干の差が認められたが、CZX では25～50 mg/ml、CEZ で25～50 mg/ml、CET で3.13～12.5 mg/ml、および PCG で6.25～25 mg/mlであった。

これらの結果から、クームス陽性の強度は、CET > PCG > CEZ = CZX の順となった。

## 考 察

一般に  $\beta$ -lactam 環を有する cephalosporin および penicillin は、ハブテンとしての性質を有し、生体内で  $\beta$ -lactam 環が開裂して、タンパクとの安定な共有結合体を生成し、これが主要抗原となってハブテンに対する特異抗体を産生することが知られている<sup>12,13)</sup>。われわれは既に種々の  $\beta$ -lactam 系抗生物質の抗原性について検討し、あらかじめ *in vitro* でタンパクと共有結合物としたものを免疫原として用いた場合、あるいは抗生物質をそのまま免疫原として用いた場合のいずれも抗生物質に対し、特異抗体が産生されることを報告した<sup>4,14-16)</sup>。

本報では、新しい cephalosporin 誘導体、CZX について種々の免疫学的特性を検討した。その結果、CZX とウサギ血清アルブミンとの共有結合物を免疫原としてウサギに免疫した場合、CEZ、CET および PCG と同様、CZX に対する IgG および IgM 型抗体が産生される。

またマウスに免疫すると、IgE 型抗体が産生される。一方、CZX をそのまま Freund's complete adjuvant と共にウサギを免疫した場合も、CZX に対する IgG およ

び IgM 型抗体が産生される。しかしその産生能は CEZ と同程度であることが判明した。岩田らは、cephalosporin の免疫原性は、cephalosporin のタンパクとの共有結合能と相関すると報告している<sup>17)</sup>。すなわち、 $\beta$ -lactam 環の安定性およびタンパクとの結合の難易によって決まると考えられる。CZX を生理条件下でヒト血清アルブミンと反応させると、その共有結合能は CEZ と同程度で、他剤よりも低いという成績を得た。 $\beta$ -Lactam 抗生物質である CZX にも免疫原性がみられたが、CZX をそのままウサギに免疫した場合、その免疫原性は CEZ と同程度で、PCG や CET より弱いという事実は、上記のとおりこの物質のタンパクとの比較的低い共有結合性によって説明できる。また CZX の CEZ、CET および PCG との免疫学的交差性が弱いことが明らかとなった。Cephalosporin および penicillin 系抗生物質の免疫学的交差性の程度は、その7位または6位のアシル側鎖の構造に強い影響をうけることが知られている<sup>18, 19)</sup>。CZX の 2-(2-アミノ-4-チアゾイル)2-Z-メトキシイミノアセチル基の構造が、CEZ の 1-テトラゾイルアセチル基、CET の 2-チニルアセチル基および PCG のフェニルアセチル基と母核 6-APA の構造と大きく相異していることに起因するものと考えられる。Cephalosporin および penicillin の、*in vitro* 直接クームス反応の陽性化作用については、すでに多くの報告がある<sup>20-22)</sup>。CZX の作用は、既知 cephalosporin および PCG と比較して弱い。

以上、CZX の免疫学的検討を通じて、本物質は既知の cephalosporin 類と比較して抗原性および免疫学的交差性が低いことを示したが、しかし  $\beta$ -lactam 抗生物質である限りにおいて、臨床応用に関しては抗原性および免疫学的交差性について十分な配慮がなされるべきである。

## 文 献

- 1) KAMIMURA, T.; Y. MATSUMOTO, N. OKADA, Y. MINE, T. MURAKAWA & M. NISHIDA: Cefprozime (FK 749), a new parenteral cephalosporin: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16: 540-548, 1979
- 2) KOJO, H.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Antibacterial activity of cefprozime (FK 749), a new cephalosporin, against cephalosporin-resistant bacteria, and its stability to  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 16: 549-553, 1979
- 3) LEVINE, B. B. & N. M. VAZ: Effects of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in

- the mouse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 39: 156~171, 1970
- 4) MINE, Y.: 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
  - 5) OKUDAIRA, H. & K. ISHIDAKA: Reaginic antibody formation in the mouse. III. Collaboration between hapten-specific memory cells and carrier-specific helper cells for secondary anti-hapten antibody formation. *J. Immunol.* 111: 1420~1428, 1973
  - 6) LEY, A. B.: Circulating antibody directed against penicillin. *Science* 127: 1118~1119, 1958
  - 7) KABAT, E. A. & M. M. MAYER: *Experimental immunochemistry*. 2nd Ed. 22~96 (Chap. 2) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A., 1961
  - 8) OVARY, Z.: *Progress in allergy* 5: 459~508, 1958 (S. Karger, Basel and New York)
  - 9) MOTA, I. & D. WONG: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sciences* 8: 813~830, 1969
  - 10) LITTLE, J. R.: Preparation and characterization of antibodies specific for the 2, 4, 6-trinitrophenyl group. *Biochem.* 5: 3385~3395, 1966
  - 11) LEVINE, B. B. & Z. OVARY: Studies on the mechanism of the penicillin antigen. III. The N-(D- $\alpha$ -benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J. Exp. Med.* 114: 875~904, 1961
  - 12) BRANDRIS, M. W.: Common antigenic determinants of penicillin G, cephalothin and 6-amino penicillanic acid in rabbit. *J. Immunol.* 94: 696~704, 1965
  - 13) LEVINE, B. B.: Immunochemical mechanism involved in penicillin hypersensitivity in experimental animals and in human beings. *Fed. Proc.* 24: 45~50, 1965
  - 14) 峯 靖弘, 野々山重男, 西田 実, 五島透智子: Amoxycillin (BRL 2333) の抗原性および Ampicillin との免疫学的交差性について。 *Chemotherapy* 21: 1409~1413, 1973
  - 15) 野々山重男, 峯 靖弘, 西田 実, 五島透智子: Ceftezole の抗原性および免疫学的交差性について。 *Chemotherapy* 24: 650~654, 1976
  - 16) 野々山重男, 峯 靖弘, 西田 実, 五島透智子: Carfecillin (Carbenicillin phenyl ester) に関する研究。 Carfecillin の抗原性および CBPC, PCG との免疫学的交差性について。 *Chemotherapy* 23: 2229~2232, 1975
  - 17) 岩田正之, 勝田光大: Cephadrine に関する免疫学的研究。 *Chemotherapy* 23: 69~76, 1975
  - 18) SHIBATA, K.; T. ATSUMI, Y. HORIUCHI & K. MASHIMO: Immunological cross-reactivities of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin. *Nature* 212: 419~420, 1966
  - 19) KUWAHARA, S.; Y. MINE & M. NISHIDA: Immunogenicity of cefazolin. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 1969: 374~379, 1970
  - 20) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct COOMBS' tests due to cephalothin. *New Engl. J. Med.* 277: 123~125, 1967
  - 21) GRALNICK, H. R.; L. D. WRIGHT & M. H. MCGINNIS: COOMBS' positive reactions associated with sodium cephalothin therapy. *J. Amer. Med. Assoc.* 199: 725~726, 1967
  - 22) MINE, Y.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Studies on direct COOMBS' reaction by cefazolin *in vitro*. *J. Antibiotics* 23: 575~580, 1970



## IMMUNOLOGICAL STUDIES ON CEFTIZOXIME, A NEW SEMISYNTHETIC CEPHALOSPORIN ANTIBIOTIC

SHIGEO NONOYAMA, YASUHIRO MINE and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

The immunological properties of ceftizoxime (CZX) were compared with those of cefazolin (CEZ), cephalothin (CET) and penicillin G (PCG).

CZX showed a sensitizing activity as evidenced by the elicitation of specific hemagglutinating antibodies and PCA antibodies in rabbits immunized with protein conjugates or solution of this antibiotic, as do conjugates of CEZ, CET and PCG. When CZX solution was injected into rabbits, antigenicity of CZX was weaker than that of CET and PCG, similar to that of CEZ. CZX produced specific IgE type antibodies when injected intraperitoneally with suspension of its protein conjugates and Alum into mice. Producing activity of IgE type antibodies by CZX was weaker than that of PCG, similar to CEZ. CZX had weak cross-reactivity with CEZ, CET and PCG. Binding extent of CZX with human serum albumin was 3.4 moles/protein mole, similar to CEZ (3.5 moles) and lower than that of CET (15.3 moles) under incubation at 37°C for 24 hours, pH 7.0. The extent of *in vitro* direct Coombs' reaction of CZX was similar to CEZ and was weaker than that of CET and PCG.