

## Cefoperazone (T-1551) の抗原性に関する免疫学的研究

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

Cefoperazone (CPZ, T-1551) の免疫原性ないし抗原性について、ウサギ、モルモットおよびマウスを用いて検討し、次の結論をえた。

1. CPZ 単独ないし adjuvant 加感作によっては、免疫原性はほとんど認められなかった。
2. CPZ を protein と coupling せしめたものを FCA と mixed して、ウサギを過免疫すると、CPZ に対する特異抗体が産生されることが間接血球凝集反応、同阻止反応、モルモットを用いての 3 hr PCA ならびに同阻止反応によって認められた。
3. CPZ と ABPC, CET, CEZ の間の共通抗原性はほとんどみられないかきわめて軽微であった。
4. CPZ のマウスに対する IgE 抗体の産生能について検討したが全く見出されなかった。
5. モルモットに対するアナフィラキシー・ショックの発来性は全く認められなかった。

Cefoperazone (CPZ, T-1551) は新しく開発された下記構造式のセファロスポリン誘導体で、グラム陽性ならびに陰性菌に対し広域の抗菌作用を示す<sup>1-7)</sup>。私どもは今回 CPZ の抗原性を中心として免疫学的基礎研究を行ったので、その結果について一括報告する。

## I. 実験材料ならびに方法

## 1. 供試薬剤

CPZ ならびに対照薬剤として次の 3 種の既知ペニシリンおよびセファロスポリン誘導体を用いた。

cephalothin (CET: 塩野義製薬 Lot. KF 7051)

cefazolin (CEZ: 藤沢薬品工業 Lot. ZQ 5000)

ampicillin (ABPC: 富山化学工業 Lot. 72420)

## 2. 供試動物

1) ウサギ: 雌性の日本在来白色ウサギ、体重 2.5 kg 前後のものを使用。

2) モルモット: 雌性の Hartley 系モルモット体重 250g 前後のものを使用。

3) マウス: 雄性 Balb/c 系の 8 週齢のものを使用。

4) ラット: 雄性の体重 180 g 前後の Wistar 系のものを使用。

## 3. 免疫用抗原の作製

供試薬剤 (CPZ, CET, CEZ, ABPC) の各 400mg と bovine serum albumin (BSA, 日本生化学工業) の 100 mg と pH 7.2 の 0.01 M phosphate buffer (PB) 20ml に溶解し、37°C 24時間 incubate した。4°C で透析により遊離の薬剤を除去してから凍結乾燥した。この凍結乾燥物を BSA-coupling 抗原 (CPZ・BSA, CET・BSA, CEZ・BSA, ABPC・BSA) とした。

## 4. 反応用抗原の作製

抗血清に対する反応用テスト抗原の作製は前記 BSA の代りに rabbit serum albumin (RSA; Miles Lab. Inc.) を用いて同様な方法で RSA-coupling 抗原 (CPZ・RSA, CET・RSA, CEZ・RSA, ABPC・RSA) を作製した。

## 5. ウサギの免疫方法

薬剤・BSA の coupling 抗原 (20mg/0.5 ml) と FREUND の complete adjuvant (FCA) を等量混合した emulsion 各 1 ml をウサギの foot pads に皮内注射した。週 1 回の割で 8 回行ない、免疫開始後 80~85 日後に全採血し抗血清を分離した。

一方、対照として BSA と coupling を行なわない薬剤 20mg/ml と FCA を等量混合した emulsion をもって別の一群のウサギについて同様に感作を行なった。

## 6. マウスの免疫方法

薬剤・BSA の coupling 抗原 (200 μg/ml) と水酸化アルミニウム・ゲル (aluminium hydroxide gel: 5 mg/ml) の等量混合液の各 1 ml をマウスの腹腔内に注射した。1 回 (primary) 感作群では、投与後 12 日目に採血した。2 回 (secondary) 感作群では、1 回感作後、3 週目に同

Fig. 1 Structure of CPZ

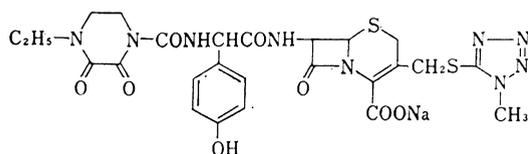


Table 1 Indirect hemagglutination test with rabbit antisera and penicillin-coated RBC\*

| Antiserum             | Antigen | Hemagglutination titer |            |           |           |
|-----------------------|---------|------------------------|------------|-----------|-----------|
|                       |         | CPZ · RSA              | ABPC · BSA | CET · RSA | CEZ · RSA |
| Rabbit                |         |                        |            |           |           |
| anti CPZ · BSA serum  |         | 256                    | 0          | 4         | 0         |
| anti ABPC · BSA serum |         | 0                      | 128        | 8         | 0         |
| anti CET · BSA serum  |         | 0                      | 16         | 4096      | 128       |
| anti CEZ · BSA serum  |         | 0                      | 0          | 256       | 4096      |

\* Sheep red blood cells

じ抗原で2回目の感作をした。2回目感作後1週間後に採血した。

### 7. 抗体価の測定

#### 1) 間接血球凝集反応

タンニン酸処理血球を、RSA と coupling させた反応用抗原 (CPZ · RSA, CET · RSA, CEZ · RSA, ABPC · RSA) の 2mg/ml 液で型のように<sup>8)</sup> 感作し、マイクロ・タイター法をもって感作血球凝集反応を行なった。感作血球凝集価は、血球凝集を示す抗血清の最大希釈倍数をもって表示した。

#### 2) 間接血球凝集阻止反応

ウサギ抗 CPZ · BSA 血清と CPZ · RSA の抗原抗体系を用いての間接血球凝集反応に対し種々な濃度の CPZ, CET, CEZ または ABPC 添加による間接血球凝集反応阻止をマイクロ・タイター法によって検討した。すなわち、ウサギ抗 CPZ · BSA 血清の2倍段階希釈系列の各 0.025ml と、0.1M, 0.025M, 0.0125M, 0.0062M および 0.0031M の各薬剤 (CPZ, CET, CEZ, ABPC) の 0.025ml をマイクロ・プレートの well に入れて、1時間保ってから、CPZ · RSA で感作された血球液を添加して感作血球凝集反応の阻止を観察した。

#### 3) モルモットにおける 3 hr passive cutaneous anaphylaxis (PCA) と同阻止反応

OVARY の方法<sup>9)</sup> に準じて各抗血清の2倍段階希釈液の 0.05ml をモルモットの剪毛皮内に注射し、3 hr 後に各反応抗原 (1mg/ml) と 0.5% evans blue 液を混合した溶液の 0.5ml を静注し、惹起注射30分後における青色帯の径 6mm 以上をもって陽性とし、陽性反応を示す抗血清の最大希釈倍数で PCA 価を表示した。

PCA inhibition test は、ウサギ抗 CPZ · BSA 血清をモルモットに皮内注射してから、惹起抗原を投与する20分前に種々な濃度のハプテンを静注しておいてから PCA 反応を行ない、その発現を観察した。

#### 4) ラットにおける 48 hr PCA

免疫マウスから得た抗血清を2倍段階希釈し、その各 0.05ml を正常ラットの剪毛背部皮内に注射し、48hr 後に反応抗原と evans blue の混合液の 1ml を静注し30分後において発現する青色帯の径 6mm 以上を陽性とし、陽性反応を呈する投与抗血清の最大希釈倍数をもって PCA 価とした。

### 8. モルモットのアナフィラキシー・ショック

#### 1) 能動性アナフィラキシー・ショック

一群のモルモットには CPZ (40mg/ml) と FCA の等量混合の emulsion 0.5 ml を皮下に、または CPZ · BSA (40mg/ml) と FCA の等量混合の emulsion 0.5 ml を foot pads に注射し、3週間後に CPZ · RSA (40mg/ml) の 0.5ml を静注しアナフィラキシー・ショックの発来性を検討した。

#### 2) 被動性アナフィラキシー・ショック

モルモットにウサギ抗 CPZ · BSA 血清 0.5 ml を静注し、20時間後に CPZ · RSA (20mg/ml) を 1ml 静注し、アナフィラキシー・ショックの発来性を検討した。

### 9. 直接グームス試験

#### 1) MOLTHAN の方法<sup>10)</sup>

HtO 型血液 1ml を抗生物質の2倍連続希釈液 1ml に加える。37°Cで3時間反応させ遠心洗滌の後、2%血球浮遊液を調製した。小試験管にこの3滴をとり、グームス試薬2滴を加え、よく振とうした後、直ちに 1000 rpm で1分間遠心し、沈渣を乱しながら凝集の有無により判定した。

## II. 実験成績

1. CPZ ならびにペニシリン誘導体免疫ウサギの抗体価についての検討

#### 1) 抗血清の間接血球凝集価

CPZ · BSA, CET · BSA, CEZ · BSA または ABPC · BSA で免疫されたウサギの抗血清と、CPZ · RSA, CET · RSA, CEZ · RSA および ABPC · RSA 感作血球を用いて交叉間接血球凝集反応を行なった結果は Table 1 に示

Table 2 Indirect hemagglutination inhibition test

| Antiserum                   | Antigen (RBCs sensitized with) | Inhibitor | Concentration (M) |     |      |       |       |       |       |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------|-------------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|
|                             |                                |           | 0                 | 0.1 | 0.05 | 0.025 | 0.012 | 0.006 | 0.003 |
| Rabbit anti CPZ · BSA serum | CPZ · RSA                      | CPZ       | 256               | 0   | 0    | 8     | 32    | 32    | 64    |
|                             |                                | ABPC      | 256               | 128 | 128  | 128   | 128   | 128   | 128   |
|                             |                                | CET       | 256               | 64  | 128  | 128   | 256   | 256   | 256   |
|                             |                                | CEZ       | 256               | 256 | 256  | 256   | 256   | 256   | 256   |

Table 3 3 hr PCA in guinea pigs

| Challenging antigen<br>Rabbit antisera | PCA titer |            |           |           |
|--|-----------|------------|-----------|-----------|
|  | CPZ · RSA | ABPC · RSA | CET · RSA | CEZ · RSA |
| Anti CPZ · RSA                         | 8000      | 0          | 0         | 0         |
| Anti ABPC · BSA                        | 0         | 2000       | 0         | 0         |
| Anti CET · BSA                         | 0         | 100        | 4000      | 100       |
| Anti CEZ · BSA                         | 0         | 0          | 0         | 2000      |

Table 4 3 hr PCA inhibition test in guinea pigs

| Antiserum                   | Challenging antigen | Inhibitor | PCA titer |       |       |       |
|-----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------|-------|-------|
|                             |                     |           | 0         | 0.01M | 0.05M | 0.1 M |
| Rabbit anti CPZ · BSA serum | CPZ · RSA           | CPZ       | 4000      | 2000  | 1000  | 0     |
|                             |                     | ABPC      | 4000      | 4000  | 4000  | 4000  |
|                             |                     | CET       | 4000      | 4000  | 4000  | 4000  |
|                             |                     | CEZ       | 4000      | 4000  | 4000  | 4000  |

す通りであった。

すなわち、CPZ 抗血清の CPZ に対する感作血球凝集価は256倍であり、CET 抗血清に対する CET, CEZ 抗血清に対する CEZ 凝集価はいずれも4096倍、ABPC 抗体に対する ABPC 凝集価は128倍であったが、CPZ と他のペニシリン誘導体の間にはほとんど共通抗原性が存在しないことが、交叉血球凝集反応の結果から推定された。

## 2) 抗血清についての間接血球凝集阻止反応

結果は Table 2 に示す通りで、ウサギ抗 CPZ · BSA 血清と CPZ · RSA 間の間接血球凝集反応に対し、0.1～0.003Mまでの種々な濃度の CPZ をあらかじめ添加しておく、その添加濃度に応じて dose dependent に間接血球凝集反応が阻止された。ただし、ABPC, CET, CEZ の添加によっては感作血球凝集価にほとんど変動がみられなかった。

## 3) 抗血清のモルモットを用いての 3 hr PCA および同阻止反応

抗血清についてモルモットを用いての 3 hr PCA ならびに同阻止反応について検討した結果は Table 3 に示す

通りであった。

Table 3 に示すように 3 hr PCA titer は CPZ · 抗 CPZ 抗原抗体系で 8,000 倍、CET · 抗 CET 抗原抗体系で 4,000 倍、CEZ · 抗 CEZ 抗原抗体系で 2,000 倍、ABPC · 抗 ABPC 抗原抗体系で 2,000 倍であった。

CPZ 抗原抗体系を用いて 3 hr PCA inhibition test について検討した結果は、Table 4 に示す通りであり、3 hr PCA 阻止反応の結果から他のペニシリン系剤の添加による阻止反応はほとんど認められず、CPZ と CET, CEZ または ABPC との間に共通抗原性が存在しないことが示唆された。

## 2. CPZ ならびにペニシリン誘導体のマウスを用いての IgE 抗体産生能の検討

CPZ ならびに他のペニシリンおよびセファロスポリン誘導体 (CET, CEZ および ABPC) を用いてマウスを免疫し、IgE 抗体が産生されるか否かについて検討した。マウスにおける IgE 抗体産生の有無は、免疫マウス血清を用いてラットにおける 48 hr PCA によって検討したが、Table 5 に示すように primary または secondary の

Table 5 Test for IgE production in mice (48 hr PCA in rats)primary: Test on day 12 after primary injection

| Antisera            | Challenging antigens in PCA |            |           |           |
|---------------------|-----------------------------|------------|-----------|-----------|
|                     | CPZ · RSA                   | ABPC · RSA | CET · RSA | CEZ · RSA |
| Mouse               |                             |            |           |           |
| anti CPZ · BSA      | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |
| anti ABPC · BSA     | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |
| anti CET · BSA      | 20                          | 20         | 20        | 20        |
| anti CEZ · BSA sera | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |

Secondary: Booster injection on 3 weeks after primary injection test on 1 week after secondary injection

| Antisera            | Challenging antigens in PCA |            |           |           |
|---------------------|-----------------------------|------------|-----------|-----------|
|                     | CPZ · RSA                   | ABPC · RSA | CET · RSA | CEZ · RSA |
| Mouse               |                             |            |           |           |
| anti CPZ · BSA      | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |
| anti ABPC · BSA     | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |
| anti CET · BSA      | 20                          | 20         | 20        | 20        |
| anti CEZ · BSA sera | < 5                         | < 5        | < 5       | < 5       |

Table 6 Studies on the anaphylactic shock in guinea pigs sensitized with CPZ

| Group                       | Sensitized with                   | Challenging antigen | Number tested | Number of death |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| Active sensitization group  | CPZ+FCA (20 mg)                   | CPZ · RSA (20 mg)   | 5             | 0               |
|                             | CPZ · BSA+FCA (20 mg)             | 〃                   | 5             | 0               |
| Passive sensitization group | Rabbit antiCPZ · BSA serum (1 ml) | CPZ · RSA (20 mg)   | 5             | 0               |

immunization を行なった何れの群の抗血清にも IgE 抗体の産生を実証することはできなかった。

### 3. CPZ 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ついての検討

#### 1) 能動性アナフィラキシー・ショック

CPZ と FCA または CPZ · BSA と FCA の各 emulsion をもって感作したモルモット (各群 5 匹) に CPZ · RSA で惹起注射を行なったがいずれにもアナフィラキシー様ショック症状を呈したものはみられなかった (Table 6)。

#### 2) 被動性アナフィラキシー

ウサギ抗 CPZ · BSA 血清を 1 ml を正常モルモットに静注し、20 時間後に CPZ · RSA を静注したが、なんらショック様症状を呈したものはなかった。

#### 4. 試験管内直接クームス試験

CPZ の直接クームス試験を MOLTHAN の方法<sup>10)</sup> に準じて、CER, CET および ABPC と比較して検討した。その結果は Table 7 に示すように、CPZ によるクームス

Table 7 Coombs test by the method of MOLTHAN

| Drug | Concentration of drug (mg/ml) |    |    |   |     |      |   |
|------|-------------------------------|----|----|---|-----|------|---|
|      | 40                            | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0 |
| CPZ  | +                             | -  | -  | - | -   | -    | - |
| CER  | +                             | ±  | -  | - | -   | -    | - |
| CET  | ++                            | +  | +  | - | -   | -    | - |
| CEZ  | -                             | -  | -  | - | -   | -    | - |

テスト陽性を示した最低濃度は、40 mg/ml であり、他の抗生剤との比較では、CET > CER > CPZ > CEZ の順であり、CPZ のクームス陽性化作用は強いものではなかった。

### III. 考 察

新たに開発されたセファロsporin 誘導体である CPZ の抗原性ならびに免疫学的特異性について基礎的検討を行なった。

従来、ペニシリン・アレルギーの発来に関与する抗原決定基は penicilloyl-protein conjugate を中心に種々な抗原型が推定されている。すなわち、ペニシリン抗体は母核部分、側鎖部分および蛋白結合基を含めた全分子に対する抗体に分類される<sup>11)</sup>。中でもペニシリン誘導体と protein の conjugation が重要な役割を果しているであろうことが指摘されてきた<sup>12-16)</sup>。

かような見地からすると本剤の蛋白結合性が問題になる。CPZ の蛋白結合性に関する基礎実験報告によると、CPZ の蛋白結合性は余り強固ではないとされている<sup>2-4)</sup>。しかしながら、EISEN<sup>17)</sup> は dinitrophenyl 誘導体の蛋白結合率と抗原性の間に必ずしも相関関係がないと報告している。

私どもは今回 CPZ の抗原性ならびに免疫学的特異性について検討するとともに、CET, CEZ または ABPC との交叉反応性について併せ検討した。すなわち、CPZ を protein と結合せしめた CPZ・BSA と FCA の emulsion をもってウサギを過免疫し、免疫ウサギの抗血清について間接血球凝集反応ならびに同阻止反応、モルモットを用いての 3 hr PCA ならびに同阻止反応によって検討した結果、CPZ に対する特異抗体が証明されたが、この抗体と CET, CEZ または ABPC との間には交叉反応はほとんど見だされなかった。また抗体力価の上からみて、CET または CEZ に対する抗体力価に比べ、低値を示した。ただし、protein と coupling させない CPZ そのものと FCA との emulsion をもって免疫したウサギ抗血清においては、上記の方法によってもなんらの抗体価を実証しえなかった。

また CPZ に対する IgE 抗体産生の有無を、マウスを用いて検討し、ラットを用いての 48 hr PCA により IgE 抗体の産生について調べたが、IgE 様抗体の産生は全く認められなかった。さらに CPZ のモルモットに対するアナフィラキシー・ショックの発来性について検討したが、CPZ を用いての能動性感作またはウサギ抗 CPZ・BSA 血清を用いての被動性アナフィラキシーにおいて、なんらショック症状を呈したものは見だせなかった。

一方、ペニシリンによる免疫学的副作用としてクームス陽性化を伴う溶血性貧血が報告<sup>11,12)</sup>されている。すなわち試験管内直接クームス試験が、薬剤の免疫学的副作用の検討上意味あるものと考え、MOLTHAN の方法<sup>10)</sup> により検討したが、本剤のクームス陽性化作用は CET, CER などに比べ弱かった。

#### 文 献

- 1) 才川 勇, 高野俊太郎, 桃井海秀, 高倉 勇, 工谷千焔, 落合裕一, 吉田長作, 保田 隆, 滝 秀雄:  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第8報)

7-[D(-)- $\alpha$ -(4-alkyl-2, 3-dioxo-1-piperazine-carboxamido) phenylacetamido] cephalosporanic acid 類の合成ならびに構造-抗菌活性。薬学雑誌99(9): 929~935, 1979

- 2) 林 敏雄, 境 妙子, 荒木春美, 熊野克彦, 保田隆, 才川 勇: 抗生剤の炎症部位移行について。第27回日本化学療法学会総会抄録集, 99, 1979
- 3) 清水喜八郎, 熊田徹平, 高田理恵子, 高下 寛, 林 敏雄, 渡辺泰雄, 中島良文, 保田 隆, 才川勇: 蛋白結合に関する研究(第1報)。第27回日本化学療法学会総会抄録集, 105, 1979
- 4) 清水喜八郎, 熊田徹平, 高下 寛, 林 敏雄, 高田理恵子, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇: 蛋白結合に関する研究(第2報)。第27回日本化学療法学会総会抄録集, 106, 1979
- 5) UEDA, Y.; A. SAITO, M. OHMORI, K. SHIBA, T. YAMAJI and H. IHARA: Clinical studies on T-1551. The 18th Interscience Conference on Antimicrob. Agents & Chemoth., Abstract, No. 158, 1978
- 6) MITSUHASHI, S.; N. MATSUBARA, S. MINAMI, T. MURAOKA, T. YASUDA and I. SAIKAWA: Antibacterial activities of a new semisynthetic cephalosporin, T-1551. The 18th Interscience Conference on Antimicrob. Agents & Chemoth., Abstract, No. 153, 1978
- 7) 第27回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム I, T-1551抄録集, 1979
- 8) 高橋昌己: 感作血球凝集反応の簡易化とその応用に関する基礎的研究。アレルギー 13(7): 516~523, 1964
- 9) OVARY, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Progr. Allergy 5: 459~508, 1958
- 10) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG and M. F. EICHMAN: Positive direct Coombs test due to cephalothin. New Engl. J. Med. 277: 123~125, 1967
- 11) ATSUMI, T.; K. NISHIDA, Y. KINOSHITA, K. SHIBATA and Y. HORIUCHI: The heterogeneity of combining sites of anti-benzylpenicilloyl antibodies obtained from individual rabbit. J. Immunol. 99: 1286~1293, 1967
- 12) LEVINE, B. B.: Studies on the mechanism of formation of the penicillin antigen. The N(D- $\alpha$ -benzylpenicilloyl) group as antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875~903, 1961
- 13) BATCHELOR, F. R. and J. M. DEWDNEY: Some aspects of penicillin allergy. Proc. Roy. Soc. Med. 61: 897~899, 1968
- 14) STEWART, G. T.: Allergic residues in penicillin. Lancet I: 1177~1183, 1967
- 15) 竹内良夫, 西村葉子, 山地幸雄, 木村義民: Pen-

- icillin アレルギーに関する基礎的研究。アレルギー  
-26 : 10~16, 1977
- 16) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民: 新合成ペニシリン T-1220 に関する免疫学的研究。Chemotherapy  
26 : 609~613, 1978
- 17) EISEN, H. N. ; M. E. CARSTEN and S. BELMAN :  
Studies of hypersensitivity to low molecular  
weight substances. J. Immunol. 73 : 296~302,  
1954

## IMMUNOLOGICAL STUDIES ON ANTIGENICITY OF CEFOPERAZONE (T-1551)

YOSHITAMI KIMURA, YOSHIO TAKEUCHI and YOKO NISHIMURA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

The antigenicity of cefoperazone (CPZ, T-1551), its cross reactivity with cephalothin (CET), cefazolin (CEZ) and aminobenzylpenicillin (ABPC) and Coombs test were studied in order to clarify the immunological characteristics of CPZ.

The results obtained were as follow.

1) Antibody production against CPZ was not observed in rabbits immunized with single administration of CPZ or with the emulsion of CPZ and Freund complete adjuvant (FCA).

2) Hapten-specific antibody production against CPZ was demonstrated by indirect hemagglutination test, hemagglutination inhibition test, 3 hr PCA and 3 hr PCA inhibition tests of guinea pigs in the rabbit serum hyperimmunized with BSA-conjugated CPZ and FCA.

3) IgE antibody production in mice immunized with the emulsion of CPZ. BSA and aluminium hydroxide gel was not observed at all.

4) Anaphylactic syndrome was not observed in guinea pigs sensitized actively with CPZ or passively with rabbit anti CPZ serum.

5) Ability of CPZ to give a positive reaction in Coombs test was rather weak in comparison with CET or CER.