

## 6059-S の免疫学的性質

原田 稔・松本光史・竹内三津男  
塩野義製薬株式会社研究所

オキサセフェム系抗生物質 6059-S, ならびに 6059-S 試料中に微量ながら含まれている脱炭酸体の免疫学的性質をしらべた。(1) マウスとモルモットにおいて免疫原性をしらべたところ, 対照薬 CET 製剤や PCG 製剤に対して抗体産生がみとめられる条件で, 6059-S やその脱炭酸体に対する抗体の産生はみられなかった。(2) 6059-S やその脱炭酸体の BGG 結合体に対する免疫血清で感作した動物に, 誘発抗原として 6059-S 或いはその脱炭酸体を静注した場合, PCA は陰性であった。そればかりでなく, これらの薬剤を, 抗血清に対応した多価誘発抗原と同時に静注すると PCA の発現を阻害した。(3) 6059-S やその脱炭酸体と他の 5 種類の  $\beta$ -ラクタム抗生物質 (PCG, ABPC, CET, CEZ, CMD) との交差反応性をしらべたところ, これら他剤との間に交差反応性は全く観察されなかった。ただ, 6059-S とその脱炭酸体との間には, 一方向交差反応性がみとめられた。すなわち, 抗 6059-S 抗体は脱炭酸体と反応したが, 抗脱炭酸体抗体は 6059-S と反応しなかった。(4) 6059-S もその脱炭酸体も, 終濃度 40 mg/ml の高濃度でヒト血液に作用させても *in vitro* 直接クームス反応を陽性化することはなかった。以上の結果から, 検討した限りにおいて, 6059-S (脱炭酸体をも含めて) は免疫学的に不活性で過敏性副作用を起し難いと推察される。

## 緒 言

6059-S はオキサセフェム核を持つ点で, 従来のセファロスポリン類とはやや化学構造の異なる新しい注射用  $\beta$ -ラクタム抗生物質であり, その免疫学的性質の検定は前臨床試験の一つとして欠くことができない。本報では, マウス, モルモット, ウサギを用いた抗原性検定結果, ならびに, ヒト血液を用いた *in vitro* 直接クームス反応陽性化作用について報告する。抗原性としては, (1) 薬剤の免疫原性, (2) 薬剤の過敏症誘発原性, (3) 他の  $\beta$ -ラクタム抗生物質との免疫学的交差反応性の 3 つの項目について, 主に *passive cutaneous anaphylaxis* (PCA) 法による検定を行なった。なお, 6059-S 試料には微量ながらその脱炭酸体が含まれる (約 0.8%) ので, このものの免疫学的性質についての検討も併せて行なった。なお, 本研究の実施期間は 1978 年 1 月~1979 年 10 月までである。

## 材料及び方法

## 1. 実験動物

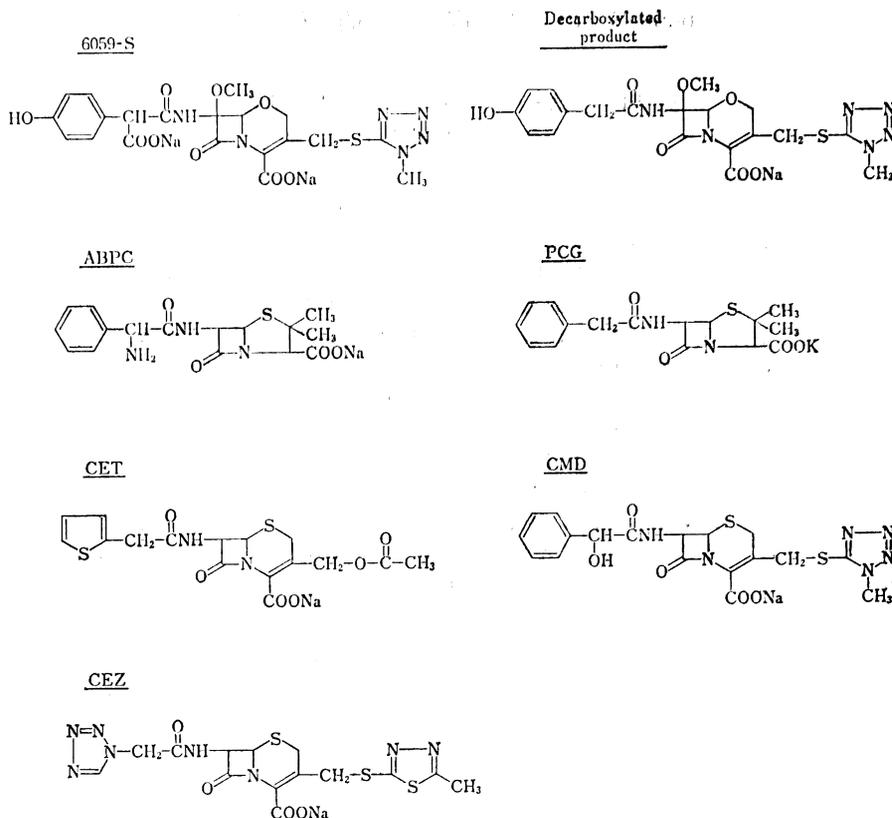
感作のための動物として, ウサギ (ラビトン, 2.5~3.0 kg, ♀), モルモット (静岡農協 SLC, Hartley 系, 300~350 g, ♀), ならびに数系統のマウスを用いた。マウスとしては, 4 つの近交系 (塩野義油日ラボラトリー育成の A/J, C<sub>3</sub>H/He, C<sub>57</sub>BL, DS) と ICR (日本クレア) の計 5 系統 (いずれも 6~8 週令, ♀) を使用した。また, PCA テストのレシピエント動物としては, ICR マウス (6~8 週令, ♀), Wistar ラット (近交系, 塩野義油日ラボラトリー系, 8~9 週令, ♀),

モルモット (SLC, 300~350 g, ♀) を用いた。

## 2. 薬物と蛋白質との結合体の調製

薬剤としては, 6059-S とその脱炭酸体, ならびに, 対照薬物として, Penicillin G (PCG, 明治製薬), Ampicillin (ABPC, メルク万有, ペントレックス®), Cephalothin (CET, Eli-Lilly-塩野義, ケフリン®), Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業, セファメジン®), Cefamandole (CMD, Eli-Lilly) を使用した。これらの薬剤の化学構造は Fig. 1 の通りである。異種蛋白質としては, ウシ  $\gamma$ -グロブリン (BGG, Fraction II, NBC), ウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V, Armour), 及び, 卵白アルブミン (OVA,  $\times 5$  crystalized, NBC) を使用した。

薬剤と蛋白質の結合体は LEVINE *et al.*<sup>1)</sup> の方法に準じて調整した。薬剤を生理食塩水に溶解し蛋白質を加え (薬剤:蛋白質=6:1), 室温にて 1 N NaOH を用いて pH を調整しながら 24 時間 incubate した。尚, 反応液の pH を, 6059-S とその脱炭酸体の場合は 9.4 に, 他の薬剤の場合は 8.8 に維持した。6059-S とその脱炭酸体の反応液 pH を他剤のそれに比し若干高めにしたのは, 構造上ラクタム環開裂が起りにくいと判断したためである。その後, 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 8.0) に対して 4°C にて 1 週間透析し, 内液を凍結乾燥した。得られた蛋白質結合体の薬剤ハプテン結合数は EBATA *et al.*<sup>2)</sup> の方法により測定した。本実験に使用した蛋白質結合体の組成は次の通りである。

Fig. 1 Chemical structures of  $\beta$  lactam antibiotics tested

6059-S<sub>33</sub>·BGG, 6059-S 脱炭酸体<sub>46</sub>·BGG  
 PCG<sub>22</sub>·BGG, ABPC<sub>17</sub>·BGG, CET<sub>31</sub>·BGG, CEZ<sub>17</sub>·  
 BGG, CMD<sub>21</sub>·BGG  
 6059-S<sub>5</sub>·OVA, 6059-S 脱炭酸体<sub>0</sub>·OVA, PCG<sub>3</sub>·OVA,  
 ABPC<sub>3</sub>·OVA, CET<sub>6</sub>·OVA  
 6059-S<sub>34</sub>·BSA, PCG<sub>6</sub>·BSA, CET<sub>17</sub>·BSA, CEZ<sub>7</sub>·  
 BSA, CMD<sub>10</sub>·BSA

### 3. 感作方法

#### (1) 薬剤と蛋白質との結合体を免疫原とする場合

免疫原としては各 BGG 結合体を用いた。マウスとしては C<sub>3</sub>H/He 系を用い、多くの場合、FREUND'S complete adjuvant (FCA) と免疫原とのエマルジョンで感作した。PCG·BGG と CET·BGG は pH 7.0 の磷酸緩衝液加生理食塩水 (PBS) に溶解させ、6059-S, その脱炭酸体, CMD の BGG 結合体は難溶であるので懸濁液として FCA と混合した。1 頭当たり 1 mg の免疫原を含むエマルジョンを 1 回腹腔内に注射し、2 週後に採血し、10 頭分の血清をプールした。ABPC·BGG と CEZ·BGG の場合は FCA エマルジョンによる免疫では他剤の場合に比肩し得るレベルまで IgE 抗体価を

上昇させることができなかったため、免疫原 (1  $\mu$ g/mouse) を吸着した水酸化アルミニウムゲル (1 mg/mouse) を 1 週間間隔で 3 回腹腔内に注射した。最終回注射の 2 週後に採血、血清をプールし、IgE 試験に使用した。モルモットとウサギの場合は各薬剤の BGG 結合体の FCA エマルジョンを週 1 回の割合で 2 回筋肉内に注射し、第 2 回目の注射の 2 週後に採血を行なった。1 回の免疫原量はモルモットでは 1 mg/animal, ウサギでは 10 mg/animal とした。どちらの動物の場合も、1 群 2~3 頭としたが、個体による抗体価のパラッキは小さかったので、等量ずつ混合した血清プールを使って検定した。

#### (2) 薬剤を免疫原とする場合

6059-S やその脱炭酸体、及び、PCG と CET の 2 種類の対照薬については薬剤の免疫原性を比較検討した。薬剤を PBS に溶かし (10 mg/ml) 等量の FCA を加えてエマルジョンをつくり、マウスやモルモットに週 2 回の割合で 3 週間に亘って腹腔注射し、最終回注射の 4 週後に血清を得た。薬剤投与量はマウスの場合もモルモットの場合も、毎回 1 mg/animal とした。

## (3) 抗 OVA 抗体の産生

A/J マウスに OVA (1 mg/animal) の FCA エマルジョンを 1 回腹腔内に注射し、2 週後に採血し、5 頭の血清をプールした。

## 4. 抗体活性検定法

血清の抗体活性を検出する誘発抗原としては各薬剤の BSA 域いは OVA 結合体を使用した。抗体の検定には、主に PCA テストを行なったが、補足的に、ゲル内沈降反応やモルモット能動全身アナフィラキシー試験も行なった。検定術式は既報<sup>9)</sup>の通りであるので詳細を省略し、要点のみを記す。

## (1) PCA による検定

(i) マウス IgE 抗体系；ラットの皮内に 2 倍段階希釈したマウス抗血清 0.05 ml を注射し、24 時間感作の後、通常、誘発抗原 2 mg とエバンス青 10 mg の静注により PCA を惹起した。多くの場合、2 例のレシピエントラットを使用した duplicate test とした。色素漏出時間は 1 時間とした。

(ii) マウス IgG<sub>1</sub> 抗体系；ICR マウスの皮内に 2 倍段階希釈したマウス抗血清 0.025 ml を注射し、1 時間感作後、特定の場合を除き誘発抗原 1 mg とエバンス青 1 mg を静注し、30 分間の色素漏出をしらべた。ことわりのない場合、duplicate test とした。

(iii) モルモット IgG<sub>1</sub>、IgE 及びウサギ IgG 抗体系；モルモット抗血清域いはウサギ抗血清を 10 倍段階希釈してモルモット皮内に注射 (0.05 ml) し、一定の感作時間を置いて誘発抗原 (2 mg) とエバンス青 (10 mg) によって PCA を惹起した。感作時間は、モルモット IgE 抗体を検定する場合は 8 日間とし、IgG<sub>1</sub> 抗体の場合は 4 時間と 24 時間の両方についてしらべた。ウサギ IgG 抗体を検定する場合は 4 時間とした。3 頭のレシピエントを用いた triplicate test とした。

(iv) PCA のハプテン阻害；マウス IgE 抗体によるラット PCA、及び、IgG<sub>1</sub> 抗体によるマウス PCA についてはハプテン阻害実験も行なった。薬剤自体をハプテンとし、これを誘発抗原と同時に静注し、その後 30 分間の色素漏出を、ハプテンを投与しない対照群と比較した。既報<sup>9)</sup>の方法によって皮内漏出色素を抽出、比色定量し、ハプテンによる阻害率を計算した。

## (2) モルモット能動全身アナフィラキシーによる検定

モルモットを各免疫原の FCA エマルジョンの 1 回注射によって免疫し、2 週後に誘発抗原 1 mg を静注してショックを誘発した。ショック症状の強さは既報<sup>9)</sup>の基準に従って判定したが、結果は陽性率と死亡率とで表現した。

## (3) ゲル内沈降反応による検定

ウサギの抗血清 (非希釈) についてはゲル内沈降反応による検定をも実施した。Immunoplate® (Pattern, C; Hyland) を使用し、誘発抗原の濃度を 500~63 µg/ml の範囲で変化させ、沈降線の形成を観察した。

5. *In vitro* 直接クームス反応

血液型 O 型及び A 型の健康人 (男性) 4 名のヘパリン加血液を使用し、MOLTHAN 法により検定した。詳細は既報<sup>9)</sup>を参照されたい。

## 実験結果

## 1. 6059-S ならびにその脱炭酸体の免疫原性

6059-S やその脱炭酸体の抗体産生能をいくつかの系統のマウスとモルモットにおいて検討し、対照薬剤 (CET と PCG) のそれと比較した。免疫原としては薬剤を用い、抗体検出抗原としては、それぞれ、対応した BSA 結合体 (脱炭酸体については OVA 結合体) を用いた。

Table 1 に示したように、CET に対しては C<sub>57</sub>BL/6J マウスにおいて、約 50 % の率で、IgE ならびに IgG<sub>1</sub> の両クラスの抗体産生がみとめられ、モルモットでも半数の個体が IgG<sub>1</sub> 抗体の産生を示した。PCG に対しても 3 つの系統のマウスにおいて抗体産生が観察された。6059-S に対しては、マウスにおいてもモルモットにおいても抗体産生はみとめられなかったし、6059-S の脱炭酸体に対しても、マウスでみる限り抗体は検

Table 1 Antibody production to plain 6059-S and other antibiotics

Antibiotic	Animal	Antibody positive/Total	
		IgE Ab	IgG <sub>1</sub> Ab
6059-S	Mouse A/J	0/11	0/11
	C <sub>3</sub> H/He	0/20	0/20
	C <sub>57</sub> BL/6J	0/22	0/22
	DS	0/10	0/10
	JCL-ICR	0/20	0/20
Decarboxylated product of 6059-S	Mouse C <sub>3</sub> H/He	0/11	0/11
	C <sub>57</sub> BL/6J	0/10	0/10
	JCL-ICR	0/12	0/12
CET	Mouse C <sub>57</sub> BL/6J	21/42	19/42
	Mouse A/J	2/11	5/11
PCG	C <sub>3</sub> H/He	2/6	4/6
	C <sub>57</sub> BL/6J	2/12	3/12
6059-S	Guinea pig	0/6	0/6**
CET	Guinea pig	NT*	7/14

\* NT: Not tested

\*\* Antibody was neither detected at 4 hour nor 24 hour latency.

出されなかった。

## 2. 6059-S ならびにその脱炭酸体の誘発原性

6059-S やその脱炭酸体の過敏症誘発原性をしらべるために、これらの薬剤の BGG 結合体に対する免疫血清を皮内注射することによって予め感作しておいた動物に薬剤を静注し、PCA が生じるかどうかをみた。C<sub>3</sub>H/He マウス由来の抗 6059-S、或いは、抗脱炭酸体 IgE 抗体で感作されたラットに、それぞれに対応した OVA 結合体を投与した場合には強い PCA が惹起された（抗血清の PCA titer 1:128~1:64）が、薬剤そのものを誘発原とした場合には PCA は全く生じなかった。ウサギやモルモットの抗体で感作されたモルモットにおいても同様であった。これらの事実から、6059-S やその脱炭酸体試料は誘発原性を持たないと考えられる。むしろ、薬剤自体の静注は多価抗原による PCA 惹起に対して阻害的にはたらくことが示された。Table 2 はマウスの抗 6059-S・IgE 抗体によるラット PCA、及び、IgG<sub>1</sub> 抗体によるマウス PCA のハプテン阻害を示している。レシピエントのラットやマウスに、多価 OVA 結合体（誘発抗原）2 mg を静注する直前に薬剤（ハプテン）20 mg を静注するとき、PCA は明らかに抑制された。同じ用量の薬剤ハプテンは、特異性を異にする抗 OVA 抗体と 6059-S・OVA 結合体とによって生じる PCA に対しては何ら抑制作用を及ぼさなかったため、ここに観察された阻害は抗原に特異的である。さらに、PCA 阻

害率が誘発抗原量とハプテンの比によって変化したことから、阻害は抗原とハプテンの間の競合に因るものとみなされる。表示を省くが、モルモットやウサギの抗体を用いたモルモット PCA でも同様のことが観察された。

## 3. 他の β-ラクタム 抗生物質との免疫学的交差反応性

抗体試料として各種薬剤の BGG 結合体に対する免疫血清を、また、誘発抗原としては BSA 或いは OVA 結合体を使用し、6059-S やその脱炭酸体と他剤との間の免疫学的交差反応性を検討した。

### (1) マウス IgE 抗体系での検定

Table 3 に示したように、6059-S やその脱炭酸体と 5 種類の対照薬との間に交差反応は全くみとめられなかった。ただ、6059-S と脱炭酸体との間に一方向性の交差反応性が観察された。すなわち、抗 6059-S 血清は脱炭酸体抗原と組合わせた場合、対応抗原 6059-S・OVA の場合に比べればかなり低くはなるが、明らかに反応してある程度の PCA titer を示した。一方、抗脱炭酸体血清は 6059-S 抗原との間に交差反応を起さなかった。

このような 6059-S とその脱炭酸体との間の一方向交差反応性は PCA ハプテン阻害実験においてもみとめられた。Fig. 2 に示したように、抗脱炭酸体血清で感作されたラットに対応抗原（脱炭酸体・OVA）を作用させるのと同時に脱炭酸体を静注すると PCA は顕著に抑

Table 2 Inhibition of PCA by plain 6059-S hapten

Antiserum to (Dilution)	Recipient (Number)	Elicitor (6059-S · OVA)	Hapten (6059-S)	Intensity of PCA*	Inhibition (%)
6059-S · BGG (1:16)	Rat (3) (3)	2 mg	None	51 ± 5.0	—
			20 mg	23 ± 2.5	55**
			None	56 ± 9.0	—
	(3)	2 mg	5 mg	48 ± 7.9	14
	(4)	0.4 mg	None	30 ± 0.5	—
	(4)		5 mg	14 ± 1.5	53**
OVA (1:128)	Rat (3) (3)	2 mg	None	35 ± 0.6	—
			20 mg	30 ± 5.5	17
6059-S · BGG (1:16)	Mouse (4) (4)	2 mg	None	35 ± 3.7	—
			20 mg	9 ± 2.2	74**
OVA (1:32)	Mouse (4) (4)	1 mg	None	17 ± 2.9	—
			20 mg	19 ± 3.5	-12

\* Amount (μg) of the infiltrated dye (Mean ± SD)

\*\* Significant inhibition (p < 0.01)

Table 3 Immunological cross-reactivity among 6059-S, decarboxylated product of 6059-S and other  $\beta$ -lactam antibiotics in the production of PCA

Antiserum to	Elicitor	Antibody titer		
		Mouse IgE	Guinea pig IgG <sub>1</sub>	Rabbit IgG
6059-S · BGG	6059-S · OVA	1:128	1:1,000 – 1:10,000	1:1,000 – 1:10,000
	Dec. 6059-S · OVA	1:8	1:1,000	1:1,000
	PCG · OVA	—*	—	—
	ABPC · OVA	—	—	—
	CET · OVA	—	—	—
	CEZ · BSA	—	—	—
	CMD · BSA	—	—	—
	OVA	—	—	—
	BSA	—	—	—
Dec. 6059-S** · BGG	Dec. 6059-S · OVA	1:64	1:1,000 – 1:10,000	1:1,000 – 1:10,000
	6059-S · OVA	—	—	—
	PCG · OVA	—	—	—
	ABPC · OVA	—	—	—
	CET · OVA	—	—	—
	CEZ · BSA	—	—	—
	OVA	—	—	—
	BSA	—	—	—
PCG · BGG	PCG · OVA	1:128	1:10,000	1:10,000
	6059-S · OVA	—	—	—
	Dec. 6059-S · OVA	—	—	—
	OVA	—	—	—
ABPC · BGG	ABPC · OVA	1:128	1:100	1:1,000
	6059-S · OVA	—	—	—
	Dec. 6059-S · OVA	—	—	—
	OVA	—	—	—
CET · BGG	CET · OVA	1:64	1:1,000	1:1,000
	6059-S · OVA	—	—	—
	Dec. 6059-S · OVA	—	—	—
	OVA	—	—	—
CEZ · BGG	CEZ · BSA	1:32	1:100	1:100
	6059-S · OVA	—	—	—
	Dec. 6059-S · OVA	—	—	—
	BSA	—	—	—
	OVA	—	—	—
CMD · BGG	CMD · BSA	1:16	1:1,000	NT***
	6059-S · OVA	—	—	NT

\* Negative

\*\* Decarboxylated product of 6059-S

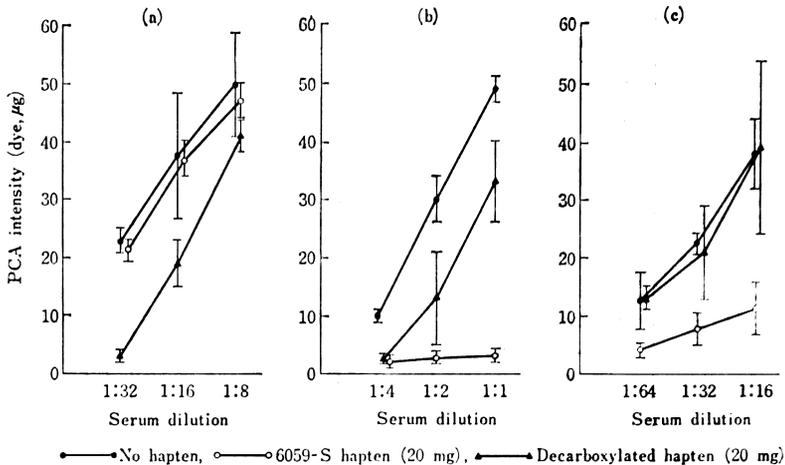
\*\*\* NT: Not tested

Fig. 2 Hapten inhibition of rat PCA mediated by mouse IgE antibodies (Results were expressed by the two determinations and their average of the duplicate tests.)

(a) Ab : Anti-decarboxylated 6059 S·BGG serum, Ag : Decarboxylated 6059-S·OVA (2 mg)

(b) Ab : Anti-6059-S·BGG serum, Ag : Decarboxylated 6059-S·OVA (2 mg)

(c) Ab : Anti-6059-S·BGG serum, Ag : 6059-S·OVA (2 mg)



制されたが、6059-Sを与えたのでは阻害は観察されなかった。他方、高濃度の抗6059-S血清で感作されたラットに脱炭酸体抗原をチャレンジしたときに生じるPCAは、脱炭酸体によって阻害されるだけでなく、それ以上に強く6059-Sによって抑制された。但し、脱炭酸体抗原を作用させたときにPCAを惹起し得ないような希薄な抗6059-S血清(1:16~1:64希釈)と6059-S·OVAとによるPCAは6059-Sハプテンで阻害されるが、脱炭酸体ハプテンでは阻害されなかった。

#### (2) モルモット及びウサギ IgG 抗体系での検定

Table 3 に記した通り、モルモット IgG<sub>1</sub> 抗体及びウサギ IgG 抗体を使用した PCA でもマウス IgE 抗体の場合と同様の結果が得られた。やはり対照薬との間の交差反応性はみられず、6059-S と脱炭酸体との間にはマウス抗体の場合よりも顕著な一方交差反応が生じた。また、表示を省略するが、この一方交差反応性は PCA 阻害実験結果からも支持された。

#### (3) モルモット能動全身アナフィラキシーによる検定

モルモット抗体を用いた PCA テストと類似の結果が能動アナフィラキシー試験においても得られた (Table 4)。

#### (4) ゲル内沈降反応による検定

*In vitro* 試験法としてウサギの免疫血清を使用したゲル内沈降反応を行なったところ、Table 5 に示したように、モルモット PCA での検定結果と一致した成績が得られた。なお、抗 ABPC 血清は抗体価が低かったのか、対応抗原を作用させても沈降線を形成し得なかったためこの表から除外した。

#### 4. *In vitro* 直接クームス反応陽性化作用

3つのメーカーのクームス試薬を使用したか、どの試薬を用いても類似の結果が得られた。Table 6 に表示したように、作用が最も強かったのは CET で、1.25~5 mg/ml で陽性反応を呈した。CMD と PCG がそれに次ぎ、20~40 mg/ml で陽性結果を得た。6059-S とその脱炭酸体は CEZ とともに、40 mg/ml の高濃度で作用させてもクームス反応を起さなかった。

#### 考 察

$\beta$ -ラクタム 抗生物質が過敏症をひき起す原因については、従来、これらの薬物やその生体内代謝物が生体蛋白質と結合することによって抗原性を獲得するからであろうという考え方が一般的である。しかし、近年、これらの薬物製剤中に抗原性を有する高分子不純物が含まれているという事例が報告され<sup>6-8)</sup>、不純物の検索や抗原性を問題視すべきであるということも提唱されている。

Table 4 Immunological cross-reactivity of 6059-S, decarboxylated product of 6059-S and other antibiotics in the production of active anaphylactic shock in the guinea pig

Immunized to	Elicitor	Anaphylactic shock	
		Positive/Total	Fatal/Total
6059-S · BGG	6059-S · OVA	3/3	3/3
	Dec. 6059-S · OVA	3/3	
	PCG · OVA	0/2	
	ABPC · OVA	0/2	
	CET · OVA	0/2	
	CEZ · BSA	0/2	
	OVA	0/2	
	BSA	0/2	
Dec. 6059-S · BGG	Dec. 6059-S · OVA	2/2	2/2
	6059-S · OVA	0/2	
	PCG · OVA	0/2	
	ABPC · OVA	0/2	
	CET · OVA	0/2	
	CEZ · BSA	0/2	
	OVA	0/2	
	BSA	0/2	
PCG · BGG	PCG · OVA	3/3	2/3
	6059-S · OVA	0/3	
	Dec. 6059-S · OVA	0/3	
	OVA	0/3	
ABPC · BGG	ABPC · OVA	3/3	
	6059-S · OVA	0/3	
	Dec. 6059-S · OVA	0/3	
	OVA	0/3	
CET · BGG	CET · OVA	3/3	3/3
	6059-S · OVA	0/3	
	Dec. 6059-S · OVA	0/3	
	OVA	0/3	
CEZ · BGG	CEZ · BSA	2/3	1/3
	6059-S · OVA	0/3	
	Dec. 6059-S · OVA	0/3	
	OVA	0/3	
	BSA	0/3	

この場合、抗原となり得る不純物としては、まず第一に、薬物と何らかの蛋白質との複合体であるという可能性が考えられるが、重合させると抗生物質の抗原性が高くなるという知見<sup>9-11)</sup>を考慮すると、薬剤分子やその変形物の重合体が関与するという可能性も無視できな

い。しかし、重合体の性状や抗原性については、これまでに最も研究が進んでいる PCG<sup>8-10)</sup> や ABPC<sup>12)</sup> についてさえまだ不明なことが多く、それ以外のβ-ラクタム抗生物質に関しては、既に市販されているものについても、ようやく研究の緒についたばかりでしかない。我々

Table 5 Immunological cross-reactivity of 6059-S, decarboxylated product of 6059-S and other antibiotics in the precipitin reaction using rabbit antisera

Antiserum	Elicitor	Precipitin reaction
6059-S · BGG	6059-S · OVA	+
	Dec. 6059-S · OVA	+
	PCG · OVA	-
	ABPC · OVA	-
	CET · OVA	-
	CEZ · BSA	-
	OVA	-
Dec. 6059-S · BGG	Dec. 6059-S · OVA	+
	6059-S · OVA	-
	PCG · OVA	-
	ABPC · OVA	-
	CET · OVA	-
	CEZ · BSA	-
	OVA	-
PCG · BGG	PCG · OVA	+
	6059-S · OVA	-
	Dec. 6059-S · OVA	-
CET · BGG	CET · OVA	+
	6059-S · OVA	-
	Dec. 6059-S · OVA	-
	OVA	-
CEZ · BGG	CEZ · BSA	+
	6059-S · OVA	-
	Dec. 6059-S · OVA	-
	OVA	-
	BSA	-
		-
		-
		-

は、6059-Sの抗原性に関する前臨床試験を行なうに当たり、以上のような最近の研究の動向や現状を考慮に入れて薬剤試料そのものの免疫原性と誘発原性をしらべることにした。仮に、6059-S やその脱炭酸体試料中に蛋白質結合体や重合体など抗原性を有する不純物が含有されていたとしても、あるいは、薬剤分子や代謝物が生体蛋白質と結合して抗原性を発揮するとしても、そのどちらをもひっくるめた総合的な検定が期待できるからである。その結果、しらべた限りにおいて、6059-S やその脱炭酸体は免疫原性と誘発原性のいずれをも示さなかった。勿論、小動物を用いた実験の結果をそのままヒトに適用することはできないが、同じ免疫条件で、CET や PCG に対しては抗体産生が観察されたこと、また、これらの対照薬剤は実験系によっては誘発原性を示すという報告<sup>6,11)</sup> を考え合わせると、6059-S やその脱炭酸体の抗原性は両対照薬剤のそれに比べて弱いと評価してよからう。

免疫原性や誘発原性と並ぶもう一つの重要な問題点として、新しい抗生物質と既に広く用いられている他の抗生物質との間の免疫学的交差反応性がある。交差反応性検定のモデル実験としては、対応した抗原と抗血清の間に確実な陽性反応を起すことが必要であるので、この実験には各種 BGG 結合体に対する免疫血清と各種 OVA または BSA 結合体とを組合わせて検定を行なった。マウス、モルモット、ウサギのどの動物由来の抗血清を用いた実験においても、6059-S やその脱炭酸体は 4 種の市販品とは交差反応を起さなかった。また、化学構造上、他の対照薬よりも類似している CMD との間にも

Table 6 *In vitro* direct COOMBS' reaction

Antibiotic	Blood			S.T. (Type 0)			K.M. (Type A)		M.H. (Type A)		
	COOMBS' reagent	O.S. (Type 0)*			A	B	C	A	B	A	B
CET		2.5**	5.0	5.0	1.25	5	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0
CMD		20	>40	40	20	20	20	NT***	NT	NT	NT
PCG		40	40	40	20	40	40	20	40	40	40
CEZ		>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
6059-S		>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
Dec. 6059-S		>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40

\* Blood group type

\*\* Minimum concentration (mg/ml) to produce positive hemagglutination

\*\*\* NT: Not tested

COOMBS' reagent: A - Ortho

B - Kokusai-Shiyaku

C - Tokyo-Hyojun-Kessei

交差反応性はみとめられなかった。交差反応が観察されたのは 6059-S と脱炭酸体との間のみであるが、それは、どの試験法の場合も一方向性であった。抗 6059-S 血清が脱炭酸体抗原と交差反応を惹起したことは二通りに解釈される。その一つは、本来、抗 6059-S 抗体は脱炭酸体抗原とは反応しないが、抗血清中に抗脱炭酸体抗体が含有されていたために見かけ上の交差反応が観察されたという考え方である。6059-S 試料中に微量ながら脱炭酸体が含まれているので、6059-S・BGG 中にも脱炭酸体の BGG 結合物が混在し、このものが抗脱炭酸体の産生を誘導したという可能性が考えられるからである。もう一つは、抗脱炭酸体抗体は 6059-S と反応しないのに対し、抗 6059-S 抗体は脱炭酸体とある程度反応し得るという、真の一方向交差反応性が示されたとする見方である。現時点ではこのどちらが正しいかを断定することはできないが、PCA のハプテン阻害実験の結果からみれば後者の方がより妥当であると推論される。すなわち、抗脱炭酸体血清と対応抗原とによる PCA は 6059-S ハプテンで阻害されなかったが、抗 6059-S 血清と脱炭酸体抗原とによる PCA は脱炭酸体ハプテンによって阻害されるのみでなく、6059-S ハプテンの投与によってより著しく抑制された。もし、抗 6059-S 血清中に含まれる抗脱炭酸体抗体が PCA を惹起したのであれば、抗脱炭酸体血清の場合と同じように 6059-S ハプテンでは阻害は起らない筈である。このような理由から後者の立場を採るとき、6059-S 分子の 7 位側鎖部分における一つの COOH 基の有無が特異性決定の上でかなり大きな要因になることが示唆される。類似の現象として、我々は、モルモットやマウスの抗体を用いた場合の PCG と ABPC の間の一方向的交差反応性を観察している<sup>12)</sup>。抗 ABPC 抗体は PCG 抗原と極めて強く反応するが、抗 PCG 抗体は ABPC 抗原とごく微弱な反応を呈するに過ぎない。 $\beta$ -ラクタム抗生物質の免疫学的特異性の決定には、前報<sup>3)</sup>で論議したように、ペニシリン核やセファロスポリン核部分、或いは分子全体の立体的輪廓が関与すると考えた方がよい場合もあるが、acyl 側鎖の構造が大きな役割を演ずるという考え方<sup>14)</sup>の方が一般的である。6059-S と脱炭酸体との関係や PCG と ABPC との相互関係は側鎖部分の置換基の重要性を強調する一事例に数えることができる。

脱炭酸体をも含めて、6059-S 試料が容易に PCA を阻害するという事は、この薬剤の安全性の上での一つの特長を示すと見なすことができる。観察された PCA 阻害はハプテンと誘発抗原との間の特異的競合にもとづく解釈されるが、抗 PCG・BGG や抗 ABPC・BGG 抗体と対応 OVA 抗原との反応系では、6059-S の場合

と同程度の明確な PCA 阻害を起すには、一価ハプテンとして、PCG や ABPC のラクタム環を開裂させ  $\epsilon$ -アミノカプロン酸と結合させたものを使用する必要があった。PCG や ABPC 製剤そのものでは大量を投与した場合に極く微弱な阻害が生じるに過ぎなかった(未発表)。これらのペニシリン類の場合、蛋白質結合体を調製するために  $\beta$ -ラクタム環を開くと、それに伴って薬物分子の立体的輪廓がかなり大きく変化してしまうのに対し、6059-S やその脱炭酸体の場合は環の開裂後も、もとの三次元構造が概ね維持されているのではないかと推察される。さきにも述べたように、6059-S には誘発抗原性はみとめられないが、仮に、何らかの機構で一部の分子が抗原性を獲得したとしても、残りの未変化分子によって過敏性副作用の発現は抑えられるものと期待される。

本報に述べた *in vitro* 直接クームス反応は薬剤と抗薬剤抗体との反応に基づくものでなく、過敏症とのつながりは疑問視されている<sup>15)</sup>。抗生物質のクームス反応陽性化作用は、その免疫学的性質というよりも、血球表面に対する直接作用として取扱うべきであるが、より広く特殊毒性検査の立場から考えればこの作用もない方が望ましい。6059-S や脱炭酸体の場合、40 mg/ml という高濃度でも反応は陰性であった。臨床用量ではこのような高い血中濃度が数時間に亘って持続するということは考えられないので、これらの薬物がクームス反応を介した副作用をあらわすことはないと判断される。

以上を綜括して、検討した限りにおいて、6059-S は免疫学的に不活性であり、ヒトにおいても過敏性副作用を起す可能性は小さいものと推察される。

## 謝 辞

本実験を行なうに当り、6059-S 或いはその脱炭酸体の蛋白質結合体の調製、ならびに、ハプテン結合数測定を塩野義製薬研究所 江幡光雄、井上 健、吉田信夫各博士に依頼した。御協力に対して深甚の謝意を表したい。

## 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. Exo. 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, 松本光史, 小池昌子, 江幡光雄 :

- Cefaclor の免疫学的特性。 *Chemotherapy* 27(S-7) : 755~764, 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. Pharmac.* 23 : 218~219, 1971
- 5) 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
- 6) MURANAKA, M. ; H. IGARASHI, K. KOIZUMI, H. OKUMURA, K. TAKEDA & S. SUZUKI : Elicitation of homologous passive cutaneous anaphylactic reactions by a benzyl-penicillin preparation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54 : 329~338, 1974
- 7) 竹内良夫 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (2) Procaine PCG suspension 中に存在する PCG polymer の検出。 *アレルギー* 26 : 504~510, 1977
- 8) DE WECK, A. L. : C. H. SCHNEIDER & J. GUTERSOHN : The role of penicilloylated protein impurities, penicillin polymers and dimers in penicillin allergy. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 33 : 535~567, 1968
- 9) 竹内良夫, 西村葉子, 山地幸雄, 木村義民 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (1) PCG polymer に対するラットの免疫応答。 *アレルギー* 28 : 10~16, 1977
- 10) MUNRO, A. C. ; J. M. DEWDNEY, H. SMITH & A. W. WHEELER : Antigenic properties of polymers formed by  $\beta$ -lactam antibiotics. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50 : 192~205, 1976
- 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) AHLSTEDT, S. ; A. KRISTOFFERSSON, P. O. SVÄRD, L. THOR & B. ÖRTENGREN : Ampicillin polymers as elicitors of passive cutaneous anaphylaxis. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51 : 131~139, 1976
- 13) 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
- 14) 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
- 15) MOLTHAN, L. ; M. M. REIDENBERG & M. F. AICHIMAN : Positive direct COOMBS' test due to cephalothin. *New Eng. J. Med.* 277 : 123~126, 1967

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF A NEWLY SYNTHESIZED  
 $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTIC AGENT 6059-S

MINORU HARADA, MITSUNOBU MATSUMOTO  
and MITSUO TAKEUCHI

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co. Ltd.

Immunological properties of a preparation of a newly synthesized  $\beta$ -lactam antibiotic, 6059-S, were examined. Since the preparation contained a very minute amount of its decarboxylated form, investigation was also done with this contaminant.

(1) Immunogenicity of the unconjugated 6059-S and its decarboxylated product was compared with that of CET and PCG in the mouse and guinea pig. So far as tested, both 6059-S and its decarboxylated product failed to produce antibodies under experimental conditions where definite antibody formation to CET and PCG was observed.

(2) Neither 6059-S nor its decarboxylated contaminant lacked the eliciting antigenicity, since they were incapable of eliciting PCA in animals presensitized with the immune sera to their BGG conjugates. In addition, intravenous injection of the unconjugated antibiotics simultaneously with the homologous multivalent elicitors produced marked PCA inhibition, presumably by competing with the elicitors.

(3) Immunological cross-reactivity among 6059-S, its decarboxylated product and some penicillins and cephalosporins was determined by means of PCA, active anaphylactic shock and precipitin reaction using the antibiotic-BGG conjugates as the immunogens and the OVA or BSA conjugates as the eliciting antigens. In all the reaction systems, 6059-S and its decarboxylated preparation did not cross-react with any one of the penicillins and cephalosporins tested. "One way" cross-reactivity was observed between 6059-S and its derivative. While the antiserum to 6059-S-BGG provoked cross-reaction with the decarboxylated hapten, the antiserum to the BGG conjugate of the decarboxylated 6059-S failed to react with 6059-S.

(4) 6059-S and its derivative never produced the *in vitro* direct Coombs' reaction in the human blood even at a high concentration of 40 mg/ml.

In all these experimental measures of humoral immunological reactivity, 6059-S preparation was inactive.