

## 新合成抗菌薬 DL-8280 の抗原性に関する検討

高見光孝・和賀井信彦・服部浩之・荒内龍夫

第一製薬株式会社中央研究所

新合成抗菌薬 DL-8280 の抗原性をモルモット、ウサギおよびマウスを用いて検討した。モルモットおよびウサギを用いた実験では、DL-8280 の 10 または 100 mg/kg を週 3 回ずつ 6 回経口投与するか、あるいは 1 mg をフロインド・アジュバントとともに 2 回足趾内などに投与して感作した。これら感作血清について、モルモットを用いた PCA 反応、受身血球凝集反応およびゲル内沈降反応を調べたが、DL-8280 に対する抗体は検出されなかった。また感作モルモットについては、DL-8280 誘発投与による全身アナフィラキシー反応の発来性を検討したが、反応は陰性であった。マウスを用いた実験では、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを用い、DL-8280 の 10 または 100 mg/kg を 30 日の間隔において 2 回腹腔内投与して感作した。感作血清について、ラットを用いた PCA 反応により、DL-8280 に対する IgE 抗体の検出を行ったところ、陰性の成績が得られた。

なお、ヒト血液を用いた試験管内直接クームス反応を試みたが、DL-8280 にクームス陽性化作用は認められなかった。

DL-8280 は第一製薬株式会社に開発された新しい合成抗菌薬で、その抗菌スペクトラムは広く、グラム陽性および陰性菌に優れた抗菌力を示すことが認められている<sup>1)</sup>。DL-8280 は Fig. 1 に示す化学構造を有する黄白色結晶性の粉末で、水に溶けにくい弱酸性または弱アルカリ性条件では溶けやすい化合物である。類似の化学構造を持った抗菌薬には nalidixic acid, pipemidic acid, norfloxacin および cinoxacin などがある。

本報では、DL-8280 の安全性評価の一環としてモルモット、ウサギおよびマウスを用いて抗原性を検討するとともに、試験管内直接クームス反応を行ったので、それらの成績を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of DL-8280



M.W.: 361.37

(±)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de][1,4]benzoxazine-6-carboxylic acid

## 材料および方法

## 1. 被験物質

第一製薬株式会社に合成された DL-8280 (Lot No. 105~108) と norfloxacin (NFLX, Lot No. 81-1130) のほかに nalidixic acid (NA, 第一製薬), pipemidic acid (PPA, 大日本製薬) および cephalothin (CET, 塩野義

製薬)を用いた。陽性対照物質または担体蛋白としては、ウシ血清アルブミン (BSA, ×4 crystalized, NBC), モルモット血清アルブミン (GSA, fraction V, MILES) および卵白アルブミン (OVA, grade V, SIGMA) を用いた。

## 2. DL-8280・BSA 結合物の調製

DL-8280 の 2 g を蒸留水 50 ml に pH 4 の条件で懸濁後、水溶性カルボジイミド [1-ethyl-3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide・HCl, MERCK] 4 g を加えて室温で 10 分間反応させた。この遠心上清に BSA 20 mg を加え、pH 4 に保ちながら室温で 4 時間、さらに 4°C で一晚反応させた。反応液を希釈塩酸 (約 pH 4) に対して透析したのち、凍結乾燥し、DL-8280・BSA 結合物を得た。1 分子の BSA に結合した DL-8280 を 327 nm における吸光度から測定すると約 6 個であった。

## 3. 使用動物

感作のための動物としては、ハートレー系モルモット (雌性, 体重 300~370 g, 静岡実験動物農業協同組合), ニュージーランドホホワイト種ウサギ (雄性, 体重 3.0~3.4 kg, 東京実験動物) および BALB/C 系マウス (雌性, 9 週齢, 体重 21~22 g, 日本チャールスリバー) を使用した。また PCA 反応のレシピエント動物としては、ハートレー系モルモット (雌性, 体重 270~590 g, 静岡実験動物農業協同組合・金丸動物) および SD 系ラット (雌性, 体重 240~280 g, 静岡実験動物農業協同組合) を用いた。

#### 4. 感作方法

##### (1) モルモットの感作

DL-8280 を 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) 溶液に懸濁させ、1 回量を 10 または 100 mg/kg とし、隔日に週 3 回ずつ計 6 回経口投与して感作した。また、他の群では DL-8280 を pH 4.6 の酢酸緩衝液に溶解したのち、等量のプロインド・アジュバント (FA と略す) を加えてエマルジョンとし、14 日の間隔で 2 回四肢足趾内または皮内に投与して感作した。なお 1 回感作量は 1 mg/匹とし、1 回目はプロインド完全アジュバント (FCA, DIFCO)、2 回目にはプロインド不完全アジュバント (FIA, DIFCO) をそれぞれ用いた。陽性対照群としては、BSA 溶液の FA とのエマルジョンを同様の方法で投与した。最終投与後 13 日目に眼窩静脈叢より採血し、分離血清を  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。モルモットは DL-8280 感作群で 5 匹ずつ、対照群で 3 匹使用した。

##### (2) ウサギの感作

モルモットの場合と同様に、DL-8280 を 0.5% CMC に懸濁し、100 mg/kg を隔日に週 3 回ずつ計 6 回経口投与するか、生理食塩液に溶解した DL-8280 溶液を FA とのエマルジョンとし、1 mg/匹を 14 日間隔で 2 回四肢足趾・筋肉内に投与して感作した。陰性対照群としては、生理食塩液と FA とのエマルジョンを同様の方法で投与した。最終投与後 14 日目に耳静脈より採血し、分離血清を  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。ウサギは各群 3 匹ずつ用いた。

##### (3) マウスの感作

DL-8280 の生理食塩液懸濁液 (一部溶解) を、浜岡の方法<sup>2)</sup>により調製した水酸化アルミニウムゲル  $[\text{Al}(\text{OH})_3, 16 \text{ mg/ml}]$  に 1:1 の割合で混合し、1 回量が 10 または 100 mg/kg となるように体重 10 g あたり 0.2 ml ずつを 30 日間隔で 2 回腹腔内投与して感作した。陽性対照群としては、OVA の 1 mg を水酸化アルミニウムゲル 4 mg に吸着させた 0.5 ml/匹を同様の方法で投与した。最終投与後 7 日目に大腿動脈より採血し、5 倍希釈プール血漿として  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。マウスは各群 5 匹ずつ使用した。

#### 5. 全身アナフィラキシー反応

DL-8280 の経口感作および FA 併用感作モルモットについて、最終感作後 14 日目および 28 日目の 2 回にわたり誘発を行った。第一回目誘発では DL-8280 の 10 mg/kg を希釈塩酸に溶解して、また第 2 回目誘発では、DL-8280 の 2 mg と GSA の 5 mg とを 1/15M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 1 ml に溶解後  $37^{\circ}\text{C}$  で 24 時間反応させた DL-8280・GSA 混合加温液の 1 ml/匹を静脈内に投与した。BSA の FA 併用感作モルモ

ットには、最終感作後 28 日目に BSA の 1 mg/匹を 1 回だけ投与した。誘発投与後の全身アナフィラキシー・ショック症状の観察および判定は KOIZUMI らの方法<sup>3)</sup>に準拠した。なお、DL-8280 溶液または DL-8280・GSA 混合加温液の静脈内投与において、上記の誘発量が未感作動物で毒性症状を出現させないことをあらかじめ確認した。

#### 6. 受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応

PCA 反応では、DL-8280, NA, PPA, NFLX の 10 mg/kg, DL-8280・GSA 混合加温液の 1 ml/匹, DL-8280・BSA 結合物の 1 mg/匹ならびに陽性対照物質の BSA および OVA を誘発用抗原として使用した。

##### (1) モルモットを用いた PCA 反応

モルモットの IgG<sub>1</sub> およびウサギの IgG 抗体の検出には、OVARY の方法<sup>4)</sup>に準じ、モルモットをレシピエントとした 4 時間 PCA 反応で行った。感作モルモットまたはウサギ血清の 4 倍から始まる 2 倍連続希釈液を生理食塩液で作し、その 0.1 ml ずつを毛刈りした健常モルモットの皮内に投与した。4 時間後に誘発用抗原液と 0.5 ml の 1% エンスブルーを静脈内投与し、皮内投与局所の色素漏出反応を 30 分後に調べた。試験は 2 例ずつのレシピエントを用いて行い、直径 5 mm 以上の青色斑が形成された場合を陽性とみなし、陽性反応を示す最大希釈倍数を PCA (モルモット IgG<sub>1</sub> またはウサギ IgG 抗体) 価とした。

##### (2) ラットを用いた PCA 反応

マウスの IgE 抗体の検出は、MOTA の方法<sup>5)</sup>に準じ、ラットをレシピエントとした 24 時間 PCA 反応で行った。感作マウスの 5 倍希釈プール血漿を 2 倍連続希釈し、その 0.05 ml ずつをラットの皮内に投与した。PCA (マウス IgE 抗体) 価の求め方は、モルモットにおける PCA 反応の場合と同様であった。

#### 7. 受身血球凝集 (PHA) 反応

モルモットおよびウサギ血清について、DL-8280 に対する凝集抗体の検出を行った。抗原感作血球の調製は HERBERT の方法<sup>6)</sup>を一部変えてつぎのとおり行った。ホルマリン・タンニン酸処理ヒツジ赤血球 (SRBC) を燐酸緩衝液 (0.075M, pH 5.6) で 5% 浮遊液とし、これに 0.1 mg/ml の DL-8280・BSA 結合物溶液または BSA 溶液を等量ずつ加えて室温で 30 分間ゆるやかにかくはんしながら反応させた。PBS で洗浄したのち、あらかじめ SRBC で吸収した正常ウサギ血清を 0.01% 濃度を含む PBS で 1% 浮遊液とし、感作血球として用いた。反応はマイクロプレート法で行った。すなわち、 $56^{\circ}\text{C}$ 、30 分間加温後、SRBC により吸収処理した被験血清を 0.5% 正常ウサギ血清添加 PBS を用いて 25  $\mu\text{l}$  ずつの 2

Table 1 Systemic anaphylaxis in the sensitized guinea pig

Sensitization				Provocation		Incidence* of positive reaction
Antigen	Dose	Route (Adjuvant)	No. of administrations	Antigen	Dose	
DL-8280	10mg/kg	p.o.	6	DL-8280	10mg/kg	0 / 5
				DL-8280-GSA mixture**	1ml/animal	0 / 4
DL-8280	100mg/kg	p.o.	6	DL-8280	10mg/kg	0 / 5
				DL-8280-GSA mixture	1ml/animal	0 / 5
DL-8280	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	2	DL-8280	10mg/kg	0 / 5
				DL-8280-GSA mixture	1ml/animal	0 / 5
BSA	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	2	BSA	1mg/animal	3 / 3

\*No. of animals with anaphylaxis/No. of animals tested

\*\* Mixture was incubated at 37°C for 24hr.

倍希釈列とし、感作血球浮遊液を 25  $\mu$ l ずつ加えて振とう後、一晚放置して凝集の有無を観察した。凝集を示す被験血清の最大希釈倍数を PHA 抗体価とした。

#### 8. 寒天ゲル内沈降反応

感作モルモット血清について、DL-8280・BSA 結合物または BSA を検出用抗原として沈降抗体の検出を OUCHTERLONY 法で行った。寒天末 (Agar-EPI, 半井化学) を 1% 濃度に溶解し、オブジェクトガラス板上に平板を作製した。中央のウェルには検出用抗原液 (DL-8280・BSA 結合物 2 mg/ml または BSA 1 mg/ml) の 7.5  $\mu$ l を、5 mm を隔てた周囲ウェルには被験血清の 7.5  $\mu$ l を入れたのち、室温で反応させた。沈降線の観察は反応開始後 48 時間まで行った。

#### 9. 試験管内直接クームス反応

MOLTHAN 法<sup>7)</sup> に準じ、ヒト血液を用いた試験管内直接クームス反応を行った。DL-8280 および CET を PBS に溶解し、それぞれ 0.2 ml ずつの 2 倍連続希釈列とした。これにヒト O 型血液 (ALSERVER 液保存) を 0.4 ml ずつ加えて 37°C で 3 時間反応させ遠心分離した。沈渣赤血球を PBS で 5 回洗浄後、2% PBS 浮遊液とした。それらの 1 滴ずつにクームス血清 (オルソー社製および国際試薬株式会社製) を 2 滴ずつ加え、振り混ぜたのちただちに 1,000 rpm で 1 分間遠心し、沈渣を乱しながら凝集の有無を判定した。凝集の強さを 5 段階 (-,  $\pm$ , +,  $\text{++}$ ,  $\text{+++}$ ) に分けて表し、+ 以上を陽性とした。

### 実験成績

#### 1. モルモットにおける抗原性

##### (1) 全身アナフィラキシー反応の発来

実験成績を Table 1 に示した。DL-8280 の経口感作または FA 併用感作モルモットについて、最終感作後 14 日目に DL-8280 の静脈内投与による誘発を、さらに 14 日後 (最終感作後 28 日目) に DL-8280-GSA 混合加温液投与による再誘発を行った結果、いずれの誘発用抗原に対しても全身アナフィラキシー・ショック症状は全く惹起されなかった。なお、DL-8280 の経口感作群の 1 匹が誘発投与 6 日後に死亡したが、この動物は試験開始時から体重増加が不良で、不顕性感染などの内因に誘発前日のエーテル麻酔下採血などのストレスが加わり死亡したものと推定された。BSA の FA 併用感作モルモットでは、最終感作後 28 日目の BSA 誘発投与により、全例に挙動不安、搔鼻、そしゃく、咳・くしゃみ、呼吸困難、チアノーゼ、痙攣などのショック症状が出現し、3 匹中 1 匹が死亡した。

##### (2) IgG<sub>1</sub> 抗体の産生

全身アナフィラキシー誘発前日 (最終投与後 13 日目) に採取したモルモット血清の IgG<sub>1</sub> 抗体価を Table 2 に示した。DL-8280 の経口投与または FA 併用投与により感作した場合、DL-8280 および DL-8280-GSA 混合加温液などの誘発用抗原に対する IgG<sub>1</sub> 抗体価は、いずれも 4 倍未満を示し、特異的 IgG<sub>1</sub> 抗体は産生されなかった。BSA の FA 併用投与により感作した場合、BSA に対する IgG<sub>1</sub> 抗体価は 256~8,192 倍を示した。

##### (3) 凝集抗体および沈降抗体の産生

感作モルモット血清の PHA 抗体と沈降抗体に関する成績をまとめて Table 3 に示した。DL-8280 で感作したモルモットの血清と DL-8280・BSA 結合物による感作血球との PHA 反応において抗体価はいずれも 10 倍未

Table 2 Determination of IgG<sub>1</sub> antibody in the serum from the sensitized guinea pig by passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

Sensitization				No. of sera tested	Eliciting antigen	
					DL-8280 10mg/kg	DL-8280·GSA mixture 1ml/animal
DL-8280	10mg/kg	p.o.	× 6	5	< 4*	< 4
DL-8280	100mg/kg	p.o.	× 6	5	< 4	< 4
DL-8280	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	× 2	5	< 4	< 4
BSA	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	× 2	3	BSA 1mg/animal 256~8,192**	

\* Guinea pig 4-hr PCA (IgG<sub>1</sub>) titer

\*\* Range of PCA titers

Table 3 Determination of antibodies in the serum from the sensitized guinea pig by passive hemagglutination (PHA) and precipitation reactions

Sensitization				No. of sera tested	PHA titer by SRBC coated with	Precipitation reaction with
					DL-8280·BSA conjugate	DL-8280·BSA conjugate
DL-8280	10mg/kg	p.o.	× 6	5	< 10	Negative
DL-8280	100mg/kg	p.o.	× 6	5	< 10	Negative
DL-8280	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	× 2	5	< 10	Negative
BSA	1mg/animal	foot pad & i.d. (FCA, FIA)	× 2	3	BSA 40~160	BSA Positive

Table 4 Production of specific antibodies in the sensitized rabbit

Sensitization				No. of sera tested	Guinea pig 4-hr PCA titer* to		PHA titer by SRBC coated with DL-8280·BSA conjugate
Antigen	Dose	Route (Adjuvant)	No. of administrations		DL-8280 10mg/kg	DL-8280·BSA conjugate 1mg/animal	
DL-8280	100mg/kg	p.o.	6	3	< 4	< 4	< 10
DL-8280	1mg/animal	foot pad & i.m. (FCA, FIA)	2	3	< 4	< 4	< 10
Saline		foot pad & i.m. (FCA, FIA)	2	3	< 4	< 4	< 10

\* IgG titer

滴を示し、DL-8280 に対する特異的凝集抗体の産生は認められなかった。また DL-8280 感作血清と DL-8280·BSA 結合物との沈降反応もすべて陰性であり、沈降抗体の産生はみられなかった。BSA の FA 併用投与により

感作した場合、BSA に対する PHA 抗体価は 40~160 倍の結果が得られ、沈降反応も全例が陽性を示した。

## 2. ウサギにおける抗原性

最終感作後 14 日目のウサギの血清について、IgG 抗体

Table 5 Production of specific IgE antibody in the sensitized mouse

Sensitization			No. of animals	Rat 24-hr PCA titer* to	
Antigen	Dose	Adjuvant (Dose)		DL-8280 10mg/kg	DL-8280·BSA conjugate 1mg/animal
DL-8280	10mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> (1.6mg/10g)	5	< 5	< 5
DL-8280	100mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> (1.6mg/10g)	5	< 5	< 5
OVA	1mg/animal	Al(OH) <sub>3</sub> (4mg/animal)	5	OVA 1mg/animal 640	

\* IgE titer in pooled plasma

Table 6 Cross-reactivity of NA, PPA and NFLX to the sera from animals sensitized with DL-8280 in PCA reaction

Sensitization				Reaction examined	Eliciting antigen		
					NA 10mg/kg	PPA 10mg/kg	NFLX 10mg/kg
Guinea pigs :	DL-8280	10mg/kg	p.o.	Guinea pig 4-hr PCA (IgG <sub>1</sub> )	0/5*(<4)**	0/5(<4)	0/5(<4)
	DL-8280	100mg/kg	p.o.		0/5 (<4)	0/5(<4)	0/5(<4)
	DL-8280	1mg/animal	food pad & i.d. (FCA, FIA)		0/5 (<4)	0/5(<4)	0/5(<4)
Rabbits :	DL-8280	100mg/kg	p.o.	Guinea pig 4-hr PCA (IgG)	0/3 (<4)	0/3(<4)	0/3(<4)
	DL-8280	1mg/animal	foot pad & i.m. (FCA, FIA)		0/3 (<4)	0/3(<4)	0/3(<4)
Mice :	DL-8280	10 mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> (1.6mg/10g)	Rat 24-hr PCA (IgE)	<5***	< 5	< 5
	DL-8280	100mg/kg	Al(OH) <sub>3</sub> (1.6mg/10g)		<5	< 5	< 5

\* No. of sera with positive reaction / No. of sera tested

\*\* PCA titer

\*\*\* PCA titer of pooled plasma

価および PHA 抗体価を測定し、成績を一括して Table 4 に示した。感作ウサギ血清の IgG 抗体価の測定をモルモットをレシピエントとした 4 時間 PCA 反応で行った結果、DL-8280 および DL-8280·BSA 結合物に対していずれも 4 倍希釈血清で陰性であった。また、DL-8280·BSA 結合物による感作血球に対する PHA 抗体価はいずれも 10 倍未満を示した。このように、DL-8280 の経口

投与または FA 併用投与により感作したウサギにおいて、DL-8280 に対する特異的 IgG 抗体ならびに凝集抗体の産生は認められなかった。

### 3. マウスにおける特異的 IgE 抗体の産生

最終感作後 7 日目のマウス・プール血漿について、ラットをレシピエントとした 24 時間 PCA 反応により IgE 抗体を測定し、成績を Table 5 に示した。DL-8280 に

Table 7 *In vitro* direct COOMBS' reaction

Material	COOMBS' reagent	Final concentration of materials tested (mg/ml)					
		1.33	0.67	0.33	0.17	0.08	
DL-8280	Ortho	—	—	—	—	—	
	Kokusai	—	—	—	—	—	
CET	Ortho	40	20	10	5	2.5	1.25
	Kokusai	卅	卅	卄	+	±	—
		卄	+	±	—	—	—

対する IgE 抗体の検出は、DL-8280 と DL-8280·BSA 結合物を誘発用抗原として用いたが、血漿中 IgE 抗体価はいずれも 5 倍未満を示し、DL-8280 と水酸化アルミニウムゲルの混合液投与により感作したマウスにおいて、特異的 IgE 抗体の産生は認められなかった。OVA で感作したマウスでは、OVA に対して 640 倍の IgE 抗体価が認められた。

#### 4. 他の合成抗菌薬との交差反応性

一般に、他剤との免疫学的交差反応性を検討するには、ある程度抗体価の高い血清を使用する必要がある。本実験において、DL-8280 で感作したモルモット、ウサギ、マウスのいずれにおいても、DL-8280 に対する特異抗体を検出できなかったが、これら感作血清により受身感作したモルモットまたはラットに、DL-8280 と類似の化学構造を有する NA, PPA, および NFLX を単独静脈内投与することにより PCA 反応の発来性を検討した。成績は Table 6 に示したように、DL-8280 感作動物の血清とこれら他剤のいずれの組み合わせにおいても、PCA 反応は全く惹起されなかった。

#### 5. 試験管内直接クームス反応

DL-8280 を PBS で飽和溶液とし、この 2 倍連続希釈列をヒト血液に作用させた。成績は Table 7 に示したように、DL-8280 の終濃度 0.08~1.33 mg/ml のいずれの処置群においてもクームス陽性反応は認められなかった。対照として用いた CET 処置群では、オルソー社製クームス血清では 5 mg/ml、国際試薬社製クームス血清では 20 mg/ml 以上の濃度でクームス反応陽性を示した。

#### 考 察

DL-8280 の抗原性をモルモット、ウサギおよびマウスを用いて検討した。

薬物の抗原性を動物を用いて調べるには、できるだけ臨床適用方法に近い形での感作が望ましいといえよう。

しかし、低分子薬物に対する免疫応答は一般にそのような条件下では成立し難いと考えられ、アジュバントを併用した感作がしばしば試みられている。アジュバントを用いた場合の反応は必ずしも臨床における薬物アレルギーを反映するものではないが、薬物の潜在的感作能力を予測するためには有用な方法と考えられる。一方、薬物を異種蛋白に結合させて動物を感作すれば、多くの場合に薬物に対する抗体が産生されるが、この人工的な方法では、生体内における薬物の感作原性発現に関する情報を得るためには無理であろう。したがって、本報では、感作用抗原として DL-8280 そのものを用い、臨床投与経路である経口投与による感作のほか、フロインド・アジュバントあるいは水酸化アルミニウムゲルを併用した非経口投与による感作を試みた。経口感作における DL-8280 の 1 回投与量は、臨床で予想される最大量 (600 mg/man) に相当する 10 mg/kg またはその 10 倍量の 100 mg/kg とした。

感作動物における特異抗体の検出方法のうち全身アナフィラキシーおよび PCA 反応など *in vivo* 試験では、誘発用抗原として、DL-8280 そのものを用いたほかに、DL-8280·GSA 混合加温液または DL-8280·BSA 結合物を用いることにより抗体検出の確実化を図った。また PHA および沈降反応など *in vitro* 試験では、人工的ではあるが完全抗原であるところの DL-8280·BSA 結合物を用いた。

臨床適用方法に近い形である DL-8280 そのものの経口投与により感作を施したモルモットおよびウサギについてみると、誘発用抗原として DL-8280 そのものを用いた場合のみならず、DL-8280·GSA 混合加温液あるいは DL-8280·BSA 結合物を用いた場合にも、DL-8280 に対する特異抗体は全く検出されなかった。つぎに、臨床用法に比し極めて苛酷な条件として、アジュバントを併用した非経口投与により感作したモルモット、ウサギお

よびマウスにおいても、DL-8280 そのもの、DL-8280・GSA 混合加温液あるいは DL-8280・BSA 結合物のいずれを誘発用抗原とすることによっても、DL-8280 に対する特異抗体の検出はできなかつた。

なお、DL-8280 と化学構造が類似している他剤との交差反応性を検討する目的で、DL-8280 感作動物の血清を用いた各種 PCA 反応において、NA, PPA および NFLX の誘発投与を試みたところ、反応は全く惹起されなかつた。

ところで、 $\beta$ -lactam 剤などは試験管内直接クームス陽性化作用を示すことが報告されている<sup>9,10</sup>が、合成抗菌薬である DL-8280 について試験管内直接クームス反応を行ったところ、DL-8280 の飽和溶液を用い 1.33 mg/ml の濃度でヒト血液を処理した場合においても陰性の結果が得られた。この濃度はヒトに 600 mg (臨床最大使用予想量)を経口投与したときの最高血中濃度 (6~8  $\mu$ g/ml)<sup>10</sup> の約 200 倍に相当する。したがって、DL-8280 は臨床使用においてクームス反応陽性化作用を示さないものと推察される。

以上の成績から明らかなように、DL-8280 はモルモット、ウサギおよびマウスのいずれに対しても抗原性を示さず、またクームス陽性化作用も認められなかつたことから、免疫学的な安全性が高い薬物であると考えられる。

なお、本研究は昭和 56 年 6 月から昭和 58 年 1 月に実施した。

#### 文 献

1) SATO, K.; Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y.

OSADA, H. OGAWA & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* activity of DL-8280, a new oxazine derivative. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 22: 548~553, 1982

- 2) 浜岡利之: マウスのレアギン抗体産生を誘導する免疫法と検出法。免疫実験操作法 抗体 IX の 1, 日本免疫学会, 827~835 頁, 1974
- 3) KOIZUMI, K.; S. SUZUKI, S. FUKUBA, K. TADOKORO, K. HIRAI & M. MURANAKA: Antigenicity of semisynthetic penicillin preparation to evoke systemic anaphylactic reaction in animal models. *Allergy* 35: 657~664, 1980
- 4) O'VARY, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. *In Immunological Methods*, Blackwell Scientific Publications, pp. 259~283, 1964
- 5) MOTA, I. & D. WONG: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sciences* 8: 813~820, 1969
- 6) HERBERT, W. J.: Passive haemagglutination with special surface to the tanned cell technique. *In Handbook of Experimental Immunology* (D. M. WEIR, Ed.), Blackwell Scientific Publications, Chapter 20, 1978
- 7) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct COOMBS' tests due to cephalothin. *New Engl. J. Med.* 277: 123~125, 1967
- 8) 宮川千恵子, 田沢房子, 峯島博子, 小酒井望: セファロスポリン剤による直接クームス試験陽性に関する基礎的研究. *Chemotherapy* 18: 497~500, 1970
- 9) 峯 靖弘: セファロスポリン C 抗生物質の免疫学的研究. *アレルギー* 20: 798~808, 1971
- 10) 一原規方, 立澤晴男, 津村光義, 采 孟, 佐藤敬喜: DL-8280 の第一相臨床試験. *Chemotherapy* 32(S-1): 118~149, 1984

## STUDIES ON ANTIGENICITY OF DL-8280

MITSUTAKA TAKAMI, NOBUHIKO WAGAI, HIROYUKI HATTORI and TATSUO ARAUCHI  
Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.

Antigenicity of DL-8280, a new synthetic antibacterial agent, was examined with several kinds of experimental animals. Guinea pigs and rabbits were sensitized with oral administrations of DL-8280 (10 ; 100 mg/kg) three times a week for 2 weeks, or with intradermal (into the footpads) and intramuscular injections of DL-8280 (1 mg/animal) emulsified in FREUND's adjuvant twice at 2 weeks interval. In the sera obtained from these sensitized animals, no antibodies to DL-8280 were detectable by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs, and hemagglutination and precipitation reactions. No systemic anaphylaxis was observed in the sensitized guinea pigs after intravenous injection of DL-8280. Mice were sensitized with intraperitoneal injections of DL-8280 (10 ; 100 mg/kg) mixed in aluminum hydroxide gel twice at 30 days interval. In the pooled mouse plasma, specific IgE antibody to DL-8280 was not detected by PCA in rats.

Moreover, DL-8280 could not induce a positive reaction in the *in vitro* direct COOMBS' test.