

Cefuroxime axetil (CXM-AX) の免疫学的検討

福田 一郎・長岐為一郎・武田 憲三・奥村 和夫

新日本実業株式会社東京研究所

経口セファロsporin系抗生物質である Cefuroxime axetil (CXM-AX, SN 407) の免疫学的特性、すなわち、免疫原性、交差反応性および誘発原性を Cefuroxime (CXM) および Cephalexin (CEX) を対照として比較検討し、以下の結論を得た。

1. Freund's complete adjuvant とのエマルジョンとしてウサギを感作し、酵素抗体法により IgM および IgG 抗体を測定した結果、それぞれ薬剤に対する特異抗体が産生され、その抗体価の強さは $CXM-AX=CXM>CEX$ の順であった。

2. 抗 CXM-AX ウサギ血清を用いて、他の β -ラクタム系抗生物質との交差反応性を間接赤血球凝集ハプテン阻止反応にて検討したところ、CXM-AX は CXM と強い交差性を示した。さらに、Cephalothin (CET), Ampicillin (ABPC) および 7-ACA に対しても弱い交差性が認められた。

3. CXM-AX および対照薬剤と回虫抽出エキス (ASE) との結合物でマウスを感作すると、薬剤単独および薬剤-ヒト血清アルブミン (HSA) 結合物を誘発抗原として、ラット PCA 反応を惹起する IgE 型抗体が産生された。

4. CXM-AX および対照薬剤の ASE 結合物で感作したモルモットに、薬剤単独または薬剤・HSA 結合物を誘発抗原として能動的全身性アナフィラキシー症状の誘発を試みた結果、CXM-AX 感作群では CXM-AX 単独の静脈内および経口投与による誘発では全例が無症状であった。しかし、CXM の静脈内投与による誘発で 1/2 例に軽度 (+) の症状が惹起された。CXM-AX・HSA および CXM・HSA 結合物による誘発では全例がショック死に至った。

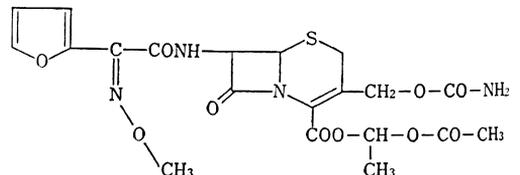
5. CXM-AX の抗原性を注射による免疫で検討した結果、その強さは CEX より若干強く、CXM と同程度であることおよび本薬剤の臨床投与ルートが経口であることから、CXM-AX が他のセファロsporin系抗生物質と比較して特に強いアレルギー性副作用を発揮するものではないと考えられた。

Cefuroxime axetil (CXM-AX, SN 407) は下記の化学構造を持つ新しいタイプの経口用セファロsporin系抗生物質である。構造上の特徴は従来の Cefuroxime (CXM) の4位カルボキシル基を1-アセトキシエチル基によりエステル化し、脂溶性を高め消化管での吸収性を増したものである。

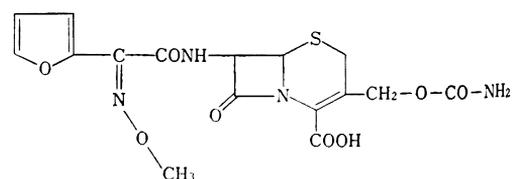
本薬剤は、腸管で脱エステル化を受け CXM として吸収されるプロドラッグであるが、先の我々の報告から、CXM の抗原性は他剤と比較して特に強いものではないとの結果が得られている。そこで本研究は、CXM-AX 自体が胃粘膜あるいは腸管壁等との接触によりアレルギー性副作用を引き起こすか否かを一般的な抗生物質の抗原性試験法に準じて実施したものである。対照薬剤として CXM-AX の代謝活性体である CXM および最も一般的な経口用セファロsporinの1つである Cephalexin (CEX) を用い、ウサギ、マウスおよびモルモットを免

Fig. 1 Chemical structure of Cefuroxime axetil and Cefuroxime

1) Cefuroxime axetil (CXM-AX)



2) Cefuroxime (CXM)



疫して各抗体クラス (Ig-class) を産生する免疫原性、市販の β -ラクタム剤との免疫学的交差反応性および種々のアレルギー反応を惹起する誘発原性について比較検討した。なお、本研究の実施期間は、1982年11月より1983年3月までである。

I. 実験材料と方法

1. 被検薬剤 (抗原)

動物への免疫原として、Cefuroxime axetil (CXM-AX, SN 407: グラクソ社), Cefuroxime (CXM: グラクソ社) および Cephalexin (CEX: グラクソ社) を使用した。

免疫学的交差性の検討には、前三者の他に Cephalothin (CET: グラクソ社), Cephaloridine (CER: グラクソ社), Cefazolin (CEZ: 藤沢), Benzylpenicillin (PCG: グラクソ社), Cefaclor (CCL: 塩野義), Aminobenzylpenicillin (ABPC: 明治製薬), 6-aminopenicillanic acid (6-APA: 東京化成) および 7-aminoccephalosporanic acid (7-ACA: Aldorich 社) を使用した。

2. Carrier protein および adjuvant

Human serum albumin (HSA: Fraction V) は、Miles 社より購入し、Ascaris extract (ASE) は STREJAN²⁾ らの方法により調製した。Freund's complete adjuvant (FCA) は、Difco Laboratories 社より購入し、水酸化アルミニウムゲル (Alum) は LEVINE³⁾ らの方法に準じて調製した。

3. 酵素抗体法に使用した材料

イムノビーズ マトリックスはバイオラッド社より、ベルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体は Miles 社より購入して使用した。ベルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgM 抗体は、Miles 社より購入した抗ウサギ IgM-ヤギ全血清から Sephadex G-100 にて IgG フラクションを得、これにアルデヒド化したベルオキシダーゼを MATHIEN⁴⁾ の方法により結合させ、ベルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgM-ヤギ IgG フラクションを調製した。

4. 被験動物

免疫動物としてはウサギ (日本白色在来種雄性, 体重 2.1~2.6 kg, 市川屋), 2系統の近交系マウス (BALB/c, C3H/He, 12週齢, 雄性, 日本チャールス・リバー社) およびモルモット (Hartley 系, 雌性, 体重 250~300 g, 日本医科学動物) を使用した。PCA 反応の recipient にはラット (SD 系, 雄性, 20~25週齢, 日本チャールス・リバー社) およびモルモット (Hartley 系, 雌性, 体重 250~300 g, 日本医科学動物) を使用した。

5. 抗生剤・タンパク質結合物 (H・C 結合物) の調製

HSA または ASE 75 mg と各抗生剤 300 mg を 5 ml

のペロナル緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、1 N NaOH で pH 8.5~11.0 に修正しながら 37°C で 24 時間反応させた。反応終了後、生理食塩液 (pH 8.0) に対し 5 日間、5°C で透析し未反応の抗生剤を除去した。次いで内液を凍結乾燥し、得られた乾燥物を H・C 結合物とした。

6. 感作血球の調製

感作血球は、AVRAMEAS⁵⁾ らの方法に準じて調製した。すなわち、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS: pH 7.2) で 3 回洗浄したヒツジ赤血球 (SRBC) の沈渣 1 ml に PBS 25 ml, H・C 結合物 25 mg および 2.5% glutaraldehyde 溶液 5 ml を加え、スターラーで攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。反応溶液を PBS で 3 回遠沈洗浄し、アジ化ナトリウムを 0.1% 含有した PBS にて 1% 感作血球浮遊液とした。

7. 免疫方法

(1) ウサギの免疫方法

21 匹のウサギを 1 群 7 匹として 3 群に分け、各ウサギに CXM-AX あるいは対照薬剤 (CXM, CEX) の FCA エマルジョンを JOSEPHSON⁶⁾ の方法に準じて投与し免疫した。すなわち、感作開始第 0 日目に薬剤 100 mg/ml 溶液 1 ml と FCA 1.5 ml で調製したエマルジョンを四肢 foot pads に約 0.6 ml ずつ皮内投与し、7 日目および 14 日目に同様に調製したエマルジョンを背部皮下に十数箇所に分けて注射した。さらに第 31 日目より 39 日目まで隔日で 5 回、各薬剤の 100 mg/ml 懸濁液または溶液 1 ml を大腿部筋肉内に投与し補強注射した。

なお、本方法では高濃度の薬剤溶液 (100 mg/ml) を必要とするが、CXM-AX は水に難溶性のため、あらかじめ各薬剤を FCA にて均一な懸濁液 (100 mg/FCA 1.5 ml) とし、その懸濁液 1.5 ml と注射用蒸留水 1 ml を用いエマルジョンを作成した。

感作開始 7 日目より週 1 回間隔で 49 日目まで耳静脈より採血し、血清を得、酵素抗体法により各感作抗原に対する特異 IgG および IgM 抗体を測定した。

(2) マウスの免疫方法

2 系統の近交系マウス (BALB/c, C3H/He) 各 30 匹を 1 群 10 匹として 3 群に分けた。さらに各抗原の感作量によるマウス系統間での応答性を検討するために、各群を 2 分して 5 匹ずつの小群とし、それぞれに抗原 (各薬剤・ASE 結合物) 10 μ g (N 量) または 1 μ g (N 量) を 5 mg の Alum に吸着し、週間隔で 3 回腹腔注射して免疫した。最終感作後 10 日目に腹大静脈より採血して血清を得、マウス IgE 型抗体をラット 24 時間 PCA 反応で測定した。なお、C3H/He, CEX・ASE (1 μ g) 感作群の個体番号 25 のマウスは感作途中事故により死亡したため、この群は 1 群 4 匹として評価した。

(3) モルモットの免疫方法

30匹のモルモットを1群10匹として3群に分け、各群にマウスと同様の抗原10 μ g(N量)をAlum10mgに吸着し、10日間隔で3回腹腔注射して免疫した。最終感作後10日目に後眼窩静脈叢より採血し血清を得、homologous PCA反応を行い、12日目に能動的全身性アナフィラキシー症状の誘発を行った。

8. 血清免疫学的方法

(1) 酵素抗体法(ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay)

CXM-AXあるいは対照薬剤のHSA結合物をカルボジイミド試薬を用いてイムノビーズに固着化し抗原感作ビーズを調製した。この抗原感作ビーズ3.3mg/ml浮遊液0.5mlに検体(IgG抗体測定用は500倍, IgM抗体測定用は100倍希釈血清)0.5mlを加え、室温で3時間反応させた。反応終了後、PBSで3回遠沈洗浄を行い未反応の血清成分を除去した。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGまたはIgM抗体(抗IgG抗体は市販品の5,000倍, 抗IgM抗体は前記標識抗体の50倍希釈液)1mlを加え、4°Cで18時間反応させた。反応終了後、PBSで3回遠沈洗浄を行い、過剰な酵素標識抗体を除去した。次いで、ペルオキシダーゼ基質(0.1% O-phenyldiamine in PBS+0.02% H₂O₂)1mlを加え良く攪拌して30分間酵素反応を行った。1N塩酸にて反応を停止させ、遠沈によりイムノビーズを除き、上清の493nmにおける吸光度を測定し、各薬剤に対する特異IgGまたはIgM抗体を測定した。

(2) 間接赤血球凝集ハブテン阻止反応

抗生剤(ハブテン)の2倍希釈系列を200mMを第1管として作製した。

次いで、あらかじめ間接赤血球凝集反応を行い各抗血清(第49日目血清)の凝集価を求め、この4単位希釈血清(最大凝集価の4倍濃度)25 μ lを全管に滴下した。内容をよく攪拌し、37°Cで1時間反応させた後、1%感作血球浮遊液25 μ lを全管に滴下した。攪拌後、室温で1夜静置し、沈降血球の管底像から阻止反応を判定した。阻止価は100%凝集阻止を示すハブテンの最少濃度(mM)で示した。なお、水溶性の低いCEXおよびCCLは100mM/ml、難溶性のCXM-AXは2mM/mlを最高濃度として希釈系列を作製した。

(3) 受身皮膚アナフィラキシー(PCA)反応

マウスIgE型抗体の測定はラット24時間PCA反応、モルモットIgG_{1a}およびIgG_{1b}型抗体は56°C、4時間加熱処理した血清を用いたhomologous4時間および48時間PCA反応、IgE型抗体は加熱していない血清を用いた8日間PCA反応により測定した。

各免疫動物から得られた抗血清の2倍希釈系列を生理食塩液にて作製し、この希釈液0.1mlをそれぞれrecipientの背部皮内に注射した。所定の皮膚感作時間が経過した後、誘発抗原としてCXM-AXは2mg/ml、対照薬剤は30mg/ml、さらに各薬剤-HSA結合物は8mg/ml溶液を1% Evans blue生理食塩液と等量混合したものを1ml静脈注射しPCA反応を惹起した。判定は誘発抗原を静脈注射後約1時間目に放血致死させ、剥皮し、裏側より色素斑の長短径を測定し平均径が5mm以上のものを陽性とし、その血清の最大希釈倍数をPCA価とした。

(4) モルモット能動的全身性アナフィラキシー(ASA)反応

最終感作後12日目に静脈注射または経口投与によりASA症状の誘発を行った。静脈注射による誘発はCXM-AXは1mg、対照薬剤は15mg、各薬剤-HSA結合物は4mgを1mlの生理食塩液に溶解し投与した。経口投与による誘発ではCXM-AXまたはCEX30mgを生理食塩液2mlに懸濁または溶解して行った。各誘発抗原を投与した直後に現われるASA症状の程度を既法⁷⁾に準じ、+、++、+++と表現し判定した。

II. 成績

1. ウサギでの検討

(1) 抗体産生能

Fig. 2に示したように、CXM-AXおよび対照薬剤のFCAエマルジョンにて頻回に免疫すると、各薬剤に対する特異IgGおよびIgM抗体の産生が認められた。

各薬剤のIgG抗体は感作開始後14日目より検出され、その後、抗CXM-AX-IgG抗体は42日目に最高値を示し、49日目には若干減少した。抗CXMあるいは抗CEX-IgG抗体は、最終測定日の49日目まで上昇し続けた。

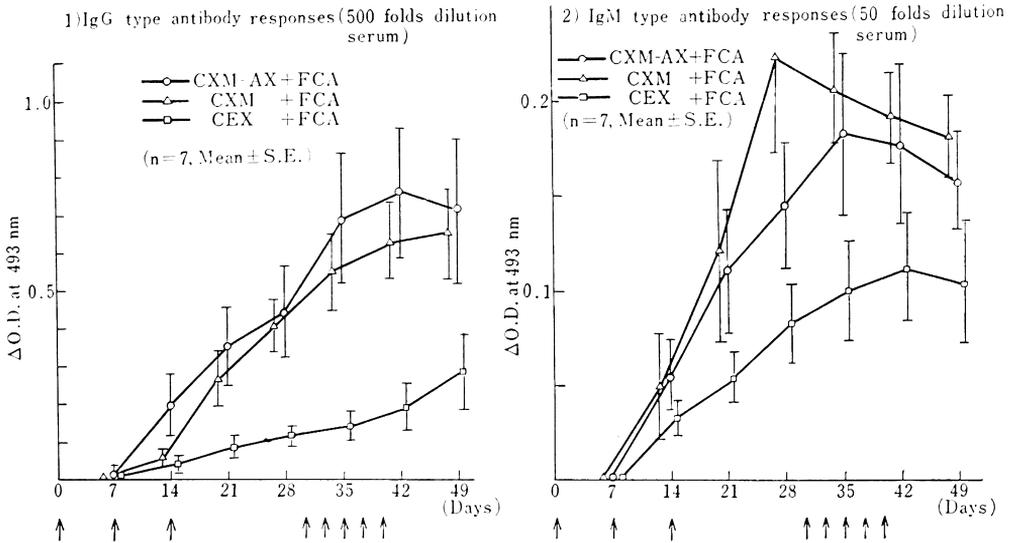
IgM抗体の測定でも感作開始後14日目より検出され、その後、抗CXM-AX-IgM抗体は35日目に、抗CXM-IgM抗体は28日目に、抗CEX-IgM抗体では42日目に最高値を示し、以後下降していった。抗CXM-AX抗体の強さは、IgGおよびIgM抗体ともCXMと同程度でCEXよりは強いものであった。

(2) 免疫学的交差反応性

Table 1-1, 1-2および1-3にウサギを各薬剤のFCAエマルジョンで免疫し得られた最終抗血清を用いて間接赤血球凝集ハブテン阻止反応にて交差性を検討した結果を示した。

抗CXM-AX血清は感作抗原であるCXM-AXと由来ハブテンであるCXMにより強く凝集反応が阻止された。他にもCET, ABPCおよび7-ACAで反応が阻

Fig. 2 Antibody responses to CXM-AX, CXM and CEX detected by ELISA method



止され、これらとの交差性が認められたが、いずれも弱いものであった。

抗 CXM 血清でも同様に CXM および CXM-AX の低濃度ハブテン溶液で反応を阻止し、強い交差反応性が認められた。さらに、CET と 7-ACA で若干阻止され弱い交差性が認められた。

抗 CEX 血清では、感作抗原である CEX で反応を阻止した他に、CXM, CET, CER, ABPC および 7-ACA でも弱い交差性が認められた。

2. マウスでの検討

(1) マウス IgE 型抗体産生能

Table 2-1 および 2-2 に CXM-AX または対照薬剤の ASE 結合物で 2 系統のマウスを感作し、IgE 型抗体産生能を検討した結果を示した。

CXM-AX·ASE 感作群では 1 μ g (N 量) で頻回に免疫しても 2 系統のマウスともに CXM-AX 単独または CXM-AX·HSA の誘発で PCA 反応を惹起せず、IgE 型抗体の産生は認められなかった。10 μ g (N 量) 感作群では CXM-AX 単独誘発で BALB/c で 1/5 例が 20 倍の PCA 価を示し、CXM-AX·HSA 誘発では BALB/c, C3H/He 全例に PCA 反応を惹起した。

CXM·ASE 感作群でも同様に 1 μ g (N 量) 感作群ではいずれの誘発原に対しても PCA 反応を惹起しなかった。10 μ g (N 量) 感作群では CXM 単独で PCA 反応を惹起しなかったが、CXM·HSA 誘発により BALB/c で 5 例全例、C3H/He で 4/5 例に PCA 反応を惹起した。

CEX·ASE 感作群では 1 μ g (N 量) 感作群で前 2 薬剤と異なり CEX·HSA 誘発により C3H/He の 2/5 例に PCA 反応を惹起した。10 μ g (N 量) 感作群では CEX 単独で BALB/c で 1/5 例が 40 倍の PCA 価を示し、CEX·HSA 誘発では BALB/c が 5 例全例、C3H/He では 4/5 例に PCA 反応を惹起した。

(2) マウス IgE 型抗体での交差性

両系統の抗 CXM-AX·ASE IgE 型抗体のラット PCA 反応での誘発原性により CXM との交差性を検討した結果を同じく Table 2-1 および 2-2 に示した。抗 CXM-AX·ASE IgE 型抗体は CXM·HSA 誘発でも CXM-AX·HSA 誘発と同様に PCA 反応を惹起し、その PCA 価は CXM-AX·HSA 誘発とほぼ同程度の値を示し、強い交差性が認められた。

3. モルモットでの検討

(1) 能動的全身性アナフィラキシー

Table 3-1 に示したように CXM-AX·ASE 感作群では、CXM-AX を 1 mg/body の静脈注射あるいは 30 mg/body の経口投与をしても ASA 症状は誘発されなかったが、CXM 15 mg/body 単独誘発で 1/2 例が軽度 (+) の症状を呈した。CXM-AX·HSA または CXM·HSA ではそれぞれ全例がショック死(卍)に至った。

Table 3-2 には CXM·ASE 感作群での結果を示した。CXM 単独誘発で 3 例全例が ASA 症状を発現し、その内 1 例が重度(卍)の症状を呈したが、ショック死には至らなかった。CXM-AX の経口投与による誘発では全例が無症状であった。CXM·HSA および CXM-AX·HSA

Table 1-1 Hapten inhibition of hemagglutination of anti CXM-AX rabbit serum against SRBC coated with CXM-AX·HSA

Hapten	Anti CXM-AX individual serum							Mean \pm S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	
CXM-AX	>1	0.25	>1	>1	>1	>1	>1	>1
CXM	12.5	1.56	12.5	12.5	12.5	25	6.25	11.8 \pm 7.2
CEX	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
CET	25	25	25	25	50	50	25	32.1 \pm 12.2
CER	100	100	>100	25	>100	>100	50	100
CEZ	100	100	>100	100	>100	>100	>100	>100
CCL	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
PCG	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ABPC	6.25	100	50	25	25	25	6.25	33.9 \pm 32.6
7-ACA	25	50	100	50	100	100	6.25	61.6 \pm 38.9
6-APA	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Data represents the lowest concentration (mM) required for 100 % inhibition of hemagglutination

Table 1-2 Hapten inhibition of hemagglutination of anti CXM rabbit serum against SRBC coated with CXM·HSA

Hapten	Anti CXM individual serum							Mean \pm S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	
CXM-AX	0.25	0.03	0.13	0.25	0.06	0.25	0.06	0.15 \pm 0.10
CXM	0.2	\leq 0.1	0.1	\leq 0.1	\leq 0.1	0.2	\leq 0.1	\leq 0.13
CEX	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
CET	25	100	100	50	25	50	100	64.3 \pm 34.9
CER	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100
CEZ	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100
CCL	>50	>50	>50	>50	50	>50	>50	>50
PCG	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ABPC	>100	>100	>100	>100	100	100	100	>100
7-ACA	50	100	100	100	100	50	50	78.6 \pm 26.7
6-APA	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Data represents the lowest concentration (mM) required for 100 % inhibition of hemagglutination

Table 1-3 Hapten inhibition of hemagglutination of anti CEX rabbit serum against SRBC coated with CEX·HSA

Hapten	Anti CEX individual serum							Mean \pm S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	
CXM-AX	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
CXM	12.5	6.25	25	25	50	12.5	100	33.0 \pm 32.8
CEX	3.13	3.13	6.25	12.5	12.5	6.25	25	9.8 \pm 7.7
CET	12.5	6.25	25	25	25	12.5	50	22.3 \pm 14.4
CER	12.5	6.25	>100	>100	100	12.5	100	\geq 90.2
CEZ	>100	100	100	100	100	100	100	>100
CCL	>50	>50	12.5	>50	50	12.5	>50	>50
PCG	100	100	100	100	100	100	>100	>100
ABPC	1.56	1.56	6.25	6.25	50	100	12.5	25.4 \pm 37.0
7-ACA	25	100	100	50	50	100	100	75 \pm 32.3
6-APA	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Data represents the lowest concentration (mM) required for 100 % inhibition of hemagglutination

Table 2-1 IgE type antibody responses to CXM-AX·ASE, CXM·ASE and CEX·ASE conjugates in mice

Mouse strain: BALB/c

Sensitize antigen (dose)	Mouse No.	Challenge antigen					
		CXM-AX (1 mg)	CXM-AX ·HSA (4 mg)	CXM (15 mg)	CXM ·HSA (4 mg)	CEX (15 mg)	CEX ·HSA (4 mg)
CXM-AX·ASE (1 μg/mouse)	1	— ¹	—		—		
	2	—	—		—		
	3	—	—	N.T. ²	—	N.T.	N.T.
	4	—	—		—		
	5	—	—		—		
CXM-AX·ASE (10 μg/mouse)	6	—	40		80		
	7	—	10		20		
	8	—	80	N.T.	40	N.T.	N.T.
	9	—	10		20		
	10	20	40		80		
CXM·ASE (1 μg/mouse)	11			—	—		
	12			—	—		
	13	N.T.	N.T.	—	—	N.T.	N.T.
	14			—	—		
	15			—	—		
CXM·ASE (10 μg/mouse)	16			—	40		
	17			—	40		
	18	N.T.	N.T.	—	40	N.T.	N.T.
	19			—	40		
	20			—	160		
CEX·ASE (1 μg/mouse)	21					—	—
	22					—	—
	23	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	—	—
	24					—	—
	25					—	—
CEX·ASE (10 μg/mouse)	26					—	80
	27					—	320
	28	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	40	40
	29					—	160
	30					—	160

¹: < 5²: Not tested

では前者と同様に全例がショック死に至った。以上の結果が示すように、アナフィラキシー誘発試験でもウサギおよびマウスの結果と同様に CXM-AX と CXM の強い交差性が認められた。

Table 3-3 に示した CEX·ASE 感作群では CEX の静脈注射誘発 (15 mg/body) で 1/4 例が軽度(+)の症状を呈し、経口投与誘発 (30 mg/body) では全例が無症状であった。CEX·HSA 誘発では前 2 薬剤と同様に全例がショック死に至った。

(2) Homologous PCA 反応

CXM-AX·ASE 感作群の homologous PCA 反応の結果を ASA 反応と同様に Table 3-1 に示した。抗 CXM-AX·ASE 血清は CXM-AX (1 mg/body) または CXM (15 mg/body) を静脈注射して IgG_{1a}, IgG_{1b} および IgE 型抗体を測定するそれぞれの PCA 反応を誘発しても、かかる反応は惹起されなかった。CXM-AX·HSA の誘発では IgG_{1a}, IgG_{1b} および IgE 型抗体ともに各々 10 例全例が PCA 反応を惹起した。また、CXM·HSA 誘発で本血清の各々の PCA 反応を惹起すると、マウスでの結果と同様に CXM-AX·HSA と同等

Table 2-2 IgE type antibody responses to CXM-AX·ASE, CXM·ASE and CEX·ASE conjugates in mice

Mouse strain: C3H/He

Sensitize antigen (dose)	Mouse No.	Challenge antigen					
		CXM-AX (1 mg)	CXM-AX ·HSA (4 mg)	CXM (15 mg)	CXM ·HSA (4 mg)	CEX (15 mg)	CEX ·HSA (4 mg)
CXM-AX·ASE (1 µg/mouse)	1	— ¹	—		—		
	2	—	—		—		
	3	—	—	N.T. ²	—	N.T.	N.T.
	4	—	—		—		
	5	—	—		—		
CXM-AX·ASE (10 µg/mouse)	6	—	80		40		
	7	—	40		—		
	8	—	40	N.T.	80	N.T.	N.T.
	9	—	20		20		
	10	—	80		80		
CXM·ASE (1 µg/mouse)	11			—	—		
	12			—	—		
	13	N.T.	N.T.	—	—	N.T.	N.T.
	14			—	—		
	15			—	—		
CXM·ASE (10 µg/mouse)	16			—	80		
	17			—	—		
	18	N.T.	N.T.	—	10	N.T.	N.T.
	19			—	10		
	20			—	10		
CEX·ASE (1 µg/mouse)	21					—	—
	22					—	40
	23	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	—	160
	24					—	—
CEX·ASE (10 µg/mouse)	26					—	160
	27					—	40
	28	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	—	160
	29					—	—
	30					—	80

¹: < 5²: Not tested

の誘発原性を示した。以下、同様に CXM·ASE 感作群 (Table 3-2) でも CXM および CXM-AX 単独ではいずれの PCA 反応をも惹起せず、CXM 単独で重度の ASA 症状を呈した個体でも抗体の存在は確認できなかった。CXM·HSA または CXM-AX·HSA の誘発ではそれぞれの PCA 反応を惹起した。

CEX·ASE 感作群 (Table 3-3) でも、CEX 単独ではいずれの PCA 反応も惹起せず CEX·HSA で前 2 薬剤と同程度の PCA 反応が惹起された。

III. 考 察

CXM-AX は、経口用セファロsporin 剤であるが、本薬剤を動物に注射して免疫し、その免疫学的性質を検討した。これは免疫原性や誘発原性を検討する本来の目的にそうものであり、より明確な免疫学的特異性を明らかにできると考えられたためである。また、低分子化合物の薬剤を単に経口投与または種々の経路により動物に注射しても薬剤に対する特異抗体を産生することは困難である。よって、今回われわれは、従来の注射用セファロsporin 剤の免疫学的検討に用いた免疫方法により動

Table 3-1 Grades of systemic anaphylactic reactions induced by drug or drug-HSA conjugates in guinea pigs sensitized with CXM-AX-ASE conjugate, and homologous PCA titer

Sensitize antigen (dose)	Guinea pig No.	Challenge antigen (dose)	Grades of ¹ systemic anaphylaxis	Homologous PCA titer ²											
				4 hrs PCA				48hrs PCA				8 days PCA			
				Challenge antigen		Challenge antigen		Challenge antigen		Challenge antigen		Challenge antigen		Challenge antigen	
	1	CXM-AX (1 mg i.v.)	-	CXM-AX (1 mg)	CXM-AX (4 mg)	CXM-AX (15 mg)	CXM-HSA (4 mg)	CXM-AX (1 mg)	CXM-AX (4 mg)	CXM-AX (15 mg)	CXM-HSA (4 mg)	CXM-AX (1 mg)	CXM-AX (4 mg)	CXM-AX (15 mg)	CXM-HSA (4 mg)
	2	CXM-AX (1 mg i.v.)	-	CXM-AX (1 mg)	20	40	80	10	160	1,280	320	80	20	160	80
	3	CXM (15mg i.v.)	-	CXM-AX (1 mg)	20	640	10	320	1,280	320	160	160	80	320	40
	4	CXM (15mg i.v.)	+	CXM-AX (1 mg)	20	640	10	320	1,280	320	160	160	80	320	320
CXM-AX-ASE (10 µg/body)	5	CXM-AX (30mg oral)	-	CXM-AX (1 mg)	80	40	160	320	320	20	80	320	40	20	40
	6	CXM-HSA (4 mg i.v.)	-	CXM-AX (1 mg)	320	160	320	160	80	80	320	320	80	160	10
	7	CXM-AX-HSA (4 mg i.v.)	##	CXM-AX (1 mg)	320	320	320	320	320	320	320	320	80	160	20
	8	CXM-AX-HSA (4 mg i.v.)	##	CXM-AX (1 mg)	320	320	320	320	320	320	320	320	160	160	80
	9	CXM-AX-HSA (4 mg i.v.)	##	CXM-AX (1 mg)	320	320	320	320	320	320	320	320	160	160	40
	10	CXM-AX-HSA (4 mg i.v.)	##	CXM-AX (1 mg)	320	320	320	320	320	320	320	320	10	10	10

¹: The severity grades of the systemic anaphylactic reactions were expressed by signs -, +, #, ##, i.e., the sign - represents no anaphylactic symptoms; + means development of any two of such symptoms as restlessness, chewing, rubbing of nose or ears and coughing, but no labored breathing; # indicates an appearance of labored breathing and cyanosis followed by recovery; and ## represents a fatal anaphylactic reaction within 5 min

²: PCA reactions were performed with sera obtained from immunized guinea pigs 2 days before the active systemic anaphylactic reactions were elicited

³: Under the 1/10 dilution PCA titer

Table 3-3 Grades of systemic anaphylactic reactions induced by CEX or CEX-HSA conjugate in guinea pigs sensitized with CEX-ASE conjugate, and homologous PCA titer

Sensitize antigen (dose)	Guinea pig No.	Challenge antigen (dose)	Grades of ¹ systemic anaphylaxis	Homologous PCA titer ²						
				4 hrs PCA		48 hrs PCA		8 days PCA		
				CEX (15 mg)	CEX-HSA (4 mg)	CEX (15 mg)	CEX-HSA (4 mg)	CEX (15 mg)	CEX-HSA (4 mg)	
CEX-ASE (10 µg/body)	1		-	- ³	1,280	-	640	-	-	40
	2	CEX (15 mg i.v.)	+	-	80	-	160	-	-	-
	3		-	-	80	-	160	-	-	10
	4		-	-	320	-	320	-	-	80
	5		-	-	1,280	-	640	-	-	80
	6	CEX (30 mg oral)	-	-	320	-	640	-	-	640
	7		-	-	160	-	160	-	-	1,280
	8		-	-	320	-	320	-	-	160
	9	CEX-HSA (4 mg i.v.)	-	#	160	-	160	-	-	80
	10		-	#	320	-	80	-	-	20

¹ : The severity grades of systemic anaphylactic reactions were expressed by signs -, +, #, i.e., the sign - represents no anaphylactic symptoms; + means development of any tow of such symptoms as restlessness, chewing, rubbing of nose or ears and coughing, but no labored breathing; # indicates an appearance of labored breathing and cyanosis followed by recovery; and # represents a fatal anaphylactic reaction within 5 min

² : PCA reactions were performed with sera obtained from immunized guinea pigs 2 days before the active systemic anaphylactic reactions were elicited

³ : Under the 1/10 dilution PCA titer

物を免疫し検討した。

前記の結果が示すように、CXM-AX を FCA エマルジョンまたは ASE 結合物として Alum に吸着し頻回に免疫するとウサギ、マウスおよびモルモットに対し、他の β -ラクタム系抗生剤と同様に免疫原性を示し特異抗体を産生した。そして、その強さは CEX より若干強く、CXM と同程度であった。

CXM-AX と他の β -ラクタム系抗生剤との免疫学的交差性の検討では、4位のエステル以外は同一構造である CXM とは間接赤血球凝集ハプテン阻止反応、すべての PCA 反応および ASA 症状誘発反応で相互に強い交差性が認められ、全く同一の免疫学的挙動を示した。また、間接赤血球凝集ハプテン阻止反応では、抗 CXM-AX 血清は CXM, CET, 7-ACA と交差性を示した他に、抗 CXM 血清が交差性を示さなかった ABPC にも交差性を示した。一般に β -ラクタム系抗生剤の免疫学的交差性は7位側鎖の類似性に起因するといわれているが、CXM-AX および CXM の7位側鎖である2-メトキシミノフリル基と ABPC のフェニルグリニル基とは類似性が認められない。また、抗 CXM-AX 血清は抗 CXM 血清と比較して母核の7-ACA に対しても若干強い交差性を示した。これらの原因としては CXM-AX の特異構造である4位のエステル化により原田ら⁸⁾が提唱する全体的な立体構造の類似性を引き起こしているものと考えられた。

なお、ウサギの血中特異抗体の測定に用いた ELISA 法は、従来は2-メルカプトエタノール処理などさまざまな方法を用いて目的の Ig-class を測定していたが、ELISA 法の応用により一貫した方法で各 Ig-class を測定できるものと考えられたため、本法を用いたものである。

文 献

- 1) 奥村和夫, 福田一郎, 長岐為一郎, 青木良雄: Cefuroxime の免疫学的検討。Chemotherapy 27(S-6): 280~285, 1979
- 2) STREJAN, G. & D. H. CAMPBELL: Hypersensitivity to Ascaris antigens. 1. Skinsensitising activity of fractions from guinea pigs sensitised to crude extracts. J. Immunol. 98: 893~900, 1967
- 3) LEVINE, B. B. & N. M. VAZ: Effects of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagent production in the mouse. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 39: 156~171, 1970
- 4) MATHIESEN, L. R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A antigen in stool and antibody to hepatitis A antigen in sera: Comparison with solid-phase radioimmunoassay, immune electron microscopy, and immune adherence hemagglutination assay. J. Clin. Microbiol. 7: 184~193, 1978
- 5) AVRAMEAS, S.; B. TAUDOU & S. CHUILON: Glutaraldehyde, Cyanuric chloride and tetrazotized o-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. Immunochemistry 6: 67~76, 1969
- 6) JOSEPHSON, A. L.: The development of antibodies to penicillin in rabbits. J. Exp. Med. 111: 611~620, 1960
- 7) 奥村和夫, 福田一郎, 長岐為一郎, 篠宮幸子: 抗潰瘍剤 Ranitidine hydrochloride の抗原性に関する検討。応用薬理 25 (1): 85~93, 1983
- 8) 原田 稔, 竹内三津男, 松本光史, 小池昌子, 江幡三雄: Cafaclor の免疫学的特性。Chemotherapy 27: 755~764, 1979

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON CEFUROXIME AXETIL

ICHIRO FUKUDA, TAMEICHIRO NAGAKI, KENZO TAKEDA and KAZUO OKUMURA
Tokyo Research Laboratories, Shin Nihon Jitsugyo Co., Ltd.

Immunological properties (i.e. immunogenicity, cross reactivity and elicitingenicity) of cefuroxime axetil (CXM-AX, SN407), an oral cephalosporin antibiotic, were compared with those of cefuroxime (CXM) and cephalixin (CEX). The results obtained were as follows:

1. Rabbits were immunised with emulsion of antibiotics and FCA (Freund's complete adjuvant), and it was found that IgM and IgG type antibodies against antibiotics were produced in them when antibodies were determined by the method of enzyme linked immunosorbent assay.

The activity of anti-CXM-AX sera was as high as that of anti-CXM sera, and higher than that of anti-CEX sera.

2. The immuno cross-reactivity with other β -lactam antibiotics was examined by indirect hapten hemagglutination inhibition test using rabbits' anti-CXM-AX sera. CXM-AX showed strong cross reactivity with CXM, and also showed weak cross reactivity with CET, ABPC and 7-ACA.

3. Mice were immunised with antibiotic-ASE (*Ascaris suum* extracts) conjugates, and it was found that IgE type antibodies were produced in them, which were reactive not only to antibiotic-HSA (human serum albumin) conjugate but also to antibiotics alone.

4. Active systemic anaphylaxis was tested in guinea pigs immunised with antibiotic-ASE conjugates. In the group sensitised with CXM-AX-ASE, no anaphylactic shock was caused in any case by challenge of CXM-AX alone. However, mild positive symptoms were evoked by intravenous challenge of CXM alone in a half of the cases. Challenge of CXM-AX-HSA and CXM-HSA conjugates caused fatal anaphylactic shock in all the cases within 5 mins.

5. Antigenicity of CXM-AX, when examined through immunisation by injection, was slightly stronger than that of CEX and comparable to that of CXM. From this, and the fact that CXM-AX is to be given orally in the clinical use, this drug is not considered to cause any severe allergic side effects compared with other cephalosporin antibiotics.