

Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) ならびに その活性代謝物, 6315-S Oxide の免疫学的性質

原田 稔・竹内三津男・渡辺 昭
塩野義製薬株式会社研究所

新しい oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) ならびにその体内主要代謝物である 6315-S oxide の免疫学的性質をしらべた。

1) マウスおよびモルモットにおいて免疫原性をしらべたところ、対照薬物として用いた Cefmetazole や Cephalothin に対しては PCA 抗体の産生がみとめられる免疫条件で、6315-S や 6315-S oxide については抗体産生を見出すことはできなかった。モルモットの能動アナフィラキシー・ショックを指標とした場合も同様の結果が得られた。感度が著しく高い ELISA 法により血清の総抗体活性を検定した場合でも 6315-S に対する明確な抗体産生は認められなかった。

2) 6315-S や 6315-S oxide とウシγグロブリン (BGG) との結合体に対するモルモットやマウスの免疫血清で受動局所感作したモルモットやラットにこれらの薬物そのものをチャレンジした場合、PCA は惹起されなかった。また、6315-S や 6315-S oxide に対する能動感作を確立させておいたモルモットに、それぞれ対応した薬物をチャレンジした場合にも、ショック症状を認めることはできなかった。これらの結果より、6315-S や 6315-S oxide は過敏症誘発原性を示さないと言える。

3) 各抗生物質の BGG 結合体および GpSA (モルモット血清アルブミン) 結合体をそれぞれ免疫原および誘発原として用い、6315-S ハプテンと市販の 4 種の抗生物質 (PCG, CET, CMZ, LMOX) ハプテンとの間の免疫学的交差反応性をしらべた。モルモットの能動アナフィラキシー・ショックによる検定では、6315-S ハプテンと CET, CMZ, LMOX の 3 種のハプテンとの間に二方向性の交差反応性を認めることができた。モルモット IgG₁ 抗体による同種 PCA で検定した場合は、6315-S ハプテンは CMZ および LMOX ハプテンと二方向性交差反応を呈したが、PCG や CET ハプテンとは交差反応を起こさなかった。C₃H/He マウスの IgE 抗体によるラット PCA の実験系では、抗 6315-S 抗体が CMZ ハプテンとは反応するが抗 CMZ 抗体は 6315-S と反応しないという一方向性交差を呈するにすぎなかった。薬物-蛋白質結合体を免疫原および誘発原の両方に用いたこれらの結果と異なり、誘発原に薬物そのものを当てた場合、6315-S と他の薬物との間に交差反応を見出すことはできなかった。

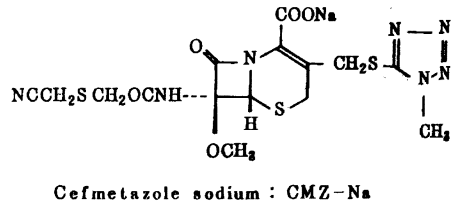
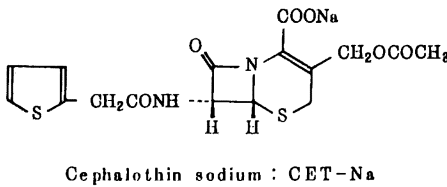
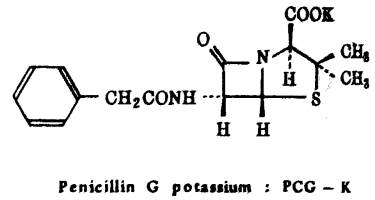
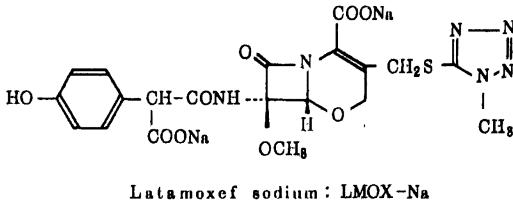
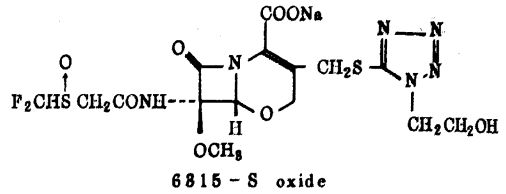
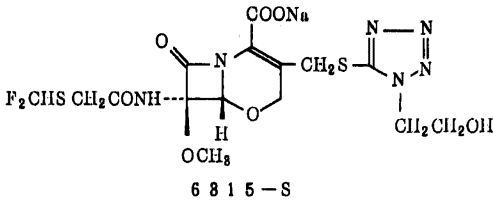
4) MOLTHAN 法により 6315-S のヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用をしらべたところ、40 mg/ml の高濃度においても作用を認めることはできなかった。

以上、しらべた限りにおいて、6315-S には (その代謝物 6315-S oxide 体をも含めて) 何ら免疫学的活性は認められないと言える。この結果から、本薬物がヒトにおいてアレルギー性副作用をひき起こすという可能性は市販の対照薬物のそれに比べてより小さいものと推察される。

β -lactam 抗生物質が一部の患者において種々のアレルギー性副作用を呈することはよく知られている。したがって、新しい β -lactam 抗生物質を開発する場合、副作用防止の一助として、その免疫学的性質を動物レベルで実験的にしらべておくことは不可欠である。ことに、目下開発が進められている 6315-S (Flomoxef :

FMOX) は Fig. 1 に示すように、Latamoxef (LMOX) と同様、1-oxacephem 構造を有するという点で従来の cephalosporin 系のものとは異なる新しいタイプの抗生物質に属するため、免疫学的性質の検定には慎重を期す必要がある。しかしこれまでに知られている β -lactam 抗生物質のアレルギー性副作用は著しく多様で

Fig. 1 Chemical structures of 6315-S and other antibiotics used



あり、それらを実験的に再現し、解析するには広範な実験を要する。こうした事情を考慮して、我々は6315-Sおよびその主要代謝物とされる6315-S oxide¹⁾の免疫学的作用に関する一連の研究を実施しているが、本報では、副作用のうちでも重篤なアナフィラキシー・ショックや最も多発する皮疹を含むI型過敏症に焦点を合わせて検討を行なうことにした。なお、ヒト赤血球を使用し、溶血性貧血など赤血球の免疫学的異常との関連性が疑われている *in vitro* 直接クームス反応陽性化作用についての検定をも併せ行なった。

I. 実験材料および実験方法

1. 実験動物

免疫用動物として、モルモット(静動協, Slc, クリーン・ハートレー系, 雌, 250~300 g), および, C₃H/He ならびに C₅₇BL/6J マウス(いずれも塩野義製薬油日ラボラトリーズ, Shi, SPF, 雌, 6週齢)を用いた。Passive cutaneous anaphylaxis (以下PCAと略す) レシピエントとしてはモルモット(同上)およびWistar/

Shi ラット (SPF, 雌, 7週齢)を使用した。これらの動物は1~2週間の予備飼育の後、実験に供した。

2. 薬物

6315-S (Lot F036NN および F075NN), ならびに 6315-S oxide (Lot F003NN) を被験薬とし, Lata-moxef sodium (LMOX, Shiomarín®, 塩野義製薬, Lot SM2343), Cephalothin sodium (CET, Keflin®, 塩野義製薬, Lot KF2216), Penicillin G potassium (PCG, 明治製薬, Lot GLD507 および GLD512), ならびに Cefmetazole sodium (CMZ, Cefmetazon®, 三共, Lot K508) を対照薬物として使用した。

3. 抗生物質と蛋白質との結合体の調製ならびにそのハプテン含量の測定

キャリア-蛋白質としてウシγ-グロブリン (BGG, Sigma) およびモルモット血清アルブミン (GpSA, Sigma) を選び, LEVINEら²⁾に準じて抗生物質の蛋白質結合体を調製した。すなわち, 蛋白質を, その8倍量(重量比)の薬物とともに生理食塩液に溶解させ(薬物濃度 60 mg/ml), 1 N 苛性ソーダによって pH を 8.8~

9.0に調整しながら、室温にて24時間反応させた。その後、0.005M 磷酸緩衝液(pH 7.4)に対して、1日1回外液を交換しながら、1週間透析を行ない、内液を凍結乾燥した。各結合体のハプテン含量はEBATAら³⁾の方法によって測定した。本報に用いた蛋白質結合体の組成は下記の通りである。

6315-S ₃₇ -BGG	6315-S ₂₈ -GpSA
	6315-S ₃₄ -GpSA
6315-S ₁₂ Oxide-BGG	6315-S ₁₁ Oxide-GpSA
LMOX ₁₀ -BGG	LMOX ₂₈ -GpSA
PCG ₂₄ -BGG	PCG ₃₀ -GpSA
PCG ₅₅ -BGG	
CET ₃₃ -BGG	CET ₂₄ -GpSA
CET ₂₈ -BGG	
CMZ ₅₆ -BGG	CMZ ₄₀ -GpSA
CMZ ₅₇ -BGG	CMZ ₄₅ -GpSA

なお、6315-S-BGGならびに6315-S-GpSA結合体を調製する場合の6315-S標品としては、Lot F036NNを使用した。

4. 免疫方法

1) 薬物と蛋白質との結合体を免疫原とする場合

免疫原としては各薬物のBGG結合体を用いた。モルモットの場合、各結合体溶液(10 mg/ml)とフロイント完全アジュバント(FCA, Difco)との等量混合によるエマルジョン0.2 mlを、1週間隔で3回、腹腔内に注射して免疫した。最終回注射の2週後に心臓穿刺により少量の血液を採取した。C₃H/HeおよびC₅₇BL/6Jマウスの場合もモルモットにおける同じ免疫法によって抗血清を得たが、このほかに、C₅₇BL/6Jマウスでは上記のエマルジョン0.2 mlの1回腹腔内注射後8日間免疫という条件下での抗血清をも採取し、C₃H/Heマウスでは免疫原を吸着させたAl(OH)₃ゲルの注射で免疫した場合の抗血清をも作成した。Al(OH)₃ゲルへの免疫原の吸着は桂⁴⁾の方法によって行ない、C₃H/Heマウス1頭当り2 μgの免疫原を吸着したゲル1 mg(液量0.2 ml)を週1回の割合で3回腹腔内に注射した。この場合も最終回免疫注射の2週後に採血を行なった。

2) 薬物を免疫原とする場合

薬物自体の免疫原性を検討するため、薬物溶液(生理食塩液に溶解、モルモット)、あるいは、薬物を含むFCAエマルジョン(モルモット、マウス)の反復注射による免疫を試みた。

(i) 薬物水溶液による免疫：モルモットの大腿筋肉内に各薬物溶液(1~4 mg/ml) 0.25 ml(薬物量0.25~1.0 mg/animal)を週3回の割合で2週間、計

6回注射して免疫し、最終回免疫注射の2週および4週後に少量ずつ採血した。また、4週目の採血の数日後に、これらの動物を用いて能動アナフィラキシー・ショック実験を行なった。

(ii) 薬物のFCAエマルジョンによる免疫：各薬物溶液(多くの場合10 mg/ml)に等量のFCAを加えてエマルジョンを調製した。モルモットにおいては、週2回の割合で3週間にわたって計6回、各エマルジョン0.2 ml(一般的には薬物量1 mg/animal)を腹腔内に注射して免疫し、その後4週目に心臓より少量の採血を行ない、さらにその数日後に能動アナフィラキシー・ショック実験を実施した。C₅₇BL/6JおよびC₃H/Heマウスにおいては、モルモットと同じく、上記のエマルジョン0.2 mlの6回腹腔内注射で免疫した群と、3~4日間隔で3回注射して免疫した群とを設けた。6回注射の場合も3回注射の場合も、最終回注射の4週後に血清を採取した。

5. 抗原抗体反応

血清中の抗体の検出、薬物の過敏症誘発原性の検定、あるいは、薬物相互間の免疫学的交差反応性の検定は次のような方法によって実施した。

1) モルモットの能動アナフィラキシー・ショックによる検定

最終免疫注射後2週目または4週目の血清を採取した後3~4日間飼育したモルモットの静脈内に、誘発原として薬物10 mgあるいは薬物のGpSA結合体1 mgを注射してショックが起こるかどうかを観察した。ショックの程度を、死亡、重篤(吃逆発作のために横転、ないしは頻死となるもの)、中等度(吃逆発作をくり返すが横転に至らないもの)、軽度(軽い吃逆発作、擡頭動作、耳翼の充血等)および陰性の5段階に区分した。

2) PCAによる検定

(i) モルモット同種PCA：モルモット血清を希釈せずに、または、生理食塩液によって2倍段階希釈して、0.05 mlずつ正常モルモットの背部皮内に注射し、4時間、24時間、または、8日間の感作時間を置いて各種誘発原をエバンス青5 mgとともに静脈内にチャレンジしてPCAを惹起した。4時間感作は多価誘発原との反応によるIgG₁抗体の検出を、24時間感作は多価誘発原のみならず、低分子誘発原との反応によるIgG₁抗体活性の検出⁵⁾を、8日間感作はIgE抗体の検出⁶⁾を目的とする。誘発原として薬物そのものを用いるときは1頭当り10 mgを、薬物のGpSA結合体を用いるときは1 mgをチャレンジした。1時間後に動物を殺し、直径5 mmまたはそれ以上の色素漏出が生じる場合をPCA陽性と

判定した。実験は、通常レシピエント2頭ずつを用いた duplicate test としたが、3頭ずつを用いた triplicate test とした場合もある。

(ii) マウス IgE 抗体によるラット PCA : MOTA ら⁷⁾ に従い、マウス IgE 抗体活性をラット PCA によって検定した。マウス血清またはその希釈液 0.05 ml をラットの背部皮内に注射し、18~24 時間感作の後、エバンス青 5 mg とともに各種誘発原(薬物の場合は 10 mg, 薬物-GpSA 結合体の場合は 1 mg) を静脈内に注射し、その1時間後にモルモット PCA と同じ基準に拠って結果を判定した。ラット PCA の場合も duplicate test を行なった。

3) Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)による検定

血清中の IgA, IgG, IgM 抗体を含めた総抗体活性を高感度で検出することを目的として、P. DE HAAN ら⁸⁾の方法を参考とし、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗モルモット IgG 血清(ただし、H および L 両鎖に対する抗体を含む)、あるいは、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス (IgG+IgA+IgM) 抗体を使用した ELISA を設定した。ポリスチレン製 96 ウェル・マイクロプレート (GREINER) の各ウェルに、各種 GpSA 結合体(陰性対照としては GpSA) を 0.1M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶かして得られる溶液(濃度 2 μ g/ml) 0.15ml を注入し、パラフィルムでシールし、37°C にて3時間放置して抗原吸着を行なう。低温で一晩放置した後、吸引によって抗原液を除去したのち、洗滌液 [0.05% Tween 20 を含む磷酸緩衝液加生理食塩液 (PBS, pH 7.0)] 0.25 ml を加える。このような洗滌操作を3回くり返して余剰抗原を十分に除去する。つぎに、0.05%ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) を含む PBS で適度に希釈された被験血清 0.1ml を加え、シールして 37°C にて45分間反応させる。再び3回の洗滌操作によって過剰の抗体や抗体以外の免疫グロブリンを除去したのち、二次抗体として PBS で500倍に希釈されたパーオキシダーゼ標識ヤギ抗モルモット IgG 血清 (Cappel, Lot 10337, H 鎖および L 鎖特異的) またはヤギ抗マウス (IgG+IgA+IgM) 血清 (Cappel, Lot 17545) の 0.1 ml を添加する。37°C, 45分間のインキュベーションを行なったのち、洗滌を4回行なう。最後に各ウェルに 0.08% の 5-amino-2-hydroxybenzoic acid 溶液 (9容) と 0.05% 過酸化水素水 (1容) の混合液 0.1 ml を注入し、シールして室温 (23 \pm 3°C) に放置して発色させ、1時間後に 0.1 N 苛性ソーダ 0.1 ml を加えて反応を停止させる。精製水をブランクとして発色の強さをオート

リーダー (MTP-22, コロナ電気株式会社) によって測定する (reference 680 nm, measurement 405 nm)。測定は同一条件のウェルを3つずつ設けた triplicate test で行なった。抗血清と対応薬物の GpSA 結合体との反応による吸光度の平均値から、GpSA との反応による吸光度の平均値を差引いた値、すなわち、抗血清と薬物ハプテンとの反応による吸光度を求め、A とする。バックグラウンド値を知るために正常血清プールについても同じ要領で薬物ハプテンとの反応による吸光度を求めたが、血清希釈の度合による変動が著しく小さかったので、実験の簡略化のために、10倍希釈血清の示す値を B とし、A が B より大きい場合を抗体陽性とした。

6. ヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用の検定

血液型 O 型および A 型の健常男子 3 名のヘパリン加血液を使用し、MOLTIAN 法によって、6315-S の直接クームス反応陽性化作用をしらべ、対照薬物 (CET, PCG および LMOX) のそれと比較した。術式については既報⁹⁾を参照されたい。

II. 実験結果

1. モルモットにおける免疫原性ならびに過敏症誘発原性

1) 能動アナフィラキシー・ショックによる検定

Table 1 に能動アナフィラキシー・ショックを指標とした場合の各薬物の免疫原性および過敏症誘発原性を示した。各薬物の BGG 結合体で免疫した場合、実験動物すべてに薬物ハプテン特異的感作が成立し、最終注射の 16~17 日後にそれぞれに対応した多価誘発原 (GpSA 結合体) をチャレンジすると、ショック症状が生じ、大部分の動物が死亡した。対照実験として、正常モルモット (1群5頭) に各薬物-GpSA 結合体 1 mg を静注したが、どの結合体の場合も、ショック症状はまったく観察されなかった(データーの表示を省く)。一方、薬物自体を免疫原とした場合、6315-S や 6315-S oxide に関しては、アジュバントを用いない場合は言うにおよばず、用いた場合でも感作は成立せず、6315-S または 6315-S oxide の GpSA 結合体のチャレンジによってショック症状を呈するものは1例もなかった。対照薬物のうち、LMOX と PCG に関しても、6315-S と同様、多価誘発原のチャレンジでショックを起こす個体はみられなかった。CET では、フロイント完全アジュバント (FCA) とともに免疫した場合に CET-GpSA との反応で全例にショックが生じ、半数 (2例) が死亡した。CMZ については、用量を毎回 1 mg とし、FCA とともに免疫した群の全例が CMZ-GpSA チャレンジにより

Table 1 Determination by active anaphylactic shock of immunogenicity and hypersensitivity-eliciting antigenicity of protein-conjugated and unconjugated 6315-S and other antibiotics in guinea pigs

Immunising condition			No. of animals showing shock/No. of animals tested	
Materials injected	Immunogen	Dose (mg)	Elicited by homologous GpSA conjugate (1 mg)	Elicited by homologous antibiotics (10 mg)
Aqueous solution of antibiotics (x6, im)	6315-S***	0.25	0/6	0/5***
		0.5	0/7	0/7***
		1.0	0/7	0/8***
	6315-S Oxide	1.0	0/10	0/9
	LMOX	1.0	0/8	NT**
	PCG	1.0	0/8	NT**
	CET	1.0	0/7	NT**
	CMZ	1.0	3/7 (Fatal 1, Slight 2)	0/5
FCA emulsion of antibiotics (x6, ip)	6315-S***	1.0	0/4	0/4***
	6315-S Oxide	1.0	0/10	0/9
	LMOX	1.0	0/4	0/4
	PCG	1.0	0/4	0/4
	CET	1.0	4/4 (Fatal 2, Moderate 1, Slight 1)	0/3
	CMZ	0.25	0/5	0/5
		1.0	4/4 (Fatal 1, Moderate 2, Slight 1)	0/4
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (x3, ip)	6315-S-BGG	1.0	14/14 (Fatal 11, Moderate 3)	0/10*
	6315-S Oxide-BGG	1.0	9/9 (Severe 7, Moderate 2)	0/8
	LMOX-BGG	1.0	4/4 (All fatal)	0/4
	PCG-BGG	1.0	4/4 (All fatal)	0/5
	CET-BGG	1.0	5/5 (All fatal)	4/5 (Slight 4)
	CMZ-BGG	1.0	5/5 (All fatal)	3/5 (Slight 3)

*) Elicited by 6315-S Lot F075NN

***) NT: Not tested

***) 6315-S Lot F036NN

ショックを起こした(死亡例を含む)のみならず、FCAを使用しない群においても死亡例を含むショック陽性例が見出された。この結果のみから、6315-Sや6315-S Oxideは免疫原性をもたないと断定することはできないとしても、少なくとも、市販の対照薬物CETやCMZに比べて、その免疫原性は、はるかに弱いと判断される。

一方、薬物のBGG結合体で免疫され各薬物ハプテンに対する能動感作が成立している動物に、それぞれ対応した薬物をチャレンジしたところ、CETとCMZの場合には多くの動物に軽度～中等度のショックが観察されたが、LMOX、PCG、6315-S(誘発原としてはLot

F075NNを使用)および6315-S oxideの場合には何らの症状も認められなかった。薬物単独あるいは薬物のFCAエマルジョンで免疫された動物に対応薬物をチャレンジした場合は、どの薬物に関してもショック症状を見出すことはできなかった。この結果から、CETとCMZは、少なくとも、それぞれのBGG結合体で強く感作されている動物においてはショック誘発能をもつが、LMOX、PCGおよび6315-Sや6315-S oxideは感作の程度如何によらずこの作用をもたないと言える。

2) 同種PCAによる検定

つぎに、上記の免疫動物から採取しておいた血清のPCA抗体活性をしらべることにより各薬物の免疫原性

Table 2 Determination of immunogenicity and hypersensitivity-eliciting antigenicity of protein-conjugated and unconjugated 6315-S and other antibiotics by means of allogeneic PCA in guinea pigs

Immunizing condition			No. of PCA-positive sera/No. of sera tested				
			Elicited by corresponding GpSA (1 mg)		Elicited by corresponding antibiotics (10 mg)		
Materials injected	Immunogen	Dose (mg)	4h-PCA	24h-PCA	4h-PCA	24h-PCA	8d-PCA
Aqueous solution of antibiotics (x6, im)	6315-S**	0.25		0/18		0/18**	
		0.5		0/14		0/14**	
		1.0		0/11		0/11**	
	6315-S Oxide	1.0		0/19		0/19	
		LMOX	1.0		0/9		0/9
		PCG	1.0		0/8		0/8
		CET	1.0		0/7		0/7
		CMZ	1.0		2/14		0/7
FCA emulsion of antibiotics (x6, ip)	6315-S**	0.25		0/9		0/9**	
		0.5		0/10		0/10**	
		1.0		0/9		0/9**	
	6315-S Oxide	1.0		0/19		0/19	
		LMOX	1.0		0/9		0/9
		PCG	1.0		0/8		0/8
		CET	1.0		4/7		0/7
		CMZ	0.25		0/10		0/10
	1.0		3/8		0/8		
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (x8, ip)	6315-S-BGG	1.0	18/19		0/9**	0/10*	
	6315-S Oxide-BGG	1.0	13/20			0/20	
	LMOX-BGG	1.0	10/10		0/10	0/10	0/10
	PCG-BGG	1.0	10/10		0/10	0/10	0/10
	CET-BGG	1.0	10/10		0/10	7/10	7/10
	CMZ-BGG	1.0	9/10		0/10	1/10	0/10

*) Elicited by 6315-S Lot F075NN

***) 6315-S : Lot F036NN

を、また、薬物-BGG 結合体に対する抗血清で受動局所感作されたレシピエントに対応薬物をチャレンジすることによってそれらの PCA 誘発原性を検定した。

薬物の BGG 結合体で免疫されたモルモットの血清 (非希釈) にそれぞれ対応した薬物-GpSA 結合体を作作用させた場合、薬物の種類を問わず、ほとんど全ての血清に IgG₁ 抗体活性が検出された (Table 2)。これらの抗血清の抗体価は $2^{11} \sim 2^{13}$ と高い (Table 8) ため、24 時間または 8 日間感作を行なうときは、レシピエントが全身的に感作され、全例がショックにより死亡

してしまうので、多価誘発原を用いて IgG₁ や IgE 抗体の存否をしらべることはできなかった。薬物自体を免疫原とし、それにアジュバントを加えて免疫した動物の血清 (最終回免疫注射の 4 週後に採取したもの) のうち、6315-S や 6315-S oxide, LMOX および PCG に対するものには、多価誘発原をチャレンジしても 24 時間 PCA を起こすものは 1 例もなく、IgG₁ 抗体 (おそらくは IgE 抗体も) の産生を見出すことはできなかった。CET と CMZ に関しては、テストした動物の約半数の個体に明らかな抗体産生が認められた。アジュバントを

Table 3 Determination of the antibody activity of guinea pig antisera by means of ELISA

Immunizing condition		No of Ab (+) sera / No of sera tested	Titer of antibody-positive sera								
Materials injected	Immunogen										
Aqueous solution of antibiotics (1 mg x 6, im)	6315-S***	8**/11	2 ⁵	2 ⁴	2 ⁴						
	LMOX	1**/9	2 ⁴								
	PCG	0 / 8									
	CET	0 / 7									
	CMZ	9**/14	2 ¹¹	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
FCA emulsion of antibiotics (1 mg x 6, ip)	6315-S***	2**/9	2 ⁵	2 ⁴							
	LMOX	6**/9	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁵	2 ⁴			
	PCG	0 / 8									
	CET	6**/7	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁵			
	CMZ	7**/8	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹¹	2 ¹⁰	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴		
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (1 mg x 3, ip)	6315-S-BGG		2 ^{18*}								
	LMOX-BGG		2 ^{19*}								
	PCG-BGG		2 ^{17*}								
	CET-BGG		2 ^{19*}								
	CMZ-BGG		2 ^{19*}								

*) Titer of the pooled antisera

**) Including weakly positive or trace reactions

***) 6315-S : Lot F036NN

使用せず薬物のみを反復注射した場合、6315-S や 6315-S oxide, PCG, CET, LMOX に対する抗体産生はまったくみられなかったが、CMZ については、多価誘発原を使用することによって、ごく少数 (14 例中 2 例) に PCA 抗体の産生が見出された。薬物みの注射による免疫の場合、これら 4 週目の血清での結果と同様の成績が 2 週目の血清についても得られた (データーの表示は省く)。PCA での検定結果は前述した能動アナフィラキシー・ショックでの観察と平行し、対照薬物 CET や CMZ に関しては免疫原性が発揮される条件で、6315-S や 6315-S oxide にはそれが認められないことを示している。

誘発原として薬物をチャレンジした場合、CET-BGG で免疫したモルモット 10 頭の血清のうち、7 頭のもので 24 時間および 8 日間 PCA を起こし、抗 CMZ-BGG 血清では 1 頭のもので 24 時間 PCA を引き起こしたが、それ以外に PCA が観察されることはなかった。これらの結果は、一方では CET-BGG 免疫群には IgE 抗体が産生されることを示すが、他方、強い受動感作が成立している場合に CET と CMZ には PCA を誘発する性質があるという上述の能動アナフィラキシー・

ショック試験における成績を裏付けるものとなっている。

3) ELISA による検定

PCA は IgG₁ および IgE クラスの抗体を検出するには感度の高いすぐれた方法であるが組織親和性をもたない他のクラスの抗体を検出するには不適当である。そこで、IgG₁ や IgE のみならず、他のクラス (IgG₂ サブクラス、IgA および IgM) の抗体をも含めた総抗体活性を検出することを目的として、パーオキシダーゼ標識二次抗体を用いた ELISA を実施し、各免疫群の抗体陽性率ならびに陽性例の抗体価を求めた (Table 3)。ただし、薬物-BGG 結合体での免疫群については、同一群の動物の血清をほぼ等量ずつプールし、その抗体価を測定した。ELISA の感度は極めて高く、薬物-BGG 結合体に対する抗血清プールでは、いずれの薬物ハプテンに対しても 2¹⁷ 以上の抗体価が得られた。アジュバントを用いず、薬物のみで免疫した場合 (最終注射の 4 週後の血清を使用)、CMZ 免疫群の一部に 2⁶ あるいは 2¹¹ の抗体価を示す陽性例がみられ、6315-S 免疫群や LMOX 免疫群には 2⁴ ~ 2⁵ の低希釈度において既述の基準を若干上回る弱い反応を示す個体が少数ながら見出された。

薬物の FCA エマルジョンで免疫された動物群でも、CMZ に関しては $2^{10} \sim 2^{11}$ というかなり高い抗体価を示す個体が半数を占めた。CET についても $2^7 \sim 2^8$ の抗体価を示すものが過半数であった。6315-S および LMOX に関しては $2^4 \sim 2^5$ 倍の低希釈度において陽性基準に達するものがみられたが、PCG に関しては全例とも陰性であった。ELISA の感度が著しく高いということ を考慮すると、 $2^4 \sim 2^5$ という低希釈度における弱い反応を以て抗体陽性と断定するには問題があり、結局、明確な抗体産生は CMZ と CET の 2 剤に限って見出されたと言ふべきであろう。ELISA による検定結果は、さきの PCA による検定結果と平行している。

2. マウスにおける免疫原性ならびにラットにおける過敏症誘発原性

1) PCA による検定

$C_{57}BL/6J$ 、および、 C_3H/He マウスにおける各薬物の IgE 抗体産生能、ならびに、抗薬物ハプテン・IgE 抗体で受動局所感作されたラットにそれぞれ対応する薬物をチャレンジしてその PCA 誘発能をしらべた。Table 4 および Table 5 に示したように、どちらの系統のマウスにおいても、6315-S oxide-BGG 免疫群を除いた他の薬物-BGG 免疫群ではほとんど全ての個体に抗ハプテン・IgE 抗体産生が見出され、6315-S oxide-BGG 免疫群でも FCA をアジュバントとして用いると、半数近くの動物で抗体産生が認められた。薬物の FCA エマルジョンで免疫された場合、 C_3H/He マウスにおいては、免疫注射を 6 回とした場合も 3 回とした場合も、CMZ に対して高率に IgE 抗体が産生されたが、6315-S や 6315-S oxide を含めて、他の薬物に対しては抗体産生を認めることはできなかった。 $C_{57}BL/6J$ マウスにおいては、CMZ に対しては半数が、また CET および PCG に対しても少数ではあるが抗体を産生するものがあつた。これらの結果から、マウスにおける IgE 抗体産生を指標とした場合も、6315-S や 6315-S oxide の免疫原性は、しらべた限りにおいては認められず、使用した対照薬物のどれよりも弱いと言える。

$C_{57}BL/6J$ あるいは C_3H/He マウスの各薬物-BGG に対する抗血清を皮内注射されたラットに、対応薬物そのものをチャレンジした場合、6315-S (Lot F036NN)、6315-S oxide および LMOX に関しては PCA が惹起されることはなかつた。それに対し、用いた 3 種の対照薬物はいくつかの抗血清との組み合わせにおいて PCA を惹起し得ることが観察された (Table 4 および 5)。このことから、モルモットにおけると同

様、ラットにおいても、6315-S やその代謝物の過敏症誘発原性は対照薬物のそれに比べて弱く、実際的には問題視する必要がないと言えよう。

2) ELISA による検定

モルモット血清の場合と同様、マウスの血清についても、ELISA により、IgE のみならず全てのクラスの抗体を含めた総抗体活性を検定した。各薬物-BGG 結合体に対する抗血清については同一群の動物の血清 (3 回の免疫注射の 2 週間後採取) をプールして抗体価を求め、一方、各薬物に対する免疫群では、最終回免疫注射の 4 週間後の血清について個体別に検定を行ない、抗体陽性率、ならびに、陽性血清の抗体価をしらべた。Table 6 に示したように、各 BGG 結合体に対する抗血清プールは、いずれの系統のマウスにおいても、高い抗体価 ($2^{11} \sim 2^{14}$) を示した。それに比べて、6315-S あるいは LMOX の FCA エマルジョンで免疫されたマウスの血清では、たかだか 2^4 という低い希釈度で基準をわずかに上回るだけの極めて弱い反応が得られたにすぎなかつた。明確に抗体陽性とみられたのは CET と CMZ に対する免疫群のみであり、CET に対しては $C_{57}BL/6J$ マウスの半数 (5 例) に 2^8 以上の、CMZ に対しては両系統のマウス全例に 2^{10} 以上の抗体価が得られた。PCG についても、少数の $C_{57}BL/6J$ マウスにて 2^6 以上という値が認められた。ELISA による検定結果はラット PCA による IgE 抗体検定結果より全体的に鋭敏であるが、定性的には両者は平行し、この方法でも、6315-S の免疫原性は対照薬物のそれより弱いと判断される。

3. 6315-S と対照薬物との間の免疫学的交差反応性

6315-S や 6315-S oxide と市販の 4 種の抗生物質との間の免疫学的交差反応性を、モルモットの能動アナフィラキシー・ショック、モルモット PCA およびラット PCA により検定した。

1) モルモット能動アナフィラキシー・ショックによる検定

Table 7 に示したように、6315-S-BGG 免疫群は対応多価誘発原 6315-S-GpSA チャレンジにより全例が著明なショック症状を呈し、大部分が死亡した。CMZ-GpSA をチャレンジした場合も全例がショックにより死亡し、そのほか、CET-GpSA、あるいは、LMOX-GpSA チャレンジ群においても、多くの動物が軽度から死亡に至るいろいろの程度のショック症状を呈した。逆に、LMOX、CET および CMZ の BGG 結合体で免疫した動物に 6315-S-GpSA を静注した場合も、死に至る例は少なかったが、かなり高率にショック

Table 4 Determination of immunogenicity in C₃H/He mice and of hypersensitivity-eliciting antigenicity in rats of protein-conjugated and unconjugated 6315-S and other antibiotics by means of rat PCA

Immunizing condition			No. of sera producing rat PCA/No. of sera tested	
Materials injected	Immunogen	Dose	Elicited by corresponding GpSA conjugate (1 mg)	Elicited by corresponding antibiotics (10 mg)
FCA emulsion of antibiotics (x3, ip)	6315-S**	1 mg	0/10	0/10**
	6315-S Oxide	1 mg	NT*	NT*
	LMOX	1 mg	0/8	0/8
	PCG	1 mg	0/9	0/9
	CET	1 mg	0/10	0/10
	CMZ	1 mg	4/9	6/9
FCA emulsion of antibiotics (x6, ip)	6315-S**	1 mg	0/10	0/10**
	6315-S Oxide	1 mg	0/8	0/8
	LMOX	1 mg	0/9	0/9
	PCG	1 mg	0/10	0/10
	CET	1 mg	0/10	0/10
	CMZ	1 mg	9/10	2/10
Alum-precipitated antibiotic-BGG conjugate (x3, ip)	6315-S-BGG	2 μg	8/10	0/10**
	6315-S Oxide-BGG	2 μg	0/30	0/10
	LMOX-BGG	2 μg	9/10	0/10
	PCG-BGG	2 μg	10/10	7/10
	CET-BGG	2 μg	9/10	0/10
	CMZ-BGG	2 μg	10/10	4/10
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (x3, ip)	6315-S-BGG	1 mg	9/9	0/9**
	6315-S Oxide-BGG	1 mg	4/10	0/10
	LMOX-BGG	1 mg	10/10	0/10
	PCG-BGG	1 mg	9/10	0/10
	CET-BGG	1 mg	8/8	8/8
	CMZ-BGG	1 mg	10/10	0/10

*) NT: Not tested

***) 6315-S: Lot F036NN

症状が観察された。このように、能動アナフィラキシー・ショックによれば、6315-S ハプテンと CET, LMOX あるいは CMZ の各ハプテンとの間に二方向性の交差反応性があると言える。一方、種々の BGG 結合体で免疫した動物に各種薬物をチャレンジするという反応系では、CET-BGG 免疫動物と CMZ-BGG 免疫動物の一部が、それぞれに対応した薬物のチャレンジによって軽度～中等度のショックをひき起こしただけで、それ以外にショックが誘発されたことはなく、したがって交差反応は観察されなかった。

*) モルモット PCA による検定

各薬物-BGG 結合体に対する抗血清プールを抗体試料とし、各薬物-GpSA 結合体や薬物そのものを誘発原とした PCA により交差反応性を検定した。GpSA 結合体を誘発原として使用する場合は 4 時間の、薬物そのものを誘発原とする場合は 24 時間の感作時間を置いて実験を行なった。

Table 8 に示したように、抗 6315-S-BGG 血清および抗 6315-S oxide-BGG 血清は LMOX-GpSA や CMZ-GpSA とかなり強い交差反応を呈したが、PCG や CET の GpSA 結合体とは反応しなかった。逆に、抗 LMOX-BGG 血清や抗 CMZ-BGG 血清と 6315-S-

Table 5 Determination of immunogenicity in C₅₇BL/6J mice and of hypersensitivity-eliciting antigenicity in rats of protein-conjugated and unconjugated 6315-S and other antibiotics by means of rats PCA

Immunizing condition			No of sera producing rat PCA/No of sera tested	
Materials injected	Immunogen	Dose	Elicited by corresponding GpSA conjugate (1 mg)	Elicited by corresponding antibiotics (10 mg)
FCA emulsion of antibiotics (x8, ip)	6315-S**	1 mg	0/10	0/10**
	6315-S Oxide	1 mg	NT*	NT*
	LMOX	1 mg	0/10	0/10
	PCG	1 mg	0/10	0/10
	CET	1 mg	2/10	0/10
	CMZ	1 mg	0/10	0/10
FCA emulsion of antibiotics (x6, ip)	6315-S**	1 mg	0/10	0/10**
	6315-S Oxide	1 mg	0/10	0/10
	LMOX	1 mg	0/10	0/10
	PCG	1 mg	0/10	1/10
	CET	1 mg	1/10	0/10
	CMZ	1 mg	5/10	0/10
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (x1, ip)	6315-S-BGG	1 mg	10/10	0/10**
	6315-S Oxide-BGG	1 mg	0/10	0/10
	LMOX-BGG	1 mg	3/10	0/10
	PCG-BGG	1 mg	10/10	0/10
	CET-BGG	1 mg	9/9	1/9
	CMZ-BGG	1 mg	9/9	0/9
FCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate (x3, ip)	6315-S-BGG	1 mg	10/10	0/10**
	6315-S Oxide-BGG	1 mg	4/10	0/10
	LMOX-BGG	1 mg	9/10	0/10
	PCG-BGG	1 mg	10/10	0/10
	CET-BGG	1 mg	10/10	0/10
	CMZ-BGG	1 mg	10/10	0/10

*) NT : Not tested

**) 6315-S : Lot F036NN

GpSA 結合体との間にも交差反応が起こることが観察された。6315-S と 6315-S oxide 両ハプテン間には一方向性の交差反応が生じた。すなわち、抗 6315-S-BGG 血清は 6315-S oxide-GpSA と反応したが、抗 6315-S oxide-BGG 血清は 6315-S-GpSA とは反応しなかった。薬物を誘発原とした場合、抗 6315-S-BGG 血清と CMZ との反応で弱いながら PCA が惹起されたが、その他の抗生物質との組み合わせでは PCA は起こらなかった。また、他剤の BGG 結合体に対する抗血清で感作された動物に 6315-S を静注した場合にも PCA は惹起されなかった。

以上のような PCA による検定結果を先に述べた動物アナフィラキシー・ショックでの結果と対比させてみると、両者の間に若干の差異が見出される。たとえば CET ハプテンと 6315-S ハプテンの間の交差反応は動物アナフィラキシー・ショックでは認められるにもかかわらず PCA では認められなかった。また、6315-S-BGG で免疫したモルモットに CMZ をチャレンジした場合にショックが生じないのに対し、この群の動物から採った抗血清と CMZ との組み合わせで PCA が惹起された。

3) マウス IgE 抗体によるラット PCA での検定
C₃H/He マウスの各 BGG 結合体に対する抗血清

Table 6 Determination of the antibody activity of mouse antisera by means of ELISA

Materials injected	Immunizing condition		No of sera Ab(+) / sera tested	Titer of antibody-positive sera							
	Mouse strain	Immunogen									
PCA emulsion of antibiotics (1 mg x 6, ip)	C ₃ H/He Shi	6315-S***	8**/10	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴					
		LMOX	5**/9	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴			
		PCG	3**/10	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴					
		CET	9**/10	>2 ⁷	>2 ⁷	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
		CMZ	10/10	2 ⁴	2 ⁴						
	C ₅₇ BL/6J Shi	6315-S***	6**/10	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴		
		LMOX	6**/10	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴		
		PCG	5**/10	>2 ⁶	>2 ⁶	>2 ⁶	2 ⁴	2 ⁴			
		CET	10**/10	>2 ⁹	>2 ⁹	>2 ⁹	>2 ⁹	>2 ⁹	2 ⁶	2 ⁴	
		CMZ	10/10	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴					
PCA emulsion of antibiotic-BGG conjugate	C ₃ H/He Shi (1 mg x 3, ip)	6315-S-BGG		2 ^{15*}							
		LMOX-BGG		2 ^{16*}							
		PCG-BGG		2 ^{15*}							
		CET-BGG		2 ^{14*}							
		CMZ-BGG		2 ^{15*}							
	C ₅₇ BL/6J Shi (1 mg x 1, ip)	6315-S-BGG			2 ^{12*}						
		LMOX-BGG			2 ^{11*}						
		PCG-BGG			2 ^{12*}						
		CET-BGG			2 ^{14*}						
		CMZ-BGG			2 ^{14*}						

*) Titer of the pooled antisera

**) Including weakly positive or trace reactions

***) 6315-S : Lot F036NN

それぞれプールし、ラット PCA により各薬物ハプテン間の交差反応性を検討した。Table 9 に示したように、交差反応性が観察されたのは抗 6315-S・IgE 抗体と CMZ-GpSA との間のみであった。モルモット PCA と異なり、6315-S ハプテンと LMOX ハプテンの間にも交差反応性はみられなかった。

4. ヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用

健康人の血液を用い、MOLTHAN 法に準じて、6315-S および対照薬物の赤血球直接クームス反応陽性化作用を検定したところ、Table 10 に示すように、6315-S は終濃度 40 mg/ml という高濃度においてもこの作用を示さなかった。対照薬物のうち CET は 5~10 mg/ml で、また、PCG は 40 mg/ml でクームス反応を起こすことが見出された。LMOX も赤血球提供者によっては、40 mg/ml において陽性反応をみることがあるが一般的には反応は陰性であった。

III. 考 察

6315-S は既に市販されている LMOX とともに、1 位に酸素をもつ新しいタイプ (oxacephem 系) の β -lactam 抗生物質であるため、アレルギー性副作用防止のために、その免疫学的性質には特に注意を払わねばならない。我々は現在、IV 型アレルギー (細胞性免疫) を起こす可能性について検討中であるが、本報では、抗生物質のアレルギー性副作用の中で最も重篤なアナフィラキシー・ショックや最も頻度の高い皮疹が I 型アレルギーに含まれることを考慮して、6315-S が I 型過敏症を起こす可能性を中心に検討を行なった。我々は、さきに、LMOX の抗原性を動物でしらべ、他の β -lactam 抗生物質に比べて免疫原性や過敏症誘発原性が弱く、既存の抗生物質との交差反応性も認められないことを明らかにした⁹⁾が、最近、同様の結果がヒトにおいても報告されるようになった¹⁰⁾。6315-S についての

Table 7 Determination of immunological cross-reactivity of 6315-S with other antibiotics by means of active anaphylactic shock in guinea pigs

Immunogen	Elicitor*	No of animals showing shock / No of animals tested
6315-S-BGG	6315-S-GpSA	14/14 (Fatal 11, Moderate 3)
	LMOX-GpSA	4/5 (Severe 2, Moderate 1, Slight 1)
	PCG-GpSA	0/5
	CET-GpSA	4/5 (Fatal 1, Severe 1, Slight 2)
	CMZ-GpSA	5/5 (All fatal)
	6315-S**	0/5
	LMOX	0/5
	PCG	0/4
	CET	0/5
	CMZ	0/5
LMOX-BGG	LMOX-GpSA	4/4 (All fatal)
	6315-S-GpSA	3/5 (Moderate 1, Slight 2)
	LMOX	0/4
	6315-S**	0/5
PCG-BGG	PCG-GpSA	4/4 (All fatal)
	6315-S-GpSA	0/5
	PCG	0/5
	6315-S**	0/5
CET-BGG	CET-GpSA	5/5 (All fatal)
	6315-S-GpSA	3/5 (Fatal 1, Severe 1, Slight 1)
	CET	4/5 (Moderate 1, Slight 3)
	6315-S**	0/5
CMZ-BGG	CMZ-GpSA	5/5 (All fatal)
	6315-S-GpSA	5/5 (Moderate 4, Slight 1)
	CMZ	3/5 (Slight 3)
	6315-S**	0/4

*) Elicitor : Antibiotic-GpSA conjugate..... 1 mg/ animal
Unconjugated antibiotics..... 10 mg/ animal

**) 6315-S . Lot F075NN

検討は、単にこの薬物の副作用対策というばかりではなく、LMOXに関する結果とともに、oxacephem系薬物の一般的特性をしらべるという意味においても興味のある問題となるであろう。

抗原性検定における陽性対照免疫原としては各薬物のBGG結合体を用い、一方、多価誘発原としては各GpSA結合体を使用した。前者は確実に抗ハブテン

抗体を産生し、後者は抗体の存在を確実に検出し得るのであることが分った。さらに、マウスの抗6315-S・IgE抗体と6315-S-GpSAとによるラットPCAが、6315-Sそのものを6315-S-GpSAと同時に静注することによって著明に抑制されたこと、しかも、6315-Sによる抑制は抗6315-S抗体の反応系に特異的で、抗PCG-BGG血清とPCG-GpSAとの系では認めら

Table 8 Determination of immunological cross-reactivity of 6315-S or 6315-S oxide with other antibiotics by means of guinea pig 4-hour or 24-hour PCA

Immunogen	Elicitor	Mean Ab titer
6315-S-BGG	6315-S-GpSA	2 ¹¹
	6315-S Oxide-GpSA	2 ^{8.7}
	LMOX-GpSA	2 ⁸
	PCG-GpSA	< 2 ⁰
	CET-GpSA	< 2 ⁰
	CMZ-GpSA	2 ⁹
	6315-S*	< 2 ⁰
	LMOX	< 2 ⁰
	PCG	< 2 ⁰
	CET	< 2 ⁰
	CMZ	2 ^{2.5}
6315-S Oxide-BGG	6315-S Oxide-GpSA	2 ¹¹
	6315-S GpSA	≤ 2 ⁰
	LMOX-GpSA	2 ⁷
	PCG-GpSA	< 2 ⁰
	CET-GpSA	< 2 ⁰
	CMZ-GpSA	2 ⁸
LMOX-BGG	LMOX-GpSA	2 ¹¹
	6315-S-GpSA	2 ^{7.5}
	6315-S Oxide-GpSA	2 ^{5.5}
	LMOX	< 2 ⁰
	6315-S*	< 2 ⁰
PCG-BGG	PCG-GpSA	2 ¹²
	6315-S-GpSA	< 2 ⁰
	6315-S Oxide-GpSA	< 2 ⁰
	PCG	< 2 ⁰
	6315-S*	< 2 ⁰
CET-BGG	CET-GpSA	2 ¹³
	6315-S-GpSA	< 2 ⁰
	6315-S Oxide	< 2 ⁰
	CET	2 ⁵
	6315-S*	< 2 ⁰
CMZ-BGG	CMZ-GpSA	2 ¹³
	6315-S-GpSA	2 ⁶
	6315-S Oxide-GpSA	< 2 ⁰
	CMZ	2 ^{1.5}
	6315-S*	< 2 ⁰

*) 6315-S : Lot F075NN

Table 9 Determination of immunological cross-reactivity of 6315-S with other antibiotics by means of rat PCA mediated by IgE antibodies of C₃H/He mice

Immunogen*	Elicitor	Mean Ab titer
6315-S-BGG	6315-S-G _p SA	2 ^{5.5}
	LMOX-G _p SA	< 2 ⁰
	PCG-G _p SA	< 2 ⁰
	CET-G _p SA	< 2 ⁰
	CMZ-G _p SA	2 ⁷
LMOX-BGG	LMOX-G _p SA	2 ⁷
	6315-S-G _p SA	< 2 ⁰
PCG-BGG	PCG-G _p SA	≥ 2 ¹⁰
	6315-S-G _p SA	< 2 ⁰
CET-BGG	CET-G _p SA	2 ^{5.5}
	6315-S-G _p SA	< 2 ⁰
CMZ-BGG	CMZ-G _p SA	2 ^{9.5}
	6315-S-G _p SA	≤ 2 ⁰

*) Adsorbed to aluminum hydroxide gel

Table 10 Activities of 6315-S and other antibiotics to induce *in vitro* direct COOMBS' reaction of human erythrocytes

Source of erythrocytes	Coombs' reagent**	Minimal essential concentration (μg/ml)			
		6315-S***	LMOX	PCG	CET
M M (Type A)*	A	>40	>40	40	5
	B	>40	>40	40	10
	C	>40	>40	40	5
M H (Type A)	A	>40	>40	40	5
	B	>40	>40	40	10
	C	>40	>40	40	5
M T. (Type O)	A	>40	40	40	5
	B	>40	40	40	10
	C	>40	40	40	5

*) Blood group type

***) Coombs' reagent : A-Tokyo Hyojun Kessei
B-Midori Juji
C-Ortho

***) Lot F036NN

れなかったこと(本文中、記載を省く)から、6315-S-BGG や 6315-S-GpSA 中の 6315-S ハプテンはもとの 6315-S 分子の立体構造をほぼ維持していると言うことができる。こうした吟味をした上で上述の実験結果を通覧すると、6315-S およびその体内活性代謝物 6315-S oxide は、モルモットにおいてもマウスにおいても、アジュバントの有無にかかわらず、免疫原性を示さないものと判断される。ただ、両動物種の 6315-S そのものに対する免疫血清の抗体活性を ELISA で検定した場合、一部の血清が $2^4 \sim 2^5$ という低希釈度において規定の基準をわずかに上回る発色を呈した。しかし、ELISA が極めて鋭敏な実験法であり、十分に免疫したモルモットや C_3H/He マウスの陽性対照血清(抗 6315-S-BGG 血清) プール等に関しては 2^{11} という高希釈度まで著明な陽性反応が得られることを考慮すると、 $2^4 \sim 2^5$ 程度の低希釈において弱い反応が生じるだけの場合、それが免疫グロブリンの非特異的吸着によるという可能性を完全に否定することもできず、この程度の血清を抗体陽性と判定するのは困難であろう。それに対し、CET や CMZ に関しては、同一免疫条件のもとで明確な免疫原性が認められた。FCA とともに免疫した場合、これらの薬物は、モルモットに能動感作を成立させ、マウスにおいても IgE およびその他の抗体の産生を示した。さらに、CMZ はアジュバントを用いない場合でも、少数のモルモットにて免疫応答をひき起こした。これらの結果から、6315-S は免疫原性を持たないという一般的結論を下すことはできないとしても、少なくとも本剤の免疫原性が CET や CMZ のそれと比べて弱いということは明白である。

一方、6315-S や 6315-S oxide の BGG 結合体で免疫されたモルモット、あるいは、抗 6315-S-BGG 血清や抗 6315-S oxide-BGG 血清で受動感作されたモルモットやラットに 6315-S そのもの、または、6315-S oxide を静注した場合のショックや PCA の発現を観察することにより、これらの薬物の過敏症誘発原性をしらべた。その結果、本文に記したように、6315-S (Lot F075NN, 純度 939 mg 力価/g) を用いる限り、ショックや PCA の誘発はまったく認められなかった。したがって、6315-S 分子自体は過敏症誘発原性を示さないと判断される。ただ、純度のやや低い(886mg 力価/g, Lot F036NN)を使用した場合、ラット PCA は生じなかったがモルモットにおいてはショックや PCA が惹起される場合があった。(データ-記載を省略)。この場合の過敏症誘発は、恐らく、微

量の高分子不純物によるものであろうと推察される。誘発原性を有する不純物が如何なるものであるか、今のところ不明であるが、一つの可能性として 6315-S 重合体が想定され、目下、この可能性についての検討を進めている。他の薬物に関しては CET および CMZ がモルモットのショックや PCA を誘発し、PCG, CET および CMZ がラット PCA を惹起し得ることが見出された。これらの対照薬物の示す過敏症誘発原性も微量の混在物によるのか、それとも薬物分子自体の作用によるのかについては明らかでない。

β -lactam 抗生物質のアレルギー性副作用は、その薬物が免疫応答を起こし、再度同じものが投与された場合に過敏症を誘発するということによるばかりでなく、既に産生されている他剤に対する抗体と新しく投与された薬物との間の交差反応によって生じる場合もあり得る。 β -lactam 抗生物質相互の間の交差反応には、6 位 (penicillin 系) または 7 位 (cephalosporin 系) の側鎖が重要な役割を演ずるという考え方¹¹⁾ もあり、核部分の構造や分子全体の立体構造に依存するという考え方¹²⁾ もある。本報で 6315-S と CMZ あるいは LMOX との交差反応性を検討したのは、CMZ が 6315-S と似て 7 位に $-SCH_2CONH-$ を含む aliphatic 側鎖を持つこと、および LMOX が 1-oxacephem 核を持つことに注目したためである。そのほか、CET は cephalosporin 類の、PCG は penicillin 類の代表的薬物として加えた。交差反応性の検定は、主として、薬物-BGG 結合体(免疫原)と薬物-GpSA 結合体(誘発原)の反応系で実施したが、モルモットでは誘発原として薬物を用いた系での検定も行なった。モルモットの能動アナフィラキシー・ショックや PCA では 6315-S ハプテンと CMZ および LMOX ハプテンとの間に二方向性の交差反応が認められた。CMZ との交差は 7 位側鎖の、LMOX との交差は 1-oxacephem 核部分の類似性によるのではないかと推察される。6315-S ハプテンと CET ハプテンの間には、能動アナフィラキシー・ショックでは交差反応が観察されたにも拘らず、24 時間 PCA では認められなかった。この不一致の原因は明らかでないが、一つの可能性として、能動アナフィラキシー・ショックに関与する抗体と 24 時間 PCA に関与する抗体とが必ずしも同一でないからではないかということが考えられる。マウス IgE 抗体によるラット PCA で見ると、6315-S ハプテンは CMZ ハプテンとのみ、しかも、一方向性の交差反応を起こしたに過ぎなかった。モルモット抗体(主として IgG 抗体)での交差反応パターンとマウス IgE 抗体でのそれとの間のくいち

がいは、単にマウスの抗血清の抗体価がモルモット抗血清に比べて一般的に低いために交差反応を認め難いということに過ぎないのかもしれない。しかし、動物の種や系統、免疫条件、産生された抗体のアイソタイプ等によって交差反応性が変動するという事は、たとえば抗 benzylpenicilloyl 抗体と CET ハプテンあるいは CET 重合体との反応の系についても観察されている¹³⁾ので、6315-S と対照薬物との間の交差反応性のパターンに関する種による不一致もこのような原因にもとづくものであるかもしれない。なお、6315-S とその活性代謝物 6315-S oxide ハプテンは構造がほとんど同一であるにもかかわらず、予想に反し、モルモット PCA で一方向性の交差反応が認められたに過ぎなかった。その原因はまったく不明であるが、LMOX とその脱炭酸体との間にも同様の結果が見出されている¹⁰⁾ことを考え併せると、必ずしも奇異な現象とは言い切れない。以上述べてきた反応系と異なり、誘発原として薬物そのものを当てる場合、6315-S が過敏症誘発原性を欠いている以上当然ではあるが、どの抗生物質ハプテンに対する抗体との組み合わせにおいても 6315-S がショックや PCA を起こすことはなかった。逆に、モルモットの抗 6315-S-BGG 血清と他剤との組み合わせにおいても、CMZ が PCA を惹起したのを唯一の例外として、それ以外に過敏症が誘発されることはなかった。

以上のように、I 型過敏症ないしは体液性免疫についてしらべた限り、動物において、6315-S や 6315-S oxide は、LMOX と同様、免疫学的活性を示さなかった。このことをヒトに外挿するとすれば、この薬物の臨床使用に際してもアレルギー性副作用が多発するとは考え難い。

本報で実施した直接クームス反応は免疫学的機序にもとづく真のクームス反応ではなく、むしろ、赤血球表面に対する薬物の直接作用によるもので、溶血性貧血との関連性は考え難い。しかし、特殊毒性試験という立場からみれば、6315-S にこの反応を陽性化させる作用が認められなかったということも、この薬物の特長のひとつとみなしてよいのではないかと考えられる。(実験期間: 1983年5月~1986年5月)

謝 辞

本実験を行なうに当り、各薬物の蛋白質結合体のハプテン結合数測定を塩野義製薬研究所、井上 健博士、ならびに伊賀野憲一氏に依頼した。御協力に対して深甚の謝意を表したい。

文 献

- 1) 溝尻顕爾・岡部 博・田中日出男・菅野浩一: 6315-S (Flomoxef) のラットにおける体内動態(第1報) ¹⁴C-6315-S の静脈内投与後の血中濃度, 尿, 糞, 胆汁中排泄および全身オートラジオグラフィ。Chemotherapy 35 (S-1): 176~186, 1987
- 2) LEVINE, B. B. & Z. OVARY: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen III. The N-(D- α -benzyl-penicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for the hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875~904, 1961
- 3) EBATA, M.; Y. MIYAKE & J. UCHIDA: A quantitative assay of covalently bound cephalosporin derivatives in cephalosporin-protein conjugates. J. Antibiot. 29: 665~666, 1976
- 4) 桂 義元: アジュバント類と適用。免疫実験操作法A, 日本免疫学会編: PP. 49~52, 1976
- 5) 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
- 6) LEVINE, B. B.; H. CHIANG & N. M. VAZ: The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. J. Immunol 106: 29~33, 1971
- 7) MOTA, I.: The mechanism of anaphylaxis, I. Production and biological properties of mast cell sensitizing antibodies. Immunology 7: 681~699, 1964
- 8) HAAN, P. D.; D. M. BOORSMA & G. L. KALSBEER: Penicillin hypersensitivity. Allergy 39: 111~119, 1979
- 9) 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): 635~639, 1979
- 10) 原田 稔, 松本光史, 竹内三津男: 6059-S の免疫学的性質。Chemotherapy 28 (S-7): 1191~1201, 1980
- 11) BRANCH, D. R.; G. BARBARA, A. L. SY SIOK HIAN, W. G. VLAHOS, A. W. HAWKSWORTH & L. D. PETZ: The immune response to moxalactam in rabbits and in humans. J. Lab. Clin. Med. (Accepted)

- 12) SHIBATA, K ; T. ATSUMI, Y. HORIUCHI & K. MASYIMO : Immunological cross-reactivities of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin (Penicillin G). *Nature* 212 : 419~420, 1966
- 13) 近藤正熙, 志甫 理, 大石登美子, 土屋皖司 : Cephacetrile の抗原性について。 *Chemotherapy* 24 : 86~93, 1976
- 14) PETERSEN, B. H. & J. GRAHAM : Immunological cross-reactivity of cephalixin and penicillin. *J. Lab. Clin. Med.* 83 : 860~870, 1974
- 15) HARADA, M. ; A. WATANABE & M. TAKEUCHI : Heterogeneity of cross-reactivity of mouse anti-benzylpenicilloyl antibodies against cephalothin haptens or polymers. *Jap. J. Pharmacol.* 40 : 182~184, 1986

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF 6315-S (FLOMOXEF) AND ITS METABOLITE, 6315-S OXIDE

MINORU HARADA, MITSUO TAKEUCHI and AKIRA WATANABE
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

Immunological properties of a new oxacephem antibiotic agent, 6315-S (flomoxef), and its main metabolite, 6315-S oxide, were studied in animals using latamoxef sodium, penicillin G potassium, cephalothin sodium and cefmetazole sodium as reference compounds.

1. Immunogenicity.

Immunogenicity of unconjugated antibiotic agents was examined using the corresponding conjugates with guinea pig serum albumin as polyvalent eliciting antigen. When emulsified with Freund's complete adjuvant, cephalothin and cefmetazole produced active sensitization for anaphylactic shock and IgG antibodies in the guinea pig. Also in the mouse, these two antibiotics produced IgE antibodies. However, 6315-S and 6315-S oxide as well as penicillin G and latamoxef did not produce these tissue-sensitizing antibodies in either animal species. Enzyme-linked immunosorbent assay for total antibody activity, including tissue-sensitizing and non-sensitizing antibodies, confirmed these results ; definite antibody formation being observed only against cephalothin and cefmetazole.

2. Hypersensitivity-eliciting antigenicity.

Unconjugated cephalothin and cefmetazole provoked PCA and anaphylactic shock in guinea pigs presensitized to homologous antibiotic haptens. In addition, cephalothin, cefmetazole and penicillin G elicited PCA in rats sensitized with mouse IgE antibodies. Again, 6315-S and its metabolite as well as latamoxef lacked the hypersensitivity-eliciting antigenicity.

3. Immunological cross-reactivity.

6315-S and 6315-S oxide haptens did not cross-react with the four reference antibiotic haptens in active anaphylactic shock in the guinea pigs and PCA in the guinea pig and rat.

4. *In vitro* direct Coomb's reaction

6315-S did not induce *in vitro* direct Coomb's reaction of human erythrocytes even at the high concentration of 40 mg/ml, while cephalothin and penicillin G caused a positive reaction at 5~20 mg/ml and at 20~40 mg/ml, respectively.

From these results, it can be concluded that 6315-S and its metabolite are immunologically inactive in animals.