

Fosfomycin のアレルギー誘発能に関する基礎的研究 (1)

竹内良夫¹⁾・栗山純一¹⁾・西村葉子¹⁾・吉河達祐²⁾

渡辺日章²⁾・川島 健³⁾・吉野楓一³⁾・横室公三¹⁾

1) 日本医科大学微生物学免疫学教室*, 2) 同 法医学教室, 3) 同 理学診療科

(昭和 62 年 12 月 24 日受付)

Fosfomycin (FOM) の抗原性を再確認するために種々の方法で実験動物に免疫し、以下の結果を得た。

FOM は human serum albumin (HSA) および ascaris suum extract (Ase) と conjugate して得られた coupling 抗原、および製剤単独を抗原として adjuvant とともにマウスとモルモットに感作した。

FOM の免疫で得られた抗体は、対照として使用した benzylpenicillin と cephalothin で得られた抗体に比べ PCA 値が低いとともに対照群に対して交差反応性を示さない特異的抗体であった。

また、製剤単独の免疫では抗体産生は認められなかった。

さらに、能動感作されたモルモットに抗原液を静脈注射し anaphylactic shock の誘発実験の結果、対照薬剤は 10 例中 3～6 例がショック死したのに比べ FOM 群は全例が生存した。

以上の結果から FOM は明らかに抗原性の低い薬剤であることが実験動物で確認された。

Key words : Fosfomycin, FOM, 抗原性, 実験動物

Fosfomycin (FOM) は STAPLEY^{1,2)}によって最近開発された抗生物質である。分子構造中にエポキシ環をもつ極めてユニークな構造 (Fig. 1) と抗菌スペクトルを有している。本剤の特徴は生体内変化や蛋白結合能がほとんどない^{3,4)} ことから免疫薬理的にみても安全な薬剤であると考えられ、本剤のカルシウム塩は経口製剤、ナトリウム塩は注射用製剤として使用されている。しかしながら、最近、FOM-Na の静脈内注射によりショック様症状を示した患者についての報告^{5,6)} がありその安全性について再検討する必要が生じた。

本来、抗生物質が抗原性を発現するには種々の機作が考えられている⁷⁻⁹⁾。その中でも分解生成物や生体蛋白結合物は抗原としての能力が強いとされている。既に述べたように FOM は生体内変化、蛋白結合能がほとんどないとされているので極めて抗原化しにくい薬剤であり、アレルギー性副作用の発現とは矛盾を生じる。

そこで著者らは臨床で観察された副作用出現を解明す

るために、まず FOM の抗原性について再検討した。

I. 材料および方法

1) 動物

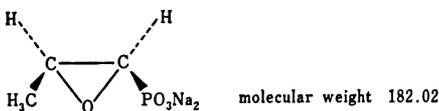
体重 250 g 前後の Hartley 系雌性モルモットおよび 13 週齢の BALB/c 系雌性マウスを免疫および passive cutaneous anaphylaxis, systemic anaphylaxis の実験に使用した。

2) 薬品

Fosfomycin (FOM) は明治製菓社製、静脈注射用 Lot FOGD 129 を使用した。Cephalothin (CET, KF 8513) 塩野義製薬社、benzylpenicillin (PCG, Lot GLD 12) 明治製菓社、human serum albumin (HSA) は Kabi 社製 Lot 104 F を使用した。Human gamma globulin (HGG) は Miles Laboratories inc. 社製、Lot 44 を使用した。

3) 免疫と反応誘発抗原⁹⁾の作製

FOM 500 mg と carrier protein として ascaris suum extract (Ase), HSA または HGG, 100 mg を pH 7.5 phosphate buffered saline, 20 ml に溶解し 37°C, 1 時間 incubate した。遊離の薬剤を連続向流透析器で除去した¹⁰⁾。得られた残留物を凍結乾燥し、それぞれを FOM-Ase, FOM-HSA, FOM-HGG とした。同様の方



法で PCG, CET を処理し, それぞれを BPO-Ase, BPO-HSA, BPO-HGG, および CET-Ase, CET-HSA, CET-HGG を作製した。

4) 免疫方法

(A) IgE 抗体の産生: silica gel (和光純薬社製) 5 mg/Tris buffered saline, 1 ml¹¹⁾に FOM-Ase の 10 μ g (モルモット) または 1 μ g (マウス) を混合し, それぞれモルモットとマウスの腹腔内に注射した。マウスは 14 日後に booster を行ない, 初回感作 28 日後に全採血した¹²⁾。モルモットは 10 日に 1 度の間隔で 8 回感作したのちに全採血した¹³⁾。

(B) IgG 抗体の産生: FOM-HSA 1 mg または 0.1 mg を Freund's complete adjuvant, FCA (Difco 社) 0.5 ml と emulsion の状態にし, それぞれをモルモットとマウスの footpad に 1 週間に一度の間隔で 4 回免疫した。

また以上の coupling 抗原による免疫の対照として FOM 単独を silica gel, FCA とともにモルモットとマウスに感作した。PCG と CET の免疫も上記方法に従って行なった。免疫方法の概略を Fig. 2 に示した。

5) 抗体価の測定

抗体価の測定は PCA テスト¹⁴⁾で行なった。剃毛された動物の背部に抗血清の段階希釈液の 0.1 ml を皮内注射した。IgE 抗体の測定は homologous PCA を行ない, 48 時間 (マウス), 8 日 (モルモット) 後に反応用抗原 2 mg/1 ml と 1% Evans blue 液, 0.5 ml を静脈

Antigen type

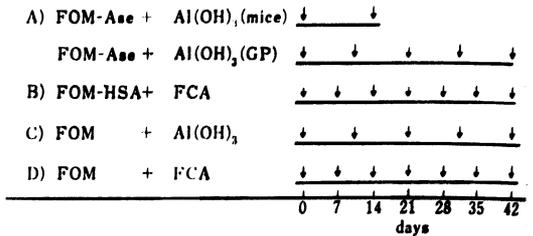


Fig. 2. Immunization schedule in mice and guinea pigs

注射した。30 分後に出現した青色斑が直径 5 mm 以上を陽性とした。1 実験 5 匹の動物を使用した。抗体価は抗体の希釈倍数の逆数を陽性平均値として表に示した。

IgG 抗体は 3 時間後に抗原で誘発し, 同様の方法で測定した。

6) 能動性感作モルモットにおけるアナフィラキシー・ショックの誘発¹⁵⁾

HSA coupling 抗原 + FCA でスケジュール通りに免疫された 40 日後のモルモットに HGG coupling 抗原 2 mg/ml を静脈注射し, ショックの誘発実験を行なった。1 時間以内の死亡をショック死とした。

II. 結果

FOM を免疫する際に carrier protein と結合させた FOM と薬剤単独の場合に分け, それぞれ 2 種の adjuvant とともに感作する, 計 4 つの type の方法でマウスとモルモットにおける抗体産生状況を観察した。

Table 1. Antibody production in mice

Sera of mice immunized with	Ag type	Positive cases/total number	PCA titer (in positive cases)
FOM-Ase + Al(OH) ₃	A	2 / 5	20
FOM-HSA + FCA	B	4 / 5	80
FOM + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
FOM + FCA	D	1 / 5	5
BPO-Ase + Al(OH) ₃	A	5 / 5	320
BPO-HSA + FCA	B	5 / 5	320
BPO + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
BPO + FCA	D	1 / 5	10
CET-Ase + Al(OH) ₃	A	5 / 5	180
CET-HSA + FCA	B	5 / 5	320
CET + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
CET + FCA	D	0 / 5	0

PCA titers are expressed as the reciprocal of the minimum dilution showing a positive reaction over 5mm in diameter and the mean of positive cases in triplicate experiments.

Mouse sera were tested by 3-h or 48-h PCA in rats; guinea pig sera were tested by 3-h or 8-day PCA in guinea pigs.

Table 2. Antigen production in guinea pigs
(3-h or 8-day PCA)

Sera of guinea pigs immunized with	Ag type	Positive cases/ total number	PCA titer (in positive cases)
FOM-Ase + Al(OH) ₃	A	1 / 5	10
FOM-HSA + FCA	B	3 / 5	40
FOM + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
FOM + FCA	D	0 / 5	0
BPO-Ase + Al(OH) ₃	A	4 / 5	160
BPO-HSA + FCA	B	5 / 5	160
BPO + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
BPO + FCA	D	0 / 5	0
CET-Ase + Al(OH) ₃	A	5 / 5	160
CET-HSA + FCA	B	5 / 5	320
CET + Al(OH) ₃	C	0 / 5	0
CET + FCA	D	0 / 5	0

PCA titers are expressed as the reciprocal of the minimum dilution showing a positive reaction over 5mm in diameter and the mean of positive cases in triplicate experiments.

Mouse sera were tested by 3-h or 48-h PCA in rats; guinea pig sera were tested by 3-h or 8-day PCA in guinea pigs.

1) マウスにおける抗体産生: Fig. 2 に示したスケジュールで得られた抗血清の抗体価の測定はラット PCA で行なった。その結果 (Table 1) は, A) type, B) type ともに抗体産生が 2/5, 4/5 例に認められた。C) type, D) type では抗体の産生はほとんど認められなかった。一方, benzylpenicillin の免疫によって得られた抗体は蛋白結合抗原での group (A, B type) では全例に産生が認められるとともに, 抗体価も FOM 群に比べ高かったが PCG+Al(OH)₃, PCG+FCA の免疫ではほとんど産生は認められなかった。この傾向は CET 免疫群でも同様の結果が得られた。

2) モルモットにおける抗体産生: モルモットを使用した免疫ではマウスの場合と同様に蛋白結合抗原でのみ抗体産生が認められた (Table 2)。A) type, B) type とも 1/5, 3/5 例に抗体が産生され, その PCA 価は 10, 40 であった。FOM 単独の免疫群 (C, D type) では産生がみられなかった。PCG, CET 免疫群においても同様の測定を行なった結果, 蛋白結合抗原では強い抗体の産生, および薬剤単独では非産生でありマウスでの結果に類似した傾向を示した。

3) FOM 抗体の交差反応性: FOM-HGG, または他の HGG coupling 抗原をモルモットに免疫し得られた抗体を用いて交差反応性を比較した (Table 3)。その結果, FOM の抗体は homologous (FOM-HGG) な抗原抗体系でのみ PCA が誘発され, 他の抗原との交差性

Table 3. Antigenic cross reactivity of anti-FOM-HSA antibody among 3 antigens (3-h PCA)

Challenging antigen	Anti-FOM-HSA	Anti-BPO-HSA	Anti-CET-HSA
FOM-HGG	40	0	0
BPO-HGG	0	160	10
CET-HGG	0	20	320
FOM	0	0	0
PCG	0	0	0
CET	0	0	0
HGG	0	0	0

Antigen concentration: 2mg/ml

は認められなかった。一方 PCG と CET 間の交差性はわずかに (10, 20 倍) 認められた。また FOM 単独では PCA を誘発できなかった。Table 3 は IgG type の抗血清について示したが Ase coupling 抗原の感作によって得られた IgE type 血清も類似の傾向を示したので表には示さなかった。

4) FOM 感作モルモットにおけるアナフィラキシー・ショックの誘発性: MURPHEY¹¹⁾ らの方法で感作されたモルモットに 2% FOM-HGG を誘発抗原として静脈注射し, ショックの発来を検討した。その結果 (Table 4), FOM の実験系では軽度の立毛, 不安症状を呈した他は何らショック様症状を示さなかった。一方, PCG, CET 群ではともに 6/10, 3/10 例にアナフィラキ

Table 4. Anaphylactic shock in guinea pigs actively sensitized with HSA-coupling antigen

Immunized antigen	Inducing antigen	No. of deaths*/ No. of animals tested
FOM-HSA	FOM-HGG	0/10
BPO-HSA	BPO-HGG	6/10
CET-HSA	CET-HGG	3/10

* Number of deaths occurring within one hour of antigen challenge.

シー・ショックが認められ 10 分から 1 時間内に死亡した。その他のモルモットも多少の不安感、立毛が観察された。

III. 考 察

Fosfomycin (FOM) の抗原性を再検討する目的で種々の免疫スケジュールで感作し、抗体産生の有無を観察した。その結果、対照とした PCG, CET に比べ明らかに抗原性の低いことが確認された。使用した PCG, CET はアレルギー性副作用の報告が多く、それに対する研究もなされている¹⁹⁾ので本実験の対照とした。

FOM のような単純低分子化合物の抗原性を測定するには、それ自身の抗体産生能が低いためにそれを担体蛋白と結合せしめたもので実験的に抗体を産生させる場合が多い。PCG, CET など同様の操作で抗体が得られたが、その程度は FOM に比べ感作原性が強く抗体力価も高かった (Table 1, 2)。

一般に抗生物質の抗原性獲得の機序は薬剤と生体蛋白との強固な結合物によって生じると考えられている^{17,18,19)}。したがって FOM の抗原性の低さは蛋白結合能の低さから説明し得るが、一方において EISEN ら²⁰⁾は dinitrophenyl 基を hapten とした場合に免疫抗原として抗体産生する条件は carrier 蛋白との結合が共有結合でなくともイオン結合でも充分であると報告している。また TANIUCHI ら²¹⁾は蛋白に化学結合した haptens の数の増減は抗体産生および反応の誘発に影響を及ぼさないと報告している。これらの報告から抗生物質の蛋白結合能の強弱は抗原性の強弱には一致しない可能性もあることが十分に考えられる。実際に、今回の実験でも FOM 自身は抗原性がないにもかかわらず同一の実験で、それは蛋白とともに免疫すると抗体を産生した事実と FOM は蛋白結合能がほとんどないという報告とは前述の可能性を示唆しえるものであろう。抗生物質のもつ抗原物質のうち蛋白結合物以外に分解物、不純物についても報告されている。筆者らは以前に抗生物質水溶液中で形成される重合物、すなわち antigenic polymer について報告してきた^{22,23,24)}。そこで FOM の抗原性を

解析するために FOM 水溶液中で形成される polymer を gel chromatography で測定した。しかしながら、この実験は逆行できなかつた。その原因は水溶液を分画する際に FOM は sephadex gel に強く吸着しその溶出は不完全であったからである。gel の type を変えて種々の検討をしたが、いずれも失敗した。このような現象は連続向流透析を行なった際にも観察された。遊離の薬剤を透析によって除去するには抗生物質の場合には 2~3 時間で十分な効果が得られ²⁵⁾、それは透析外液中の薬剤の特異波長を測定することで確認された。しかしながら、FOM は外液中の FOM が 0 になるには 5 日以上が必要で、それでも透析は不十分なままであった。これは FOM が透析膜に吸着したのが原因であろうが、先に述べた gel への吸着と同じように物質への強い吸着性を示唆するものである。したがって、これらの物理化学的特性は薬剤蛋白結合物による抗原化以外に本剤が抗原化する際の一原因になる可能性が推測された。その詳細は続報に報告するが、いずれにしても FOM の抗体産生の程度は beta-lactam 系抗生物質に比べ、明らかに低いものであることが確認された。

文 献

- 1) STAPLEY, E O HENDLIN D MATA J M JACKSON M WALLICK H HERNANDEZ S MOCHALES S CURROE S A and MILLER R M: Fosfomycin. 1. Discovery and *in vitro* biological characterization. *Antimicrob Agents and Chemoth* 1969: 284~290, 1970
- 2) HENDLIN, D STAPLEY E O JACKSON M WALLICK, H MILLER A K WOLF F J MILLER T W CHAIET L KAHAN F M FOLTS E M L WOODRUFF H B MATA J M HERNANDEZ S and MOCHALES S: Fosfomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 166 (3901): 122~123, 1969
- 3) CHRISTENSEN, B G LEANZA W J BEATTIE T R PATCHET A A ARISON B H ORMONDO R E KUEHL JR. F A ALBERS-SCHNBERG G and JARDETZKY O: Fosfomycin, structure and synthesis. *Science* 166 (3901): 123~124, 1969
- 4) 小枝武美, 柴田右一, 浅岡宏康, 八巻芳夫, 井沢正典: Fosfomycin-Na 塩に関する一般薬理学的研究. *Jap J Antibiot* 32-2: 180~190, 1979
- 5) 柴田右一, 井沢正典, 柴崎義明, 永井修子, 武田植人, 柳沼恵一, 三富奈由, 梅村甲子郎: Fosfomycin の抗原に関する検討. *Jap J Antibiot* 34: 16~20, 1981
- 6) 厚生省薬務局: 医薬品副作用モニター報告の概要 (昭和 61 年~昭和 62 年)
- 7) STEREJAN, G H and SURLAN D: Reaginic

- antibody production to ascaris suum allergen Ase. 1. The function of glutaraldehyde polymerized antigen in the induction of reaginic (IgE) antibodies in the rat. *Int Arch Allergy App Immunol* 54 : 487~501, 1977
- 8) STEWART, G T : Allergic residues in penicillin. *Lancet* 1 : 1177~1183, 1968
- 9) LEVINE, B B and OVARY Z : Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. The N(D- α -benzylpenicillyl) group as antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med* 114 : 873~903, 1961
- 10) ZEINCH, R A PILLARY V K G SMITH E C BAWA E FIORELLA B J and DUNEA G : Thin-layer microtubular continuous flow countercurrent dialysis. *J Lab Clin Md* 79 : 648~656, 1972
- 11) DANAN, A P BINAGHI R A and BADIE A : Effect of heating at 56°C on mouse IgE antibody. *Immunochemistry* 14 : 81~84, 1977
- 12) MANCINO, D and BEVILACQUA N : Further studies on the adjuvant effect of silica on IgE antibodies production in mice. *Int Arch Allergy Apl Immunol* 59 : 427~431, 1979
- 13) MARGNI, R A and HAJIS E S : Guinea pig reaginic antibody II. Physicochemical and biological properties. *Immunology* 25 : 333~338, 1973
- 14) OVARY, Z : Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen interaction. *Prog Allergy* 5 : 459~508, 1964
- 15) MURPHEY, S M BROWN S MIKLOS N and FIRMAN P : Reagin synthesis in inbred strains of rats. *Immunology* 27 : 245~258, 1974
- 16) 堀内淑彦 : 薬剤アレルギー入門, 57頁, 金原出版, 1987
- 17) LEVINE, B B : Studies on the mechanism of formation of the penicillin antigen. 1. Delay allergic cross-reaction among penicillin G and its degradation products. *J Exp Med* 121 : 1131~1154, 1960
- 18) LEVINE, B B : Studies on formation of the penicillin antigen. 2. Some reactions of D-benzylpenicillinic acid in aqueous solution at pH 7.5. *Arch Biochem Biophys* 93 : 50~55, 1961
- 19) LEVINE, B B : Studies on the dimensions of the rabbit anti-benzylpenicilloyl antibody combining sites. *J Exp Med* 117 : 161~183, 1963
- 20) EISEN, H N CARSTEN M E and BELMAN S : Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. *J Immunol* 73 : 296~302, 1954
- 21) TANIUTI, S HONJOH T TAMOTO K NAKAMURA T and KOYAMA J : Different affinities of mono- di- and tri-DNP ribonuclease a for anti-DNP antibody. *Mol Immunology* 18 : 301~309, 1981
- 22) Dewendney, J M SMITH U and WHEELER W : The formation of antigenic polymers in aqueous solution of beta-lactam antibiotics. *Immunology* 21 : 517~523, 1971
- 23) 竹内良夫, 西村葉子, 林 宜之, 木村義民 : PCG polymer との結合性について (とくに連続向流透析法での解析)。 *Chemotherapy* 28 : 9~13, 1980

ANTIGENICITY AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FOSFOMYCIN (1)

YOSHIO TAKEUCHI¹⁾, JUN-ICHI KURIYAMA¹⁾, YOKO NISHIMURA¹⁾
TATSUSUKE YOSHIKAWA¹⁾, KOZO YOKOMURO¹⁾, TOKINORI WATANABE²⁾
KEN KAWASHIMA³⁾ and SHIN-ICHI YOSHINO³⁾

1) Dept. of Microbiology and Immunology

2) Dept. of Legal Medicine

3) Dept. of Rehabilitation and Joint Disease

Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

We carried out this study to clarify the immunogenicity and immunological characteristics of fosfomycin (FOM).

We also performed experiments on the immunogenic reactivity to benzylpenicillin (PCG) and cephalothin (CET).

The results obtained are as follows.

As an immunogen, FOM was used alone or coupled with human serum albumin (HSA) or ascaris suum extract (Ase). In various schedules of immunization of mice and guinea pigs, FOM showed only weak antibody-forming activity.

The highest antibody titers were observed in the sera of mice immunized with FOM-HSA conjugates and FCA. No antigenic cross-reactions between anti-BPO-HSA and anti-CET-HSA sera were observed. Also, no antibody formation was detected in mice and guinea pigs sensitized with FOM alone and adjuvant.

In guinea pigs sensitized with FOM-HSA, no signs of anaphylactic shock were observed.

From these results, we propose that FOM has only weak antigenic potency in experimental animals compared with PCG or CET.