

NY-198のモルモットにおける抗原性に関する試験

沼田 弘明・直 弘・津田 敏治・柳田 知司

(財) 実験動物中央研究所付属 前臨床医学研究所

NY-198の抗原性をモルモットを用いて検討した。NY-198に対する抗体の検出は全身性アナフィラキシー (ASA) 反応, 受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応, 受身赤血球凝集 (HA) 反応および寒天ゲル内沈降反応によった。

NY-198を単独に反復経口投与した動物および Freund's complete adjuvant (FCA) とともに反復皮下投与した動物では, NY-198および NY-198のウシアルブミンとの結合体 (NY-198-BSA) のいずれを誘発投与しても ASA を示さなかった。これらの動物から誘発前に採取した血清についてはいずれの抗体検出反応とも陰性の結果を示し, 抗NY-198抗体の産生は認められなかった。

NY-198-BSA を FCA とともに反復皮下投与した動物では, NY-198のヒトアルブミンとの結合体 (NY-198-HSA) の誘発投与により ASA を示したが, NY-198の誘発投与により ASA を示さなかった。血清についての抗体検出反応はいずれも陽性の結果を示し, 抗NY-198抗体の産生が認められた。

この抗 NY-198抗体について pipemidic acid, norfloxacin および ofloxacin の各 HSA 結合体を誘発抗原とする 4 時間 PCA 反応を行なったところ, いずれの誘発抗原によっても反応は陽性であり, NY-198とこれら構造類似薬との間には免疫学的交差反応性が認められた。

ヒト血液を用いた試験管内直接クームス試験では NY-198は0.15~5 mg/mlの濃度においてクームス陽性化作用を示さなかった。

以上の結果から, NY-198はそれ自体ではモルモットにおいて抗原性を有さないものと思われる。

NY-198は北陸製薬株式会社で開発された抗菌性化学療法剤で, グラム陰性菌およびグラム陽性菌に対して幅広い抗菌スペクトルと優れた抗菌力を示すことが認められている¹⁾。本薬は Fig. 1 に示す化学名および化学構造式を有しており, nalidixic acid, piromidic acid あるいは pipemidic acid などの合成抗菌薬と構造的に類似し

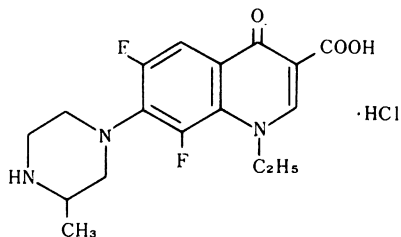
ている。

今回, NY-198の安全性評価の一環としてモルモットにおける NY-198の抗原性を検討するとともにヒト血液を用いて試験管内直接クームス試験を行なった。

I 実験材料および方法

1. 被験薬および試薬

NY-198は北陸製薬株式会社で合成された Lot No. YA83D を使用した。本薬は水に溶けにくく, しかも ethanol, acetone, ether などの有機溶媒にもほとんど溶けない白色の結晶性粉末である。免疫学的交差性試験には, pipemidic acid (Lot No. NY-261-I-①), norfloxacin (Lot No. NY-012-VI-②) および ofloxacin (Lot No. XH960) を, また試験管内直接クームス試験の陽性対照薬としては cephalothin Na 塩 (Lot No. GB-21) を用いた。これらの薬物はいずれも北陸製薬株式会社より提供されたものを用いた。その他にウシアルブミン (BSA, Lot No. M4R9182, Armour 社製), ヒトア



(±)-1-ethyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride

Fig. 1. Chemical structure and chemical name of NY-198.

ルブミン (HSA, Lot No.126373, Chemical Dynamics Corporation 製), Freund's complete adjuvant (FCA, Control No. 721916, Difco Laboratories 社製), 緬羊保存血液 (日本バイオテスト研究所製) および抗ヒトグロブリン血清 (Ortho 社および Dade 社製) を用いた。

2. 使用動物

船橋農場より購入(1985年5月29日: 65匹, 6月26日: 20匹, 7月3日: 20匹, 10日: 12匹, 17日: 26匹, 24日: 10匹, 31日: 30匹, 1986年7月30日: 8匹)した体重280~423g (4~7週齢) の Hartley 系雄モルモットを用いた。動物は室温20~24.5℃, 湿度66~84%に維持され, 照明時間8~20時に設定された動物室内で金属製ケージ (縦50cm, 横30cm, 高さ21cm) に5匹ずつ飼育し, 固型飼料 (モルモット用 CG-3, 日本クレア社製) および水道水を自由に与えた。

3. 薬物の蛋白結合物の調製

NY-198のBSAおよびHSAとの結合物の調製は, carbodiimide法により NY-198のカルボキシル基を, 蛋白質の遊離アミノ基に結合させる反応により行なった。すなわち, NY-198 100mgを0.001N HCl 8mlに加熱溶解し, 0.1N NaOHでpH 4~6にしたのち, 200~250 mg/mlの1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl塩 (EDC) 水溶液1mlを加えて室温で10分間反応させた。この反応液を100mg/mlのBSA溶液1mlに攪拌しながら徐々に加えた。室温で一晩反応させたのち, 反応液について Sephadex G-25でのカラムクロマトグラフィーを行ない, void volume 付近に溶出される NY-198-BSA 結合体画分を集め, 限外濾過装置を用いて濃縮したものを NY-198-BSA 結合体 (NY-198-BSA) とした。この結合体のBSA 1分子あたりの NY-198の結合分子数は, NY-198の紫外吸収極大波長279nmにおける NY-198-BSA とBSAとの吸光度差から算出すると, 4.2ないし5.4分子であった。NY-198とHSAとの結合体の調製も同様の操作で行ない, HSA 1分子あたり4.4分子のNY-198が結合したNY-198-HSA結合体 (NY-198-HSA) を得た。Pipemidic acid, norfloxacin および ofloxacin のHSAとの結合体の調製はこれらの薬物が0.001N HClに対する溶解度が著しく低いため, pyridine を溶解溶媒として同様に carbodiimide法により行なった。各結合体のHSA 1分子あたりの薬物の結合分子数は, pipemidic acid で22分子, norfloxacin で48分子, ofloxacin で23分子であった。また, EDC処理したHSAも同様に調製した。

4. 投与方法

体重311~423g (6週齢) の雄の Hartley 系モルモットを1群5~10匹として7群用意した。群分けは各群間の平均体重が等しくなるように行ない, 各個体には番号

入り金属プレート付き首輪を付けて個体識別した。I群とII群にはNY-198を0.5% carboxymethylcellulose Na塩溶液に10ないし100mg/mlの濃度になるように懸濁させて調製した薬液を下記に示す用量で毎週3回, 2週間にわたり計6回強制胃内投与した。IIIからVII群にはFCAをadjuvantとして用いて皮下投与した。投与薬液として, III群には生理食塩水 (saline) を, IV群とV群にはそれぞれ6 mg/mlと60mg/mlのNY-198のsaline懸濁液を, VI群には4.81mg蛋白質/mlのNY-198-BSA溶液を, VII群には4 mg/mlのBSA溶液を用い, いずれも等容量のFCAと混ぜてw/o型エマルジョンを調製し, 下記に示す用量で毎週1回, 4週間にわたり計4回側腹部皮下に投与した。

第I群: NY-198 30mg/kg

第II群: NY-198 300mg/kg

第III群: (Saline 0.5ml + FCA 0.5ml)/kg

第IV群: (NY-198 3 mg + FCA 0.5ml)/kg

第V群: (NY-198 30mg + FCA 0.5ml)/kg

第VI群: (NY-198-BSA 1 mg蛋白質 + FCA 0.21 ml)/頭

第VII群: (BSA 1 mg + FCA 0.25ml)/頭

5. 採血

最終投与後14日目に各群のモルモットについて頸静脈より2~2.5mlの血液を採取し, 2500rpm, 20分間遠心して血清を得た。血清は抗体検出に用いるまで-20℃に保存した。

6. 全身性アナフィラキシー (ASA) 反応

最終投与後17日目に各群のモルモットに対して対応するそれぞれの抗原を静脈内投与し, アナフィラキシー症状の誘発を試みた。すなわち, IからV群までにはNY-198 1 mg/kgとNY-198-BSA 1 mg蛋白質/頭を, VI群にはNY-198 1 mg/kgとNY-198-HSA 1 mg蛋白質/頭を, それぞれ5匹ずつに, VII群にはBSA 1 mg/頭を静注した。静注後10分間にみられる症状を観察し, アナフィラキシー症状の程度を以下に示す基準に従い4段階に分けて判定した。

陰性 (Negative) : 症状の全く認められないもの。

軽症 (Mild) : 立毛, 鼻掻き, くしゃみ, ふるえ, 呼吸促進などの症状のうち, 発現した症状の数が1~3のもの。

中等症 (Moderate) : 上記の症状に加えて排尿, 脱糞, 呼吸困難, チアノーゼ, 喘鳴, 努力呼吸, 歩行不安定などの症状が加わり, 症状の数が4~7のもの。

重症 (Severe) : 上記に加えて痙攣に転倒, 虚脱などの症状が加わり, その数が8以上のもの, またはショック死をきたしたものの。

7. 受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応

各投与群モルモットから得られた血清について、OVARYらの方法²⁾に準じて4時間および8日間のhomologous PCAを行ない、IgG₁型およびIgE型抗体を検索した。体重280~421g(4~7週齢)の無処置モルモットをレシピエント動物として、その背部を使用前に剪毛し、正中線をはさんで左右の3ないし6ヶ所に、あらかじめ倍数希釈した被検血清0.1mlずつを皮内注射した。4時間あるいは8日間の感作期間において、NY-198, NY-198-BSA, NY-198-HSAあるいはBSAの各抗原溶液と1% Evans blue生理食塩水溶液との等量混液を前肢あるいは耳介静脈より投与した。各抗原の惹起用量としてはNY-198では1mg/kg, NY-198-BSAとNY-198-HSAでは1mg蛋白質/頭, BSAでは1mg/頭を用いた。静注30分後にモルモットの後頭部を強打して致死せしめ、皮膚を剥離して皮膚内面に形成された青色斑の直径を2ヶ所で計測し、その平均値が5mm以上のものを陽性として、陽性を示す最高希釈倍数をもって抗体価とした。

またNY-198とpipemidic acid, norfloxacin, ofloxacinなどの他の抗菌薬との間の交差反応性についてもVI群の10匹中6匹のモルモット血清を用いて、各抗菌薬のHSA結合物およびEDC処理HSAを誘発抗原とした4時間PCAを行なった。なお、これらの誘発抗原の惹起用量はいずれも1mg蛋白質/頭とした。

8. 受身赤血球凝集 (HA) 反応

① 抗原被覆赤血球の調製

市販の綿羊保存血液を2000rpm, 10分間遠心して得られた赤血球をsalineで4回洗浄後、0.15M 磷酸緩衝生理食塩水 (pH7.2, PBS) に浮遊させた。この浮遊液に1/5容量の2.5% glutaraldehyde-PBS溶液を徐々に加え、室温で1時間反応を行なった。固定された赤血球はsalineで4回洗浄後PBSに5%になるように浮遊させた。NY-198被覆赤血球の調製は、この5%固定赤血球浮遊液5mlに、あらかじめ300mg/mlのEDC-PBS溶液1mlと5mg/mlのNY-198-PBS溶液4mlとを加えておいた混合液を徐々に加え、攪拌しながら一晩反応させて行なった。NY-198被覆赤血球は30mlのPBSで6回洗浄後2.5%家兎血清-PBS希釈液(NRS-PBS)に1.5%になるように浮遊させてHAに用いた。BSA被覆赤血球はglutaraldehyde固定赤血球をtannic acidで処理して得られた5%赤血球浮遊液に等容量のBSA溶液(500μg/ml)を加えて37°C, 1時間反応させて調製した。HAにはこの赤血球を2% NRS-PBSに1%になるように浮遊させて用いた。

② 抗体価の測定

各群モルモットからの血清について56°C, 30分間の非

働化処理を行ない、ついで非特異的凝集素を吸収除去するため、等容量の5% glutaraldehyde固定赤血球を加えて37°C, 30分間インキュベーション処理を行ない、2000rpm, 10分間の遠心分離により得られた上清を被検血清の2倍希釈液としてHAに用いた。

抗体価の測定はマイクロタイテーション法により行なった。すなわち、0.025mlの2ないし2.5%NRS-PBS溶液の入ったパーマネントタイププレート(V型)に0.025mlの被検血清を加えてダイリューターを用いて順次倍数希釈系列液を調製した。この血清の希釈系列液にNY-198またはBSA被覆赤血球を加えて10分間振盪攪拌したのち、室温で一晩放置し、プレート上の赤血球が凝集像を呈しているか否かを観察し、凝集を示す最高希釈倍数をもって抗体価とした。

9. 寒天ゲル内沈降反応

沈降抗体の検出は、各群のモルモット血清についてNY-198-BSA, NY-198-HSA, HSAあるいはBSAを抗原としてOuchterlony法により行なった。Agarose II (和光純薬製)を1%の割合でVeronal緩衝液(pH8.6, $\mu=0.05$)に溶かし、ガラスプレート上にそそぎ、厚さ2mmのアガロースプレートを作製し、抗原用の穴を中心に、3mm離してその周囲に被検血清用の穴を開けた。抗原用の穴にはNY-198-BSA (1.0mg蛋白質/ml), NY-198-HSA (2.0mg蛋白質/ml), HSA (2.0mg/ml)あるいはBSA (1.0mg/ml)の各抗原液10μlを、そして被検血清用の穴には10~20μlの血清を入れ、4°C, 24時間反応させ、沈降線の有無を観察した。

10. 試験管内直接クームス反応

MOLTHANらの方法³⁾を参考としてヒト血液を用いた試験管内直接クームス反応を検討した。4名の健常男子(年齢26~32歳)のO型血液3mlを採血し、これに1mlのAlsever溶液を加えてAlsever血液を作製した。PBSに溶解した種々の濃度のNY-198溶液(10~0.47mg/ml)0.1mlまたは陽性対照薬のcephalothin Na塩溶液(60~1.9mg/ml)0.1mlにAlsever血液0.1ないし0.2mlを加えて、37°C, 3時間インキュベーションした。ついで遠心分離して上清を吸引除去した後、各沈渣赤血球を冷えたPBSでよく洗浄し、PBSで2%浮遊液とした。この処理赤血球浮遊液0.025mlをパーマネントタイプV型プレートにとり、クームス血清0.025mlを加えて、5分間振盪後室温に1時間放置し、凝集の有無を観察した。凝集の強さは5段階(卅, 卅, +, ±, -)で表示し、+以上の濃度を陽性と判定した。

II 結 果

1. 全身性アナフィラキシー反応

各投与群のモルモットに、最終投与後17日目に誘発抗

Table 1. Active systemic anaphylaxis test in sensitized guinea pigs

Group	Sensitized antigen (Dose, route)	Provoked antigen (Dose)	Animal No.	Symptom														Grade of anaphylaxis	
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		O
I	NY-198 (30mg/kg, i. g.)	NY-198 (1 mg/kg)	1	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			2	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			3	—	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	Moderate		
			4	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			5	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	Mild		
		NY-198-BSA (1 mg protein/ head)	6	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			7	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			8	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			9	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			10	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	Mild	
II	NY-198 (300mg/kg, i. g.)	NY-198 (1 mg/kg)	11	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			12	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			13	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			14	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			15	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
		NY-198-BSA (1 mg protein/ head)	16	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild
			17	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Moderate
			18	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild
			19	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild
			20	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild
Symptom				A : Pilo-erection				F : Micturition				K : Labored breathing							
				B : Nose scratching				G : Defecation				L : Ataxia							
				C : Sneezing				H : Dyspnea				M : Convulsion & inversion							
				D : Tremor				I : Cyanosis				N : Prostration							
				E : Tachypnea				J : Stridor wheeze				O : Death							

原を静注し、惹起された症状を Table 1 と 2 に示した。
陽性対照である BSA 投与群の 5 例中 2 例は BSA の誘発により、鼻掻き、呼吸促進、立毛、努力呼吸、喘鳴、チアノーゼ、呼吸困難、脱糞、歩行不安定などの症状をひきおこし、さらに四肢を痙攣させ、転倒し、静注後 5 分 25 秒および 8 分 15 秒後にそれぞれ死亡した。これらの症状は急激かつ一過性に現れる典型的なアナフィラキシーショック症状であった。他の 3 例は死亡しなかったものの、重症、あるいは中等症のアナフィラキシーショック症状を呈した。

ASA における陰性対照である saline 投与群では NY-198 または NY-198-BSA のいずれの誘発抗原によっても、ふるえと排尿などが比較的多くの個体にみられ、脱糞、呼吸促進、鼻掻きなども散発的にみられた。これらの症状は、おそらく抗原抗体反応の結果として惹起されたのではなく、用いられた誘発抗原の直接作用または静注する際の保定に伴うストレスに起因するものであろう。

NY-198 30mg/kg 経口投与群に対して NY-198 または NY-198-BSA を誘発投与すると、1 例 (No.3) のみに排尿、喘鳴、呼吸困難およびふるえなどがみられたが、これは誘発の際に誤って少量の空気を静脈内に注入した

ためと思われる。他の 9 例については、死亡例はなく、ふるえが全例に、脱糞が 5 例に、排尿が 4 例に、そして鼻掻きが 1 例にみられた程度であった。これらの症状は saline 投与群においても認められていることからアナフィラキシー症状とは異質のものと思われる。同様の症状は NY-198 300mg/kg 経口投与群においても認められた。FCA を adjuvant として用いた NY-198 の 3 および 30mg/kg 皮下投与群では、NY-198 あるいは NY-198-BSA のいずれの誘発抗原を用いた場合でも死亡例はみられず、ふるえ、排尿および脱糞が多くの例に、そして一部に鼻掻きあるいは呼吸促進がみられ、これらの症状も saline 投与群とほとんど変わらない程度であった。

NY-198-BSA 皮下投与群に対して NY-198 を誘発投与した場合、ほとんどの個体にはふるえと排尿がみられたが、症状の程度としては陰性対照の saline 投与群とほとんど変わらなかった。NY-198-HSA を誘発投与した場合には、呼吸促進、排尿、立毛、努力呼吸、喘鳴、チアノーゼ、呼吸困難などの症状が連続的に現れ、さらに四肢を痙攣させ、転倒し、5 例中 4 例は 10 分以内に死亡した。残りの 1 例も重症のアナフィラキシー症状を示した。

Table 2. Active systemic anaphylaxis test in sensitized guinea pigs

Group	Sensitized antigen (Dose, route)	Provoked antigen (Dose)	Animal No.	Symptom																Grade of anaphylaxis
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O		
III	Saline+FCA (1 ml/kg, s. c.)	NY-198 (1 mg/kg)	21	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			22	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild			
			23	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild			
			24	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	Moderate			
			25	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild			
		NY-198-BSA (1 mg protein/ head)	26	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			27	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			28	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			29	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			30	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
IV	NY-198+FCA (3 mg/kg, s. c.)	NY-198 (1 mg/kg)	31	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			32	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			33	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			34	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			35	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
		NY-198-BSA (1 mg protein/ head)	36	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			37	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			38	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			39	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			40	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
V	NY-198+FCA (30 mg/kg, s. c.)	NY-198 (1 mg/kg)	41	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Negative		
			43	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			44	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			45	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
		NY-198-BSA (1 mg protein/ head)	46	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			47	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			48	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Moderate	
			49	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
			50	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild	
VI	NY-198-BSA+ FCA (1 mg protein/ head, s. c.)	NY-198 (1 mg/kg)	51	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			52	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Moderate		
			53	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			54	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
			55	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	Mild		
		NY-198-HSA (1mg protein/ head)	56	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	+	—	+	—	+	Severe	
			57	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	Severe	
			58	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	Severe	
			59	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	Severe	
			60	+	—	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	Severe	
VII	BSA+FCA (1 mg/head, s. c.)	BSA (1 mg/head)	61	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	Severe	
			62	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+	Severe	
			63	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	Moderate	
			64	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	Severe
			65	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	Severe

Symptom	A : Pilo-erection	F : Micturition	K : Labored breathing
	B : Nose scratching	G : Defecation	L : Ataxia
	C : Sneezing	H : Dyspnea	M : Convulsion & inversion
	D : Tremor	I : Cyanosis	N : Prostration
	E : Tachypnea	J : Stridor wheeze	O : Death

Table 3. Passive cutaneous anaphylaxis test on serum of sensitized guinea pigs

Group	Sensitized antigen (Dose, route)	Number of animals tested	PCA titer (Number of animals observed)							
			NY-198		NY-198-BSA		NY-198-HSA		BSA	
			4 h	8 days	4 h	8 days	4 h	8 days	4 h	8 days
I	NY-198 (30 mg/kg, i. g.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)				
II	NY-198 (300 mg/kg, i. g.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)				
III	Saline+FCA (1 ml/kg, s. c.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)				
IV	NY-198+FCA (3 mg/kg, s. c.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)				
V	NY-198+FCA (30 mg/kg, s. c.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)	N.D.(10)				
VI	NY-198-BSA +FCA (1 mg protein/ head, s. c.)	10	N.D.(10)	N.D.(10)			128(1), 256(2), 512(1), 1024(6)			
VII	BSA+FCA (1 mg/head, s. c.)	5							128(2), N.D.(5) 1024(1), 2048(2)	

N.D. : Not detectable (Minimum dilution ratio of serum=4)

2. 受身皮膚アナフィラキシー反応

各投与群のモルモットからの血清について4時間(IgG₁)および8日間(IgE)のhomologous PCA反応の結果をTable 3に示した。

BSA投与群の血清を皮内投与したモルモットでは、4時間後におけるBSAの静注惹起により皮内投与部位に抗原抗体反応に基づく明瞭な色素漏出斑が現れ、PCA反応は陽性であった。BSAに対するIgG₁抗体価は128倍から2048倍であり、個体差が大きかった。しかし、これらの血清の8日間PCA反応は全例陰性であった。

NY-198の30および300mg/kg経口投与群の血清についてNY-198あるいはNY-198-BSAを誘発抗原とした4時間および8日間PCA反応を行なったが、いずれの血清とも陰性であった。3および30mg/kg皮下投与群の血清についてもNY-198あるいはNY-198-BSAのいずれの誘発抗原によっても4時間および8日間PCA反応はすべて陰性であった。したがってNY-198を経口または皮下投与したモルモットの血清からは誘発抗原の如何にかかわらず、NY-198に対する抗体は検出されなかった。

NY-198-BSA投与群の血清についての4時間および8日間のPCA反応は、NY-198を誘発抗原とした場合には、いずれも惹起されなかったが、NY-198-HSAを誘発抗原とした場合には、4時間PCA反応が陽性となり、全例にNY-198に対するIgG₁抗体の産生が確認さ

れた。その抗体価は128倍から1024倍であった。しかし8日間PCA反応では全例陰性であった。

3. 受身赤血球凝集反応

各投与群モルモットの血清についてHA法による抗体価をTable 4に示した。

NY-198およびBSA被覆赤血球はsaline投与群の4倍希釈血清を添加しても非特異的な凝集を起こさなかった。陽性対照であるBSA投与群血清では、BSA被覆赤血球との間に凝集反応がみられ、BSAに対する抗体の存在が確認された。その抗体価は512~2048倍であった。NY-198の30と300mg/kg経口投与群および3と30mg/kg皮下投与群の血清では、NY-198被覆赤血球に対する凝集反応はすべて陰性で、NY-198に対する抗体は存在しなかった。NY-198-BSA皮下投与群の血清では、NY-198被覆赤血球との間の凝集反応は8例が陽性で、その抗体価は4~256倍であった。残りの2例は4倍希釈液においても陰性であった。

4. 寒天ゲル内沈降反応

各投与群モルモットの血清について沈降抗体の検索をOuchterlony法により行ない、その結果をTable 5に示した。

陽性対照であるBSA投与群の5例のうちの3例の血清はBSAとの間に沈降線を形成した。NY-198の30と300mg/kg経口投与群および3と30mg/kg皮下投与群のいずれの血清とも、NY-198にキャリアー蛋白質を結合し

Table 4. Passive hemagglutination test on serum of sensitized guinea pigs

Group	Sensitized antigen (Dose, route)	Number of animals tested	HA titer (Number of animals observed)	
			NY-198-coated SRBC	BSA-coated SRBC
I	NY-198 (30 mg/kg, i.g.)	10	N.D. (10)	
II	NY-198 (300 mg/kg, i.g.)	10	N.D. (10)	
III	Saline+FCA (1 ml/kg, s.c.)	10	N.D. (10)	N.D. (10)
IV	NY-198+FCA (3 mg/kg, s.c.)	10	N.D. (10)	
V	NY-198+FCA (30 mg/kg, s.c.)	10	N.D. (10)	
VI	NY-198-BSA+FCA (1 mg protein/head, s.c.)	10	N.D. (2), 4 (3), 8 (3), 32 (1), 256 (1)	
VII	BSA+FCA (1 mg/head, s.c.)	5		512 (2), 1024 (2). 2048 (1)

N.D. : Not detectable (Minimum dilution ratio of serum=4)
SRBC : Sheep red blood cell

Table 5. Ouchterlony test on serum of sensitized guinea pigs

Group	Sensitized antigen (Dose, route)	Positive/Total (Number of animals)			
		NY-198-BSA	NY-198-HSA	HSA	BSA
I	NY-198 (30 mg/kg, i. g.)	0/10	0/10		
II	NY-198 (300 mg/kg, i.g.)	0/10	0/10		
III	Saline+FCA (1 ml/kg, s.c.)	0/10	0/10		
IV	NY-198+FCA (3 mg/kg, s.c.)	0/10	0/10		
V	NY-198+FCA (30 mg/kg, s.c.)	0/10	0/10		
VI	NY-198-BSA+FCA (1 mg protein/head, s.c.)		9/10	0/10	
VII	BSA+FCA (1mg/head, s.c.)				3/5

た NY-198-BSA または NY-198-HSA に対して沈降線を形成しなかった。したがって、NY-198を単独または FCA とともに投与したモルモットからは、NY-198に対する抗体は検出されなかった。一方、NY-198-BSA 皮下投与群の10例のうち9例の血清は NY-198-HSA との間に明瞭な沈降線を形成した。これらの血清は HSA に対する沈降反応がすべて陰性であったことから、この沈降線は抗 NY-198抗体と NY-198との間で特異的に反応することにより形成されたものと思われる。

5. 他の合成抗菌薬との免疫学的交差性反応

NY-198と pipemidic acid, norfloxacin および ofloxacin などの構造類似合成抗菌薬との免疫学的交差性について4時間 PCA 反応により検討した結果を Table 6 に示した。

抗 NY-198抗体の産生が認められた NY-198-BSA 皮下投与群の10例中6例の血清を用いた PCA 反応は、pipemidic acid-, norfloxacin-あるいは ofloxacin-HSA のいずれの誘発によっても明瞭な色素漏出斑が認められ、全例が陽性の結果を示した。しかし、これらの誘発抗原での抗体価は、pipemidic acid-HSA で64~512倍、norfloxacin-HSA で8~256倍、そして ofloxacin-HSA で64~256倍であり、いずれも NY-198-HSA での128~1024倍に比べてやや低い値を示しており、抗 NY-198抗体に対するこれらの薬物の反応性は NY-198そのものに比べてやや弱くなる傾向を示した。なお、EDC 処理した HSA を誘発抗原とした場合には PCA 反応は全例とも陰性であった。

6. 試験管内直接クームス試験

4例の健康男子 O 型血液を用いた直接クームス試験の結果を Table 7 に示した。

陽性対照薬である cephalothin Na 塩を作用させたヒト赤血球は、クームス血清を加えると凝集反応を示した。この直接クームス反応を陽性化する cephalothin Na 塩の濃度は Ortho 社製クームス血清で5~10mg/ml、Dade 社製クームス血清で10~20mg/mlで、クームス血清の製造元の違いにより2~4倍の差が認められた。

NY-198では、最終濃度として0.15~5 mg/mlの濃度範囲で処理した赤血球の直接クームス反応は全例が陰性であり、クームス陽性化作用を示さなかった。

III 考 察

NY-198は抗菌性化学療法剤としての臨床適用が考えられている。抗菌性の薬剤は一般に臨床用量が比較的多く、しかも長期間にわたり服用する場合もあり、その使用期間中にアレルギー反応を惹起する可能性も考えられる。事実、NY-198と同様にピリドンカルボン酸系合成抗菌剤に属し、既に市販されている nalidixic acid, pipe-

midic acid, norfloxacin および ofloxacin などに対してごくまれではあるが、発疹などのアレルギー症状を惹起した例が報告されている^{4,5)}。そこで NY-198に関して、動物を免疫して抗体を産生させる能力すなわち免疫原性の有無および免疫された動物にアレルギー反応を起こす性質すなわち誘発原性の有無を知る目的でモルモットを用いて抗原性の検討を行なった。同時に、NY-198を BSA に化学的に結合した NY-198-BSA でモルモットを免疫して、haptens に対する特異抗体すなわち抗 NY-198抗体が産生されるか否かを併せて検討した。

免疫条件としては、動物実験においても薬物を単独で投与することが、ヒトにおける薬物アレルギーの自然発症の条件に近く望ましい。しかし、低分子薬剤の単独投与によって抗体産生に成功した研究例は少なく、わずかに penicillin⁶⁾, aspirin⁷⁾ および chloramphenicol⁸⁾ などの報告を見るに過ぎない。そこで本試験では NY-198を単独経口投与するとともに、IgG や IgM 型抗体の関与する免疫応答を増強させる作用を有する FCA とともに皮下投与した。投与量は、経口投与ではラットならびにサルの上急性毒性試験の結果^{9,10)}から推定される無影響量の30mg/kgを低用量として、その10倍量の300mg/kgを高用量とした。低用量の30mg/kgは推定臨床用量の3~6倍に相当する。また皮下投与では30mg/kgとその1/10の3mg/kgの2用量とした。

BSA で免疫したモルモットでは、全身性アナフィラキシー反応において判定の指標となる症状のうちの7~9のものが急激かつ一過性に発来経過する典型的なアナフィラキシー症状が惹起され、しかも血清を用いた PCA, HA および寒天ゲル内沈降反応でも陽性の結果が得られ、5例全例に BSA に対する抗体が産生されていたことから、本試験の免疫条件では、BSA に対する感作が成立することが確認された。

NY-198-BSA で免疫し、免疫抗原とはキャリアー蛋白質を異にする NY-198-HSA で誘発した場合、BSA 投与群と同様に急激かつ一過性のアナフィラキシーショック症状が惹起され、5例中4例が死亡した。これらの動物の血清について PCA, HA および寒天ゲル内沈降反応などの免疫学的方法により抗体の検出を試みたところ、検出法により陽性率に若干の違いがあったが、NY-198-HSA を抗体検出抗原とした4時間 PCA では10例全例に抗体が存在するとの結果が得られた。この抗体は、Table 6 の PCA での結果に示されるように、BSA と HSA との間に交差反応性が認められないことから、NY-198に特異的なものと考えられる。NY-198に特異的な抗体を産生し、しかも NY-198-HSA の誘発によってアナフィラキシー症状を惹き起こす程に十分な感作の成立しているモルモットに NY-198を静注してもアナフィ

Table 6. Cross-reaction between NY-198 and its structurally related antibacterial agents in 4 h passive cutaneous anaphylactic reaction

Anti-NY-198-BSA serum	PCA titer				
animal No.	NY-198-HSA	Pipemidic acid-HSA	Norfloxacin-HSA	Ofloxacin-HSA	EDC-treated HSA
51	1024	256	256	256	N. D.
53	128	64	32	64	N. D.
56	1024	512	128	256	N. D.
57	1024	128	8	64	N. D.
58	256	64	16	64	N. D.
59	512	256	128	256	N. D.

N. D. : Not detectable (Minimum dilution ratio of serum=4)
EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

Table 7. Direct Coombs' test of NY-198-treated human blood

Subject No.	Coombs' reagent	Final concentration of drugs (mg/ml)											
		NY-198						Cephalothin Na salt					
		5.0	2.5	1.3	0.63	0.31	0.15	20	10	5.0	2.5	1.3	0.63
1.	Ortho Dade	—	—	—	—	—	—	+++	++	+	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—
2.	Ortho Dade	—	—	—	—	—	—	++	+	±	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
3.	Ortho Dade	—	—	—	—	—	—	+++	++	+	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	++	+	—	—	—	—
4.	Ortho Dade	—	—	—	—	—	—	+++	++	+	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—

ラキシ-症状はまったく惹起されなかった。したがって、NY-198それ自体にはアナフィラキシ-誘発原性はないものと思われる。

NY-198を単独経口投与あるいはFCAとともに皮下投与し、NY-198とそのBSA結合体でアナフィラキシ-反応の誘発を行なったところ、ふるえ、鼻掻き、排尿、脱糞などの症状が個体により散発的にみられた。しかし、これらの症状は陰性対照であるsaline投与群においても認められており、その症状の出現頻度もほとんど変わらなかったことから抗原抗体反応に基づいて惹起されたものではなく、おそらく、用いられた誘発抗原の直接作用によるものか、注射の際の保定に伴うストレスによるものであろうと考えられた。このことは、これらの群のいずれの血清からも抗体が検出されなかったことから裏付けられる。今回、抗体検出に用いた方法は、NY-198

-BSAで免疫した動物においていずれも抗体陽性反応を示しており、NY-198そのものの抗原性を検討するうえでの抗体検出系として感度の点でも問題がなく、抗体が産生されていれば確実に陽性の結果が得られる検出系であると考えられる。したがって、NY-198それ自体には免疫原性はないものと思われる。

低分子薬剤によるアレルギーは薬剤またはその代謝物が体内で蛋白質などの生体高分子物質と非可逆的結合をしたものが抗原となり発現するとの機序が考えられている。血流中に入った薬剤は遊離型あるいは血清蛋白質との結合型として存在するが、その結合の大部分は、水素結合、イオン結合、あるいはVan der Waals力によるもので、可逆的であり、抗原性を発揮するほどの結合力はないと考えられている。アレルギーの発症機序に関して hapten としての抗原化の可能性が論じられている

sulfa 剤とヒト血清蛋白との結合率は限外濾過によると 64~94% であると報告されている¹¹⁾。NY-198 では、限外濾過法によるヒト血清蛋白結合率は濃度 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ において 18.3~25.9%¹²⁾ と sulfa 剤に比べて低い値であった。蛋白結合率の高低が必ずしも抗原性と関連するものではないが、この点からも NY-198 の抗原化の可能性はきわめて低いものと思われる。

化学構造がよく似た薬剤間では交差過敏症を引き起こすことが penicillin 系薬剤や sulfa 剤などの例でよく知られている。そこで NY-198 と同じピリドンカルボン酸系合成抗菌剤に属し、既に市販されている pipemidic acid, norfloxacin および ofloxacin と NY-198 との間の免疫学的交差反応性を、抗 NY-198 抗体を用いた 4 時間 PCA により検討したところ、抗 NY-198 抗体は pipemidic acid, norfloxacin および ofloxacin のいずれの合成抗菌薬との間にも高い交差性が認められた。抗 NY-198 抗体の対応抗原である NY-198 の力価との比較で交差性の強さをみると pipemidic acid は NY-198 の 1/2~1/8, norfloxacin は 1/4~1/128, ofloxacin は 1/2~1/16 であり、3 種の類似薬のうちでは pipemidic acid が最も強く反応する傾向を示していた。この薬剤間の交差反応性は化学的に合成した NY-198-BSA を hapten carrier 系としてモルモットに免疫することにより得られた抗 NY-198 抗体を用いての成績である。ヒトにおいて抗 NY-198 抗体の産生が認められたとしても、その抗体の交差反応性は免疫グロブリンの種類、力価あるいは抗原に対する特異性などの点からモルモットでの成績と必ずしも一致した結果を示すものでないことは予想される。しかし、これらの抗菌薬は、共通した副作用として発疹などのアレルギー性反応を生ずることが報告されており、しかも交差反応性を有することなどを考慮すると、臨床においても、構造類似の抗菌剤に対して何らかのアレルギー反応を示す患者には NY-198 の投与は慎重に行なう必要があろう。

Cephalosporin 系薬剤では試験管内で健康人の赤血球の直接クームス反応を陽性化すること³⁾、そしてその陽性化の機序に関しては、これらの薬剤による赤血球膜の変性に起因することが報告されている¹³⁾。直接クームス反応を陽性化する最低濃度は、陽性対照である cephalothin Na 塩でおよそ 5 mg/ml であったのに対して、NY-198 では 5 mg/ml での直接クームス反応は全例が陰性となり、クームス陽性化作用は認められなかった。In vivo 実験において臨床適用量の 100~200 mg を経口投与した場合に最高血中濃度が NY-198 の水に対する溶解度の限界に近い 5 mg/ml の濃度に達することは考えにくい。したがって、NY-198 は in vivo においてもクーム

ス陽性化作用を示すことはないものと思われる。
試験期間：1985 年 5 月 23 日~1986 年 11 月 6 日

文 献

- 1) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一 : NY-198 の細菌学的評価—in vitro および in vivo 抗菌作用一。Chemotherapy 36 (S-2) : 99~111, 1988
- 2) OVARY, Z.; B. KAPLAN & S. KOJIMA : Characteristics of guinea pig IgE. Int. Archs Allergy and Appl. Immun. 51 : 416~428, 1976
- 3) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN : Positive direct Coombs tests due to cephalothin. New Engl. J. Med. 277 : 123~125, 1967
- 4) 中井健五翻訳総監修。Meyler's 医薬品の副作用大事典第 9 版 : 507~511, 西村書店, 1980
- 5) 松本文夫 : 合成抗菌剤。日本臨床・春季臨時増刊号, 43 : 204~209, 1985
- 6) 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 hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114 : 875~904, 1961
- 7) WEINER, L. M. ; M. ROSENBLATT & H. A. HOWES : The detection of humoral antibodies directed against salicylate in hypersensitive state. J. Immunol. 90 : 788~792, 1963
- 8) JUJR, T ; T. MATSUHASHI : Antibody production to low molecular drugs in experimental animals and man. Jap. J. Exp. Med. 39 : 21~34, 1969
- 9) 野村岳之, 渡辺満利, 河上喜之, 平田真理子, 鈴木修三, 柳田知司 : NY-198 のラットの 13 週間経口投与亜急性毒性試験。Chemotherapy 36 (S-2) : 343~370, 1988
- 10) 野村岳之, 渡辺満利, 中西秀樹, 鈴木修三, 平田真理子, 柳田知司 : NY-198 のサル 13 週間経口投与亜急性毒性試験。Chemotherapy 36 (S-2) : 371~390, 1988
- 11) 真下啓明 : 抗生物質の血清蛋白結合性。代謝 7 : 255~259, 1970
- 12) EIICHI, OKEZAKI ; TETSUYA, TERASAKI ; MASATO, NAKAMURA ; OSAMU, NAGATA ; HIDEO, KATO ; AKIRA, TSUJI : Structure-serum protein binding relationship of NY-198, a new antimicrobial agent and related pyridonecarboxylic acids. 投稿中
- 13) FERRONE, S. ; A. ZANELLA & M. SCALAMOGNA : Red cell metabolism in positive direct coombs test after cephalothin therapy. Experimentia 24 : 194~195, 1971

ANTIGENICITY TEST ON NY-198

HIROAKI NUMATA, HIROSHI AITAI, TOSHIHARU TSUDA and TOMOJI YANAGITA

Preclinical Research Laboratories, Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki

The antigenicity of NY-198 was examined in guinea pigs. Sensitization was evaluated by active systemic anaphylaxis (ASA), allogeneic 4-h and 8-day passive cutaneous anaphylaxis (PCA), passive hemagglutination test (HA) and double diffusion test. In addition, the effect of NY-198 in producing a direct Coombs' reaction was examined using human red blood cells.

In guinea pigs treated with NY-198 alone or NY-198 emulsified with Freund's complete adjuvant (FCA), ASA was not elicited by a challenge of NY-198 or NY-198-bovine albumin (BSA) conjugate. The sera obtained from these guinea pigs were shown by the above methods to contain no anti-NY-198 antibodies.

In the guinea pigs treated with NY-198-BSA conjugate emulsified with FCA, ASA was elicited by a challenge with NY-198-human albumin (HSA) conjugate but not by NY-198. Anti-NY-198 antibodies were detected in the serum of these animals.

The HSA-conjugates of pipemidic acid, norfloxacin and ofloxacin were positive in the 4-h PCA for anti-NY-198 antibodies, indicating that NY-198 cross-reacted with these structurally-related antibacterial agents.

NY-198 was not capable of producing a positive direct Coombs' reaction at concentration ranges from 0.15-5.0mg/ml.

These results suggest that NY-198 alone has no antigenicity in guinea pigs.