

## Cefaclor の抗原性に関する研究

山 田 静 雄

日本医科大学微生物学免疫学教室\*

(平成元年3月4日受付)

Cefaclor (CCL) の投与によって発症する副作用の原因を解析するために CCL の抗原性について検討し以下の結論が得られた。

薬剤単独または *ascaris suum extract* (Ase) coupling 薬剤をマウスまたはモルモットに Al(OH)<sub>3</sub> と共に感作し IgE type の抗体産生状態を測定した。その結果薬剤単独の免疫では2種の動物に抗体は産生されなかった。

Coupling 抗原に免疫では CCL に対する抗体は他の対照薬剤に比べ PCA 値が低いと共に CEX 以外には交差反応性を示さなかった。さらに、被働性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5例中5例がショック死したのに比べ CCL 感作群は2例が生存すると共に死亡例の生存時間は3倍以上延長された。

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

**Key words** : cefaclor, 副作用, 抗原性, モルモット

Cephalosporins および cephem 系抗生物質の使用頻度が年々増加するに伴い、それに比例して副作用の報告例が増加する傾向が認められる<sup>1)</sup>。

これらの薬剤の中で cefaclor (CCL, Fig. 1) は最も良く使用される薬剤の1つであるが、本剤もまた使用頻度由来すると考えられる副作用の報告が多くなされている<sup>1)</sup>。

抗生物質の投与によって生じる副作用は様々な臨床症状を呈することが多く、併用する薬剤を考慮すると原因薬剤を推測するのは困難な場合が多い。

特にアレルギー性副作用の場合には患者が抗生物質に副作用の既往歴が明確であって、他剤への過敏症状を推測できる場合は適切な対応ができるが、そうでない場合には患者自身に対して問診などを充分に行なったとしても患者が以前に投与された治療薬についての知識が不明瞭であり、したがって不確実な問診結果のまま抗生物質が投与され、副作用が出現するケースが多いのが現状であろう。

この様な現状の中で、近年開発されている cephem 系薬剤は特異な7位のアンシル側鎖を持つことによって、他剤との免疫学的交差反応性を示さないとされている<sup>2-4)</sup>。その結果、患者が持っている抗生物質に対する抗体は以前に投与された抗生物質によるものであり、そ

れが現在投与中の抗生物質と異なるならば反応を起こし難いはずである。

一般に最近の感染症は日和見感染原因菌等の多様化によって抗生物質の選択も次々と新しいものになってきている<sup>5)</sup>。その結果、cephem 系抗生物質の側鎖親和性抗体を生じるような特異性の高い抗生物質は現実には患者の体内では抗原抗体反応を起こす可能性は極めて少ないものと想像される。

一方、CCL 投与による副作用の発症はその使用頻度が高いがゆえに数値的に多いと考えたいが、本剤による副作用は上記に述べたように、近年開発された抗生物質の特異性についての報告からすると交差反応性が極めて低い薬剤が高頻度にアレルギーを発症せしめることに関しては多くの矛盾が生じることとなる。

そこで、著者はこの矛盾を解析するために CCL のアレルギー性副作用誘発に関する基礎的研究として、まず、CCL の抗原性について着目し、再検討することによって、得られた結果を原田ら<sup>6)</sup>の報告と比較し、アレルギー発症の可能性について推察することを目的とした。

## 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

\* 東京都文京区千駄木 1-1-5

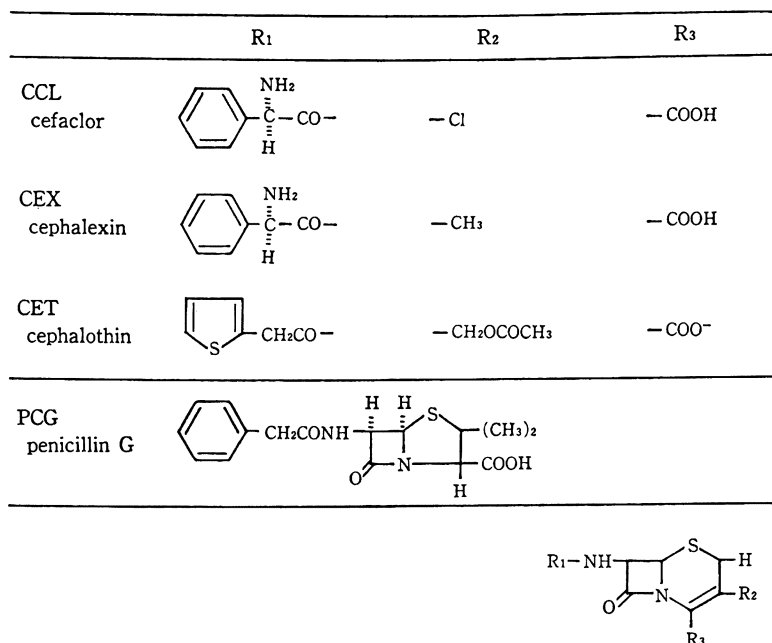


Fig. 1. Chemical structures of penicillin and cepheids

13 週齢の BALB/c 系雌性マウスを免疫および passive cutaneous anaphylaxis (PCA) の実験に使用した。

#### 2) 薬品

Cefaclor (CCL) は塩野義製薬社より分与された純品を使用した。Cephalothin (CET, WK 02) 塩野義製薬社製, benzylpenicillin (PCG, Lot GLD 60) 明治製薬社製 cephalexin (CEX) は Lot 86 F-0059, Sigma 社を使用した。Human serum albumin (HSA) は Kabi 社製 Lot 104 F を使用した。Human gamma globulin (HGG) は Miles Lab. Inc. 社製。Lot. 44 を使用した。

#### 3) 免疫と反応誘発抗原の作製<sup>9)</sup>

CCL 500 mg と ascaris suum extract (Ase) または HSA 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<sup>9)</sup> で除去した。えられた残留物を凍結乾燥し, それぞれを CCL-Ase, CCL-HSA, とした。同様の方法で PCG, CET, CEX を処理し, それぞれを BPO-Ase, BPO-HSA, CET-Ase, CET-HSA, CEX-Ase, CEX-HSA を作製した。Ase-coupling 抗原は免疫抗原用, HSA-coupling 抗原は抗体検出の反応用抗原として使用した。

#### 4) 免疫方法

Al(OH)<sub>3</sub>, 5 mg/Tris buffered saline, 1 ml に CCL-Ase 10 μg/1 ml (モルモット) または 1 μg/ml

(マウス) を混合し, それぞれ 1 群 10 匹のモルモットとマウスの腹腔内に注射した<sup>9,10)</sup>。マウスは 14 日後に booster を行ない, 初回感作 28 日後に全採血をした。モルモットは 4 週間に 1 回の間隔で計 4 回免疫し, 最終感作 10 日後に抗血清をえた<sup>11)</sup>。以上の対照として使用した PCG, CET, CEX の免疫も上記の方法に従って行なった。

また coupling 抗原の免疫とは別に, 薬剤単独 (マウス 100 μg/ml, モルモット 1,000 μg/ml) を Al(OH)<sub>3</sub>, 5 mg/ml, Tris buffered saline と共に同様の免疫スケジュールで腹腔内に感作し, 抗体産生の有無を測定した。

#### 5) 抗体価の測定

抗体価の測定は PCA テスト<sup>12)</sup>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 を皮内注射をした。IgE 抗体の測定は homologous PCA を行ない, 48 時間 (マウス) または 8 日 (モルモット) 後に反作用抗原 2 mg/1 ml と 1% Evans' blue 液, 0.5 ml を静脈注射した。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率として表に示した。

PCA inhibition test は PCA を行なう際, 20 分前に各濃度の抗体物質を静注し, 反応の inhibitor とした。常法に従い抗原誘発の結果, PCA 値の減弱の程度を

計測し, inhibition test とした。

6) 被働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<sup>13)</sup>

HSA-coupling 抗原+FCA でスケジュール通りに免疫され最終感作 10 日後のモルモットから採取した抗血清を正常なモルモットに被働性感作した。その際に抗体の力価は homologous な抗原抗体系の反応系で 400 PCA 値のものを使用した。8 日後に HSA-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

1) マウス, モルモットにおける抗体産生

方法に示したスケジュールおよび濃度で CCL と対照薬剤を感作し, 以下の結果が得られた。まず, マウスで

は薬剤単独および Ase-coupling 抗原を感作して得られた抗血清はラット 48 時間 PCA 反応で測定した (Table 1)。単独免疫群からの血清からは全例に抗体は検出されなかった。Ase-coupling 免疫群は PCG-Ase 10/10 例, CET-Ase 10/10 例, CET-Ase 6/10 例, CCL-Ase 5/10 例であり CCL-Ase 免疫群は抗体産生は最も低いと共に陽性例の平均抗体価は 10 倍であり本剤はマウスに対して感作原性の弱いことが観察された。一方, モルモットにおいてもマウスと同様の結果がえられた (Table 2)。薬剤単独免疫群では抗体は検出されず, Ase-coupling 抗原でのみ抗体が検出された。CCL の抗体産生陽性例中の平均抗体価は CEX と同程度 (400 倍) であった。

2) anti-CCL-Ase guinea pig antiserum の交差反応

Table 1. Antibiotic antibody production in mice

Immunogen	Positive cases tested animals	Antibody titer
PCG	0/10	0
CET	0/10	0
CEX	0/10	0
CCL	0/10	0
PCG-Ase	10/10	40
CET-Ase	10/10	40
CEX-Ase	6/10	20
CCL-Ase	5/10	10

PCA titers are expressed as the reciprocal of the means of the maximum diluted times showing a positive reaction of over 5 mm in 5 experiments.

Challenging antigen: HSA-coupling antibiotic 2 mg/ml

Table 2. Antibiotic antibody production in guinea pig  
(8 day PCA in guinea pigs)

Immunogen	Positive cases tested animals	Antibody titer
PCG	0/10	0
CET	0/10	0
CEX	0/10	0
CCL	0/10	0
PCG-Ase	10/10	1,600
CET-Ase	10/10	800
CEX-Ase	10/10	400
CCL-Ase	10/10	400

PCA titers are expressed as the reciprocal of the means of the maximum diluted times showing a positive reaction of over 5 mm in the experiments.

Challenging antigen: HSA-coupling antibiotic 2 mg/ml

Table 3. Antigenic cross-reactivity of anti-CCL-Ase guinea pig antibody among 4 antigens

Antibody	Challenging antigen			
	PCG-HSA (PCG)	CET-HSA (CET)	CEX-HSA (CEX)	CCL-HSA (CCL)
anti-PCG-Ase	800 (32)	200 (0)	10 (0)	10 (0)
anti-CET-Ase	200 (0)	200 (32)	10 (0)	10 (0)
anti-CEX-Ase	10 (0)	10 (0)	800 (32)	100 (2)
anti-CCL-Ase	10 (0)	10 (0)	100 (0)	200 (8)

PCA titers are expressed as the reciprocal of the means of the maximum diluted times showing a positive reaction of over 5 mm in the 5 experiments.

Challenging antigen: HSA-coupling antibiotic 2 mg/ml antibiotics alone 10 mg/ml, saline

Table 4. Antigenic cross-reactivity of anti-CCL-Ase antibody among 4 antigens (PCA inhibition test in guinea pig)

Antibody	Challenging antigen	Inhibitor (10 mg/ml)	Antibody titer
anti-CCL-Ase	CCL-HSA	PCG	800
		CET	800
		CEX	50
		CCL	10
		none	800
anti-CEX-Ase	CEX-HSA	PCG	200
		CET	200
		CEX	50
		CCL	50
		none	400

PCA titers are expressed as the reciprocal of the means of the maximum diluted times showing a positive reaction of over 5 mm in the 5 experiments.

#### 性について

各薬剤の抗血清に対する抗原特異性の検討は抗体力価の高いモルモットの抗血清を用いてモルモット 8 日間 PCA で測定した (Table 3)。

各抗血清は homologous な薬剤による誘発によって最も強く反応した。しかし PCG, CET 間と CEX, CCL 間では比較的強い交差反応性を示した。( ) 内の数字は薬剤単独 (10 mg/ml, saline) を誘発抗原とした場合の PCA 価である。その結果は HSA-coupling 抗原での誘発結果よりもさらに抗原特異的の反応を示し、抗 CEX 抗体に対して CCL-HSA が 2 倍の反応を示した以外は交差反応は認められなかった。

次にこの抗原特異的の反応を再検討するために PCA

inhibition test を行なった。Table 4 には CCL 抗体と対照とした CEX 抗体について示した。HSA-coupling 抗体を静注する 20 分前に inhibitor として表に示した薬剤各 10 mg/ml を静注して PCA の抑制の強さを測定した。その結果、抗 CCL, CEX 血清共に PCG, CET では抑制されず、それぞれ CCL, CEX による inhibition で強い抑制が認められた。抗 CCL 抗体は inhibitor で処置されない対照が 800 倍であるのに対し 10 倍に、抗 CEX 抗体は 400 倍であるのが 50 倍の減少した。表には示さなかったが抗 CEX 抗体に対して CEX は静注する濃度を 25 mg/ml とする PCA 価は 10 倍となった。この PCA 抑制結果から 2 種の抗体はそれぞれ抗原特異抗体であることが示されたと共に CEX と

Table 5. Test of anaphylactic shock in guinea pigs

Sensitized antibody	anti-PCG	anti-CEX	anti-CCL	Control
Challenging antigen	PCG-HSA	CEX-HSA	CCL-HSA	CCL-HSA
No. of tested animals	5	5	5	5
Positive number	5	2	3	0
Time of death	3-5 min	3-20 min	15-30 min	survived

Guinea pigs were passively sensitized with anti-antibiotic antibody. Eight days later challenging antigen was administered intravenously.

CCL 共通抗原部分にも特異的に反応することが示された。

### 3) CCL 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

方法に示したモルモットを用いて 2% HSA-coupling 抗原を誘発抗原として静注し、ショックの出現を観察した。その結果 (Table 5) PCG の実験系では 5 例中 5 例が 5 分以内に死亡したが CEX, CCL は 2 例または 3 例が死亡したのみであった。生存したモルモットは軽度の立毛や不安症状をしめしたが最終的には 24 時間以上生存した。

### III. 考 察

I 型アレルギーに関与する抗体が homocytotropic な IgE または IgG<sub>4</sub> であることは良く知られた事実である。これらの抗体の特異性を検討するための動物実験モデルは PCA 反応が使用されることが多い。モルモットでは IgE または IgG<sub>1</sub> class の抗体がそれに相当するが、これらの抗体は Freund's complete adjuvant および Al (OH)<sub>3</sub> と共に動物に感作し、作製されるのが常法である。

一般に抗生物質のような低分子化学物質を免疫抗原とする場合には薬剤は担体蛋白との結合物として免疫される。その結果産生された特異的抗体は薬剤のどの構造部位を major antigenic determinant としているかは薬剤によって異なるとされている。同一薬剤の免疫で産生された抗体の class が異なる場合には 2 種以上の抗体が抗原を認識する部位に相違があるか否かについて比較検討された報告はないようである。しかしながら論文的には LEVINE B B 報告で代表される<sup>14,15)</sup>ように major antigenic theory で示された母核部分に対する高い親和性は主として IgG class の抗体で測定されたものであり、一方、近年 cephalosporin 系抗生物質の研究で報告されているように側鎖部分に強い親和性を示す<sup>16,17)</sup>抗体は IgE class での結果を表わしたものである。これらの報告は

同一抗原によっても量または感作方法が異なると認識部位も異なることを示している。その結果、抗原性に関する検討は多種類の抗体 class を用いて測定することが基本となるであろう。

いずれにしても、今回の実験では CCL による副作用のうち、ヒトの I 型アレルギー反応を誘発する可能性を検討することを目的としたので、IgG class の抗体産生および薬剤間の交差反応性については敢えて検討しなかった。原田ら<sup>6)</sup>は CCL の抗原性についてすでに広範囲でかつ詳細な報告をしている。今回の実験はその追試を目的としたが結論的には原田らの報告に類似し、抗原性は弱く、かつ他剤との交差性の低い特異的な薬剤であることが再確認された。さらに CCL 抗体は R1 および R2 側鎖の類似性によって CEX または ABPC と交差性を示すことを報告している<sup>6)</sup>。今回の実験では ABPC を対照薬剤として使用しなかったが ABPC と類似構造を持つ PCG を使用した。しかしながら CCL 抗体は PCG とは反応しなかった。CCL または ABPC と PCG の化学構造的相違 (Fig. 1) は R1 側鎖では NH<sub>2</sub> と CH<sub>2</sub> の違いであるので NH<sub>2</sub> を持たない PCG との無反応は CCL 抗体が NH<sub>2</sub> を強く認識した抗体であることが推測された。しかもこの認識範囲は NH<sub>2</sub> を含む側鎖全体に及ぶことが CEX との交差反応性 (Table 4) から示唆された。同力価の抗体で被働性感作されたモルモットを用いた anaphylactic shock の誘発実験については PCG, CEX, CCL 間に死亡例数および時間に差が認められた。PCG 群に比し CEX, CCL によるショック死亡例は約 50% に減少していた。モルモットの抗血清 (homologous な抗原抗体系で 400 倍 PCA 値) を静注することによって生じるショック準備状態は同程度であるので誘発されたショックの強弱は薬剤の特異性に起因するものであろう。

著者は予備的な実験として抗原誘発 10 分後に血液を採取し、血中ヒスタミン量を測定した。その結果 PCG

によるショック時のヒスタミンは平常時 37.4 ng/ml が 455 ng/ml に増量するのに比べ、特に CCL では増量 (42 ng から 43 ng) は僅かであり、これが死亡例数が少ない原因であろうと考えられた。しかしながら IgE 抗体-CCL の反応によって当然起こるべきヒスタミン遊離が減少傾向を示すことについては免疫学的な矛盾であるにもかかわらずその後回かの再試によってもこの傾向は同じであった。この現象についてまだ化学的証明はできていないのでその詳細は統報に報告するが、CCL 自身はヒスタミン測定によってヒスタミン類似の蛍光を発することが実験的に確かめられているので *o*-phthalaldehyde と何らかの化学反応をおこすかまたはヒスタミン類似構造物となり、histamine feedback mechanism<sup>18)</sup> によって肥満細胞等からのヒスタミン遊離を抑制するのかもしれない。この現象が事実であるとする CCL が抗原となって生じるアレルギー性副作用はかえって本剤によってヒスタミンなどの chemical mediator の遊離が抑制され炎症の増悪を防止する可能性も推論される。

したがって、この点からもアレルギー症状が出現しにくい薬剤であることが示唆され、HAMA 系<sup>19)</sup>の高頻度の副作用報告には疑問を呈するものである。

以上の結果から CCL は免疫学的検討によって副作用出現の危険性の低い薬剤であることが再確認された。

#### 文 献

- 1) 医薬品副作用モニター報告の概要 (昭和 61—昭和 63 年): 厚生省薬務局
- 2) BATCHELOR F R, DEWDNEY J M, WESTON R D, WHEELER A W: The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 10: 21~33, 1966
- 3) 竹内良夫, 木村義民, 西村葉子, 八木和郎, 吉河達祐, 石井洋二: T-1982 の抗原性に関する免疫学的研究. *Chemotherapy* 30: 206~211, 1982
- 4) MINE Y, NISHIDA M: Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. IV. Antigenicity of cefazolin and its cross-reactivity with benzylpenicillin, ampicillin and cephaloridine. *J. Antibiotics* 3: 195~203, 1970
- 5) 中谷林太郎編: 最近の感染症 医学のあゆみ. 111: 1046~1055 頁, 医歯薬出版, 1979
- 6) 原田 稔, 竹内三津男, 松本光史, 小池昌子, 江幡光雄: cefaclor の免疫学的特性, *Chemotherapy* 27: 755~763, 1979
- 7) LEVIN B B, OVARY Z: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. The N(D- $\alpha$ -benzylpenicillyl) group as antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med* 114: 873~903, 1961
- 8) ZEINCH R A, PILLARY V K G, SMITH E C, BARA E, FIORELLA B J, DUNEA G: Thin-layer microtubular continuous flow countercurrent dialysis. *J Lab. Clin. Med.* 79: 648~656, 1972
- 9) MANCINO D, 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
- 10) DANAN A P, BINAGHI R A, BADIE A: Effect of heating at 56°C on mouse IgE antibody. *Immunochemistry* 14: 81~84, 1977
- 11) MARGNI R A, HAJIS E S: Guinea pig reaginic antibody II. Physicochemical and biological properties. *Immunology* 25: 333~338, 1973
- 12) OVARY Z: Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen interaction. *Prog. Allergy* 5: 459~508, 1964
- 13) MURPHEY S M, BROWN S, MIKLOS N, FIRMAN P: Reagin synthesis in inbred strains of rats. *Immunology* 27: 254~258, 1974
- 14) LEVINE B B: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. I. Delayed allergic cross-reaction among penicillin G and its degradation products. *J. Exp. Med.* 112: 1131~1159, 1960
- 15) 堀内淑彦: ペニシリンアレルギーにおける交差反応. *日本臨床* 32: 411~420, 1974
- 16) BATCHELOR F R, DEWDNEY J M, WESTON R D, WHEELER A W: The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 10: 21~33, 1966
- 17) MURANAKA M, TADOKORO K, HIRAI K, KOTZUMI K, FUKUDA S, SUZUKI S: IgE antibodies produced in mice instrumental in analysis of antigenicity of cephalothin preparation. *Int. Archs. Allergy. Apl. Immunol.* 63: 295~283, 1980
- 18) BLACK J W, DUNCAN W A M, DURANT C J: Definition and antagonism of H<sub>2</sub> receptors. *Nature (London)*, 236: 385~393, 1972
- 19) HAMA R, MORI K: High incidence of anaphylactic reactions to cefaclor. *The Lancet*, June 11: 1331, 1988

## ANTIGENICITY AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CEFACLOR

SHIZUO YAMADA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, 1-1-5  
Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

We carried out this study to clarify the immunological characteristics of cefaclor (CCL). We also performed experiments on the immunogenic reactivity to cephalixin (CEX) and benzylpenicillin (PCG). The results obtained were as follows.

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

The highest antibody titers were observed in the sera of guinea pigs immunized with CCL-Ase with  $Al(OH)_3$ . No antigenic cross-reactivity to anti PCG-Ase antibody was observed. Also, no antibody formation was detected in mice and guinea pigs sensitized with CCL alone or  $Al(OH)_3$ .

In guinea pigs sensitized with CCL-Ase, no signs of anaphylactic shock were observed.

From these results, we propose that CCL in experimental animals has weak antigenic potency as compared with PCG and CEX.