

Cephem 系抗生物質の交叉反応性に関する研究

栗山 純一・竹内 良夫・本間 義春

川 角 浩・西村 葉子・横室 公三

日本医科大学微生物学免疫学教室*

(平成2年4月14日受付・平成2年6月20日受理)

Cephem 系抗生物質の免疫学的研究において、それに対する抗体は実験動物においては薬剤構造に特異的な反応を示すが、ヒトにおいては他剤と免疫学的交叉反応性を示すことが知られている。この矛盾を解析し、以下の結論が得られた。

1) 10種類の cephem-Ase coupling 抗原+alum 混合液を用いてモルモットを免疫し、IgE 抗体 rich な抗血清を得た。これらの抗血清は IgE-mediated PCA で400倍以上で、他剤とは交叉反応を示さない薬剤特異的な性状を示した。

2) 同じ抗血清を用いて IgG-mediated PCA で IgG 抗体の検出をしたが、それらは低力価であるにもかかわらず、類似構造を有する薬剤との交叉反応性は高かった。

以上の結果から IgE 抗体の産生に伴って生じる IgG 抗体が薬剤の免疫学的交叉反応の一因子になる可能性が推測された。

Key words : Cephems, 交叉反応, IgE, IgG, モルモット

Cephem 系抗生物質は、penicillin 系抗生物質とともに宿主に障害を与えることなく細菌細胞壁を破壊するために、選択毒性が他の薬剤より優れていることからその研究開発がめざましく、したがって日常診療において欠くべからざる存在になっている^{1,2)}。

しかし、一方では使用頻度の増加に伴い、副作用の報告も増加傾向を示しているのが現状であり³⁾、その一因として抗生物質の交叉反応性の拡大が考えられている。

交叉反応性拡大の発現機序について、一般には、penicillin 系抗生物質では benzylpenicilloyl 結合を主とした major antigenic determinant⁴⁾が、また cephem 系抗生物質ではその側鎖構造を特異的に認識する抗体(側鎖特異抗体)の共通性が要因を成すとされている⁵⁾。

しかし実験モデルとして両者を比較すると benzylpenicilloyl 結合物はすでに報告されたものの多くは主として IgG class の抗生物質抗体を用いて検討され⁶⁾、また側鎖特異抗体は IgE type の抗体を用いてその特異性を検討したものが多し。

Ishizaka の報告⁷⁾にもあるように、ヒトが抗原で感作されると産生される抗体は IgG と IgE の両 class が並行して産生されることが知られている。すなわち、同一の免疫方法によって薬剤を免疫しても IgG, IgE 各々の抗体が同時に並行して産生されるが、cephem 系抗生物質においてこの

問題を検討した報告は見出せなかった。

著者らは、薬剤とアルミナゲルとを混和して免疫し、得られた抗血清の IgG 抗体および IgE 抗体を解析することにより、これらの抗体が薬剤アレルギー発症に関与する際にそれぞれ異なった動態を示す可能性について検討した。

I. 材料および方法

1) 動物

体重 250 g 前後の Hartley 系雌性モルモットを免疫と passive cutaneous anaphylaxis (PCA) に使用した。

2) 薬品

Cefazolin (CEZ), SIGMA 社, cefaclor (CCL), 塩野義製薬社, cephalothin (CET), 塩野義製薬社, cephalixin (CEX), SIGMA 社, cefotiam (CTM), 武田薬品工業社, cefmenoxime (CMX), 武田薬品工業社, ceftazidime (CAZ), 日本グラクソ社, latamoxef (LMOX), 塩野義製薬社製, cefmetazole (CMZ), 三共社, benzylpenicillin (PCG), 万有製薬社を使用した。以上の薬品の構造式を Fig. 1 に示した。

3) 免疫抗原および反応誘発用抗原の作製

免疫に用いる各薬剤 500 mg を *Ascaris suum* extract (Ase)⁸⁾または Human serum albumin (HSA) 100 mg とともに pH 8.5 の phosphate buffered saline

*東京都文京区千駄木 1-1-5

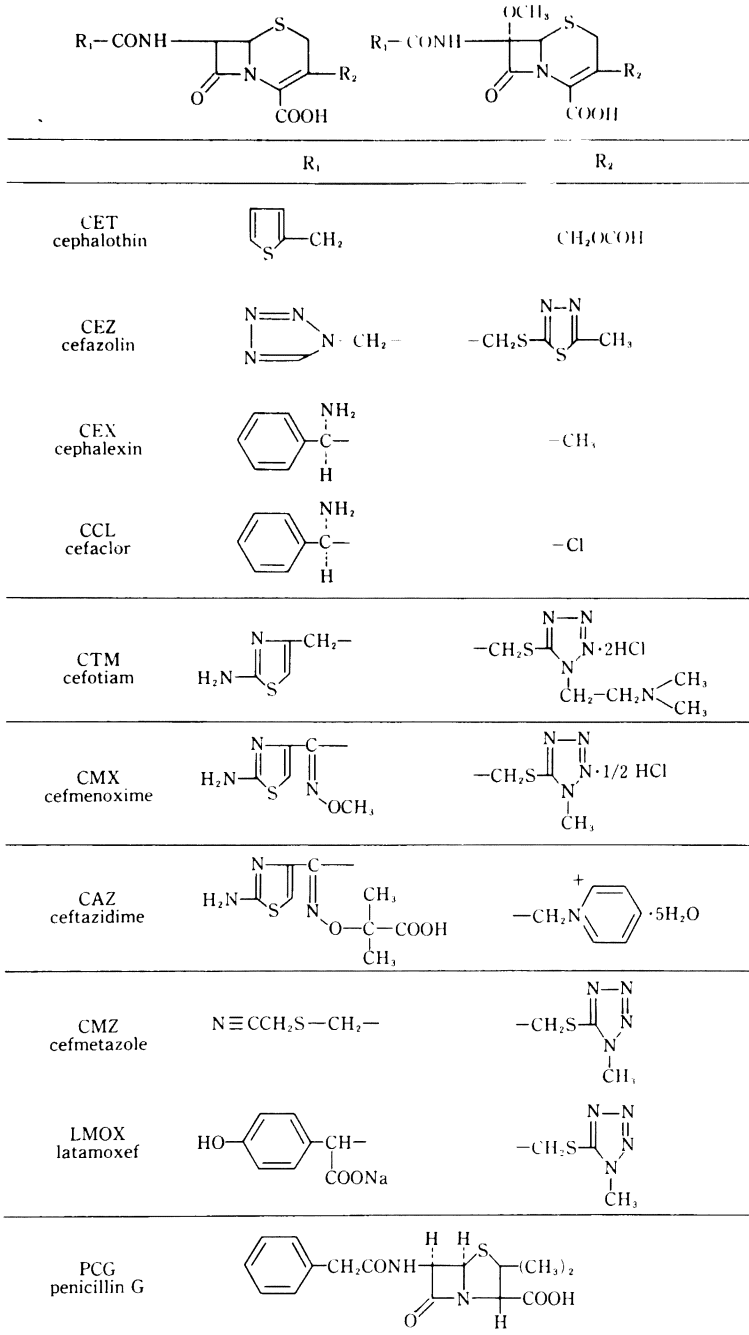


Fig. 1. Chemical structures of penicillin and cephem

20 ml に溶解, 37°C, 2 時間 incubate した後, 遊離薬剤を連続向流透析器を用いて 2 時間透析し, 除去した⁹⁾。

得られた残留物を凍結乾燥させ, 免疫用には Ase-coupling 抗原を, また抗体検出の反応誘発用として HSA-coupling 抗原を使用した (Fig. 2)。

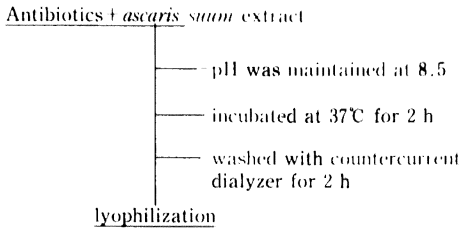


Fig. 2. Preparation of immunogen

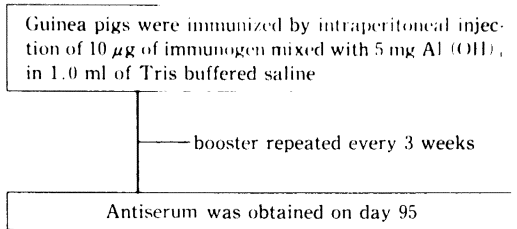


Fig. 3. Process of immunization

4) 免疫方法

水酸化アルミニウムゲル¹⁰⁾ (和光純薬社) を Tris-buffered saline に溶解して 5 mg/ml とし、この溶液に各抗生物質の Ase-coupling 抗原を 10 µg/ml の割合で混和し、その 1 ml をモルモット腹腔内に注射した。以後 3 週間に 1 回の割合で booster を行い、最終免疫の 10 日後に全採血して抗血清を得た (Fig. 3)。

薬剤単独の免疫には薬剤 100 µg と Al (OH)₃ 5 mg/ml を混和後、同様のスケジュールで免疫を行った。

5) 抗血清の加熱処理¹¹⁾

原血清を 56°C の water bath で 2 時間 incubate した後、段階希釈し、その 0.1 ml をモルモットの皮内に注射し、3 時間 PCA 反応を行った。

6) 抗体価の測定

抗体価の測定には PCA 反応を用いた¹²⁾。すなわち、剃毛したモルモットの背部皮内に抗血清の段階希釈液各 0.1 ml を注射し、IgG class 抗体検出では 3 時間後、IgE type 抗体検出では 8 日後に 2 mg/ml の各反応誘発抗原 1 ml と 1% Evans blue 液 0.5 ml の混合液を静脈内に注射した。静注 30 分後に屠殺し、剥離した皮膚の色素の漏出状態 (青色斑) が、直径 5 mm 以上をもって PCA 反応陽性とし、希釈倍数の逆数によって示した。

1 実験につき 5 匹の動物を使用し、抗体価は各 PCA 値の最頻値をもって表示した。

II. 実験結果

1) 薬剤単独による抗体産生

既述の免疫スケジュールに基づき、薬剤単独を感作し

て得られた抗血清について、IgE type および IgG class の抗体の検討をモルモットを用いた 8 日間 PCA (8 day PCA)、3 時間 PCA (3 h PCA) により測定した。

3 h PCA では CEX, CCL, CEZ, CTM, CMX, CAZ, LMOX, CMZ, PCG で抗体は検出されなかったが、CET では 5 例中 1 例に PCA 値 10 の抗体が検出された (Table 1)、また 8-day PCA では全例に抗体の検出は認められなかった (Table 2)。

2) Ase coupling 抗原による抗体産生

Ase coupling 抗原を用いた免疫によって得られた抗血清では、すべての抗原抗体系において 3 h PCA, 8 day PCA の両者に抗体産生が認められた (Tables 3, 4)。

免疫に用いた薬剤と同一の homologous な反応用抗原で challenge すると、8-day PCA では CET-Ase, CMZ-Ase, PCG-Ase で 800, CEX-Ase, CCL-Ase, CTM-Ase, CMX-Ase, CAZ-Ase で 400, CEZ-Ase, LMOX-Ase で 200 であった。

また 3 h PCA では CET-Ase, CEZ-Ase の 40 を最高に、CEX-Ase, CCL-Ase, CMX-Ase, CMZ-Ase, PCG-Ase で 20, CTM-Ase, CAZ-Ase, LMOX-Ase で 10 といずれも 8-day PCA に比して低いが、同一抗原を IgE 抗体産生に適した方法で免疫しても IgG class の抗体が産生されることが再確認された。

3) Anti-cephem-Ase-coupling 抗体の交叉反応性

200-800 倍の PCA 値を有する抗血清を用いて各薬剤間の交叉反応性の検討をした。

8-day PCA により IgE type の交叉反応性を測定すると、抗 CMX-Ase は CMZ-HSA と交叉 (100 倍) した他は各薬剤間の交叉性は、検出限界 (50 倍 PCA 値) かそれ以下であった (Table 5)。

さらに IgG class に関しても同様の手法によって検討した (Table 6)。

各薬剤とそれに対応する抗血清との反応の値は最高 40 倍であるにもかかわらず、CET 抗体、CEX 抗体は 5 薬剤に 10 倍または 20 倍 PCA 値の交叉性を示し、抗 CEZ 抗体は 4 薬剤、他は 3 薬剤に 10 倍 PCA 値で交叉性を示した。これは Table 5 の結果とは明らかに異なるものであった。

なお、50 倍希釈液以下の抗血清を皮内注射し、誘発用抗原を静注すると、感作抗体量が強すぎて局所反応は全身反応におよび、全身性のアナフィラキシーを生じるので、8-day PCA には 50 倍希釈以上の希釈液を用いて PCA 反応を行った。

Table 1. Antibody formation by 10 antigens in guinea pigs (3h PCA)

Immunogen	Positive cases / Total number**	PCA titers*
CEX	0 / 5	<10
CCL	0 / 5	<10
CET	1 / 5	10
CEZ	0 / 5	<10
CTM	0 / 5	<10
CMX	0 / 5	<10
CAZ	0 / 5	<10
LMOX	0 / 5	<10
CMZ	0 / 5	<10
PCG	0 / 5	<10

* Arithmetic means of individual titers expressed as the reciprocal of the highest serum dilution giving a positive reaction.

** Challenged with 2 mg HSA coupled antibiotics.

CEX: cephalixin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam, CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole, PCG: benzylpenicillin

Table 2. Antibody formation by 10 antigens in guinea pigs (8 day PCA)

Immunogen	Positive cases / Total number**	PCA titers*
CEX	0 / 5	<10
CCL	0 / 5	<10
CET	0 / 5	<10
CEZ	0 / 5	<10
CTM	0 / 5	<10
CMX	0 / 5	<10
CAZ	0 / 5	<10
LMOX	0 / 5	<10
CMZ	0 / 5	<10
PCG	0 / 5	<10

* Arithmetic means of individual titers expressed as the reciprocal of the highest serum dilution giving a positive reaction.

** Challenged with 2 mg HSA-coupled antibiotics.

CEX: cephalixin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam, CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole, PCG: benzylpenicillin

III. 考 察

実験動物において cephem 系抗生物質間の免疫学的交叉反応性に関しては、7 位側鎖の類似性に由来すること^{13,14)}が提唱されて以来、本説にもとづく説明が加

えられてきている。

しかし実際の臨床では、本来ならば交叉反応を来さないと考えられている薬剤間で、交叉反応にもとづくと考えられる副作用症例に遭遇することが多々ある。

Table 3. Antibody formation by 10 antigens in guinea pigs (3h PCA)

Immunogen	Challenged with**	Positive cases / Total number	PCA titers*
CEX Ase	CEX HSA	5 / 5	20
CCL Ase	CCL HSA	5 / 5	20
CET Ase	CET HSA	5 / 5	40
CEZ Ase	CEZ HSA	5 / 5	40
CTM Ase	CTM HSA	5 / 5	10
CMX Ase	CMX HSA	5 / 5	20
CAZ Ase	CAZ HSA	5 / 5	10
LMOX Ase	LMOX HSA	5 / 5	10
CMZ Ase	CMZ HSA	5 / 5	20
PCG Ase	PCG HSA	5 / 5	20

* Arithmetic means of individual titers expressed as the reciprocal of highest serum dilution giving a positive reaction.

** Challenged with 2 mg HSA coupled antibiotics.

CEX: cephalixin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam,

CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole,

PCG: benzylpenicillin

Table 4. Antibody formation by 10 antigens in guinea pigs (8-day PCA)

Immunogen	Challenged with**	Positive cases / Total number	PCA titers*
CEX Ase	CEX HSA	5 / 5	400
CCL Ase	CCL HSA	5 / 5	400
CET Ase	CET HSA	5 / 5	800
CEZ Ase	CEZ HSA	5 / 5	200
CTM Ase	CTM HSA	5 / 5	400
CMX Ase	CMX HSA	5 / 5	400
CAZ Ase	CAZ HSA	5 / 5	400
LMOX Ase	LMOX HSA	5 / 5	200
CMZ Ase	CMZ HSA	5 / 5	800
PCG Ase	PCG HSA	5 / 5	800

* Arithmetic means of individual titers expressed as the reciprocal of highest serum dilution giving a positive reaction.

** Challenged with 2 mg HSA-coupled antibiotics.

CEX: cephalixin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam,

CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole,

PCG: benzylpenicillin

すなわち、免疫学的な観点からすると、実験動物での結果と、臨床上的事実では薬剤特異性の点で相違があることが推測される。

そこで著者らは、I型アレルギーの発症に関与する

IgE type の抗体と共存する IgG class の抗体に注目し、薬剤特異抗体とその交叉反応の拡大との関連を解析するために実験を行った。

今回の実験では製剤単独の免疫では抗体が産生され

Table 5. Antigenic cross reactivity among 10 antigens (8 day PCA in guinea pigs)

Immunogen	Challenged antigen (HSA coupling antigen)									
	CEZ	CCL	CET	CEX	CTM	CMX	CAZ	LMOX	CMZ	PCG
CEZ-Ase	200	<50	50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
CCL-Ase	<50	400	<50	50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
CET-Ase	50	<50	800	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
CEX-Ase	<50	50	<50	400	<50	<50	<50	<50	<50	<50
CTM-Ase	<50	<50	<50	<50	400	50	<50	<50	<50	<50
CMX-Ase	<50	<50	<50	<50	<50	400	<50	<50	100	<50
CAZ-Ase	<50	<50	<50	<50	<50	<50	400	<50	<50	<50
LMOX-Ase	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	200	<50	<50
CMZ-Ase	<50	<50	50	<50	<50	50	<50	<50	800	<50
PCG-Ase	<50	<50	50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	800

HSA: Human serum albumin

Ase: *ascaris suum* extract

CEZ: cefazolin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEX: cephalixin, CTM: cefotiam,

CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole, PCG: benzylpenicillin

Table 6. Antigenic cross reactivity among 10 antigens (3h PCA in guinea pigs)

Immunogen*	Challenged antigen (HSA coupling antigen)									
	CEZ	CCL	CET	CEX	CTM	CMX	CAZ	LMOX	CMZ	PCG
CEZ-Ase	40	<10	20	10	<10	<10	<10	<10	<10	10
CCL-Ase	<10	20	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
CET-Ase	10	10	40	10	<10	<10	<10	<10	<10	20
CEX-Ase	10	10	10	20	<10	<10	<10	<10	<10	10
CTM-Ase	<10	<10	<10	<10	10	<10	10	<10	<10	<10
CMX-Ase	<10	10	<10	<10	10	20	<10	<10	<10	<10
CAZ-Ase	<10	<10	<10	<10	10	10	10	<10	<10	<10
LMOX-Ase	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10
CMZ-Ase	<10	<10	<10	<10	10	10	<10	<10	20	<10
PCG-Ase	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20

HSA: Human serum albumin

Ase: *ascaris suum* extract

* Antisera were incubated in water bath at 56°C for 2 h.

CEZ: cefazolin, CCL: cefaclor, CET: cephalothin, CEX: cephalixin, CTM: cefotiam,

CMX: cefmenoxime, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, CMZ: cefmetazole, PCG: benzylpenicillin

なかったため (Tables 1, 2), Ase-coupling した抗生物質を Al(OH)₃ と共に免疫し, 得られた抗体で検討した。

免疫方法は IgE-rich な抗体産生を促すために開発された方法であるため, Table 3 と Table 4 を比較す

ると, IgE 値が IgG 値に比べ 10 倍以上高いのは当然であるが, 同時に IgG class の抗体を産生することが再確認された。

IgE type の抗体では CMX-CTM 間, CEX-CCL 間の交叉反応性が認められたが, これらは 7 位側鎖 (R₁)

の類似性にもとづくと考えられ、また CMX、CMZ 間の交叉反応性は 3 位側鎖 (R_3) の類似性による可能性が示唆された (Table 5, Fig. 1)。

抗血清中に混在する IgG class の抗体では、その交叉反応性は拡大した (Table 6)。結果の項で述べたように、抗 cephem 抗体は最低 (CTM) で 2 薬剤、最高 (CET, CEX) で 5 薬剤と交叉した。

柴田ら¹⁰⁾によれば PCG、CET 間の交叉反応はベンゼンとチオフェンの芳香性構造の相似によるためであり、竹内ら¹⁰⁾も CET 分子の重合化率が他の薬剤よりも高いことから CET 分子の安定性が低いことを示唆している。

今回の実験結果もこれら CET 分子の特殊性にもとづくと考えられる。また、CTM、CMX、CAZ はいずれも R_2 側鎖が類似しており、特に CTM、CMX は R_2 側鎖にも類似構造を有している。

さらに CTM、CMX、CMZ はいずれも R_2 側鎖に類似構造を有しており、CTM、CMX と CMZ との間で交叉反応性が確認された。

しかし、同様に R_2 側鎖に類似構造を有するがセファロスポリン母核 1 位の S が O に置換されている LMOX では、いずれの薬剤とも交叉反応を認めなかった。

これら薬剤間の交叉反応性は IgE type の抗体で低い、IgG class の抗体ではきわめて顕著な交叉反応性の拡大として確認された。

Cephem 系薬剤と同じ β -lactam 系抗生物質である penicillin 系薬剤では IgG class の抗体は母核構造を中心として側鎖構造の部分まで認識することがすでに報告されている¹⁷⁾。今回の結果から、著者らは cephem 系薬剤においても penicillin 系薬剤と同様に IgG class の抗体は母核構造をも含めた広い反応性を有することにより、交叉反応性の拡大を来す可能性が強いと推論した。

また、LMOX の母核構造が他の cephem 系薬剤の母核構造と立体構造が異なっていることは容易に推測され、この高次構造の相異のために類似の母核構造と認識せず、交叉反応がおこらなかったと考えられる。

以上の結果から、IgE type の抗体産生に伴って生じた、薬剤に特異な IgG class の抗体は、抗原として薬剤が体内に投与されると、IgE type の抗体は側鎖特異な反応を呈するのに対し、側鎖構造に加えてより広く母核構造部分をも含めて認識することが確認され、これが臨床における抗生物質の交叉反応性の拡大の一因となる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 貞土啓明: 化学療法最近の進歩。医学のあゆみ 111: 1046~1055, 1979
- 2) 藤井良知: 化学療法剤開発の動向。日本臨床 44: 805~813, 1986
- 3) 医薬品副作用モニターの概要 (昭和 61 - 昭和 63 年): 厚生省薬務局
- 4) Levine B B, Ovary Z: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen III, The N (D α benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med 114: 875~904, 1961
- 5) Muranaka M, Tadokoro K, Hirai K, Koizumi K, Fukuba S, Suzuki S: IgE antibodies produced in mice instrumental in analysis of antigenicity of cephalothin preparation. Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 63: 275~283, 1980
- 6) Batchelor F R, Dewdney J M: Some aspects of penicillin allergy. Proc. R. Soc. Med. 61: 897~899, 1968
- 7) Isizaka K: Cellular events in the IgE antibody response. Adv. Immunol. 24: 1~75, 1976
- 8) Strejan G H, Rabheru K, White R, Surlan D: Reaginic antibody production to *Ascaris suum* allergen, ASC-1. II Influence of type of adjuvant and of carrier priming on the induction of IgE and IgG antibodies to dinitrophenyl conjugates. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 54: 502~516, 1977
- 9) Zeineh R A, pillay V K G, Smith E C, Mbawa E, Fiorella B J, Dunea G: Thinlayer microtubular continuous-flow counter-current dialysis. J. Lab. Clin. Med. 79: 648~656, 1972
- 10) Levine B B, Vaz N M: Effect of combination of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 39: 156~171, 1970
- 11) Levine B B, Chang H, Vaz N M: The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. J. Immun. 106: 29~33, 1971
- 12) Ovary Z: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Progr. Allergy 5: 459~499, 1958
- 13) 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
- 14) Mine Y, Nishida M, Goto S, Kuwahara S: 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

- 15) 柴田皓示, 渥美 剛, 西田 聖, 木下与四郎, 堀内 淑彦: Cephalothin の抗原性, 特に Benzylpenicillin との交叉性について。アレルギー 16: 108~112, 1967
- 16) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民, 石井洋二, 林 宣之: Cephalosporin 水溶液に対するノットの免疫応答。臨床免疫 14: 653~660, 1982
- 17) 峯 増弘: セファロスポリン C 抗生物質の免疫学的研究。特に cefazolin の免疫学的特性について。アレルギー 20: 798~808, 1971

FUNDAMENTAL STUDY ON THE IMMUNOLOGICAL CROSS REACTIVITY OF β -LACTAM ANTIBIOTICS

Jun-Ichi Kuriyama, Yoshio Takeuchi, Yoko Nishimura, Yosiharu Homma,
Kho Kawasumi and Kozo Yokomuro

Dept. of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Immunological studies of cephems, it has been known that these drugs produce only the structure specific antibodies in experimental animals, although in man the anti-cephem antibodies respond not only to its homologous structure but also to the other similar structures. The purpose of the present investigation is to clarify these discrepancy of the reaction of antibodies between homologous and heterologous cephems. The results were as follows. Anti-cephem IgE antibodies were obtained from guinea pigs immunized with ten kinds of Ase-coupled cephems mixed with $Al(OH)_3$. The antibodies were compared with immunological cross-reactivity to each other. IgE antibodies demonstrated that they reacted with only homologous structured cephems. On the other hand, detected anticcephem IgG antibodies in IgE rich serum reacted not only with homologous structured cephems but also with the others. These results suggest that IgE antibodies had high affinity to the side chain of cephems and IgG antibodies recognized not only the side chain but also its nuclear structure, and immunological cross-reactivity of anti-cephem antibodies depended on the IgG antibodies contained in IgE rich antiserum.