

Cephalosporin 系抗生物質の血小板機能におよぼす影響

本間 茂春・竹内 良夫・川角 浩

西村 葉子・栗山 純一・横室 公三

日本医科大学微生物学免疫学教室*

(平成2年5月7日受付・平成2年8月3日受理)

Cephalosporin (cephem) 系抗生物質が誘発するアレルギー症状について、その機作を解析する目的で10種類のcephemに対するIgE抗体を作製して好塩基球と血小板に対する反応を比較した。

1. Cephem系抗生物質に対するIgE抗体で全身性に感作されたモルモットにcefaclor (CCL)-HSA, cephalixin (CEX)-HSA, cefmetazole (CMZ)-HSAをchallengeした場合、モルモットの血中histamine値は変化が認められないにもかかわらず、ショック死した。一方、対照の抗penicillin G (PCG)抗体の反応系では有意に上昇し、ショック死した。

2. *In vitro*において、IgE抗体で被動性に感作された好塩基球はcephem系抗原の添加によってhistamine遊離が観察された。

3. この結果の矛盾を解析するために血小板からのhistamine量を測定したが上記3薬剤はhistamine、およびserotoninの遊離を抑制することが観察された。

以上の結果から、CCLとCEXの抗原抗体系による反応はショックの発現にhistamineは主たるshocking agentにはなりえない可能性が示唆された。

Key words : Cephalosporins, 血小板, モルモット, 副作用

I型薬剤アレルギーの発症はIgE抗体と対応する抗原によって出現することは周知の事実であり、その原因となる薬剤は抗生物質の開発量に伴って漸時、増加の傾向にある¹⁾。一方、臨床的には薬剤アレルギーと診断可能な患者の中で原因薬剤の推定、確認の不可能な症例が観察されることが多い。

抗生物質の抗原性に関しては実験動物レベルでは他剤との交差反応性が低く、かつ抗原性もほとんどないと報告されている薬剤がアレルギー様症状を示す割合は年々増加する傾向にあり、これは使用頻度によるものであろうが、その誘発原因については現在のところ解析不可能である。

山田²⁾は抗原性の低いcefaclor (CCL)によるアレルギー様症状の出現の原因を解析する目的で免疫学的に検討し、その結果、抗原抗体反応に由来する種々の現象とあわせて考察不能な現象を観察し、報告した。すなわち上記免疫反応以外にCCLの薬理学的副作用が炎症出現に関与している可能性が示唆された。

モルモットの血中histamineはその90%以上が血小板のdense body中に由来すると報告されている³⁾。この血小板は血小板活性化因子(PAF)で代表される刺激因子や物

理的因子によって活性化され、細胞内顆粒を放出する⁴⁾。また、血小板は気管支喘息などのアレルギーの発症に重要な役割をするとされている⁵⁾。

これらの報告を基にして、本論文では血中histamineのmajor sourceとして血小板と好塩基球を選び、それらにcephalosporin (cephem)系薬剤10種がどのような影響を与えるかを検討し、免疫学的に解析することを目的とした。

I. 材料および方法

1. 動物

体重250g前後のHartley系雌性モルモットを免疫、passive cutaneous anaphylaxis (PCA)、好塩基球ならびに血小板の採取に使用した。

2. 薬品

薬剤は、cephem系抗生物質のうちcephalosporin系抗生物質として、cephalotin (CET lot. WK-02) 塩野義製薬社製、cefazolin (CEZ lot. 66 F-0554) Sigma社製、cephalexin (CEX lot. 86 F-0059) Sigma社製、cefaclor (CCL lot. 560 GK 7) 塩野義製薬社製、cefotiam (CTM lot. HL 625)、武田薬品社製、cefmenoxime (CMX lot. HK 983 A) 武田薬品社製の

*東京都文京区千駄木 1-1-5

7 薬剤を, cephamycin 系抗生物質として, latamoxef (LMOX lot. WT-04) 塩野義製薬社製, cefmetazole (CMZ lot. H 85 P) 三共社製, の 2 薬剤を使用した (Fig.

1)。また, PCG と CMZ の母核や側鎖構造類似物質として, 6-aminopenicillanic acid (6-APA) と 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) は富山化学総

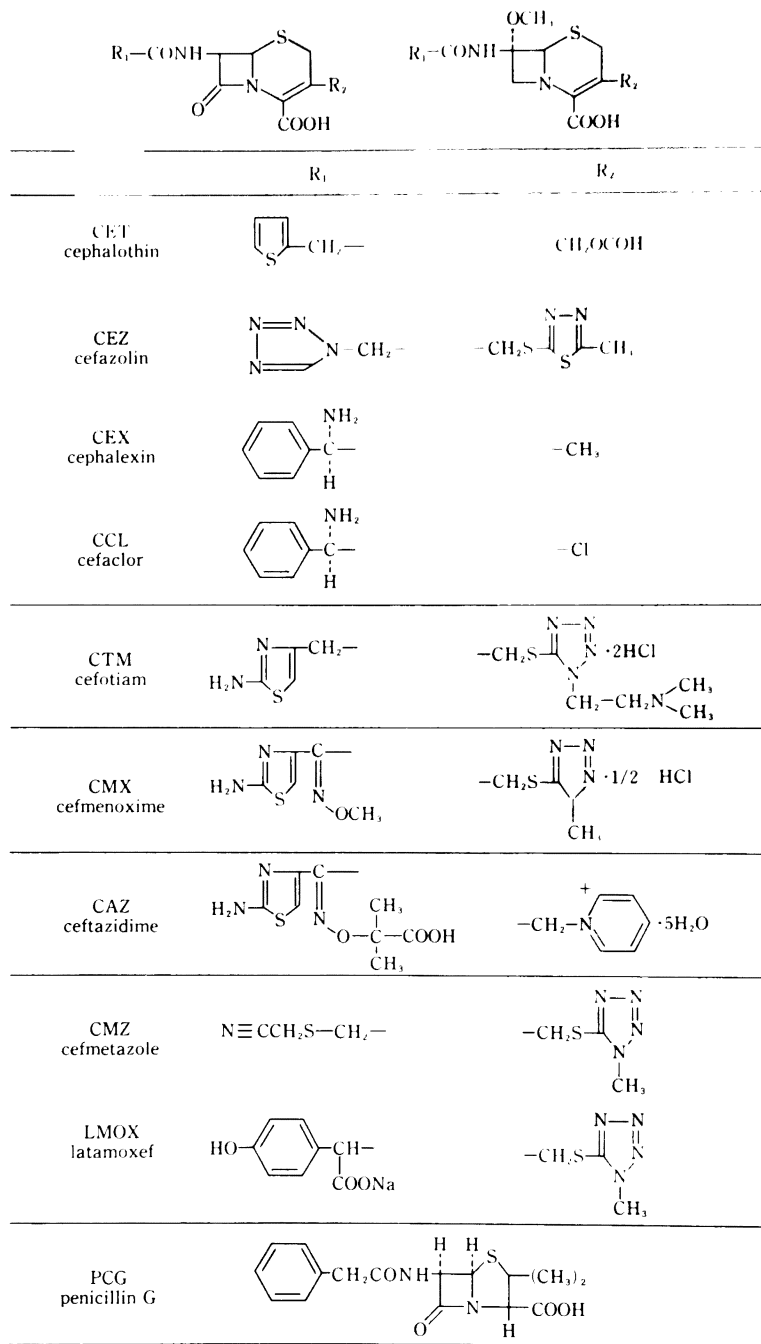


Fig. 1. Chemical structures of penicillin and cepheps

合研究所より分与されたものを、2-aminothiazole は半井化学薬品社製 (lot. No. M 3 N 5073) を、phenylacetyl-glycine (PAG) は和光純薬工業社製 (lot. No. TSM 7596) をそれぞれ使用した。Human serum albumin (HSA) は Kabi 社製 (lot. 104 F) を使用した。

3. 免疫用抗原と抗血清の作成

既知の方法⁶⁾で薬剤と ascaris suum extract (Ase) ならびに human serum albumin (HSA) との結合物を作製し、Ase-coupling 抗原は免疫用抗原、同様の方法で作製した HSA-coupling 抗原は反応用抗原として使用した。抗血清は Al(OH)₃ 5 mg/Tris buffered saline 1 ml に対し Ase coupling 抗原 10 µg/ml をモルモット腹腔内注射し、4 週間に 1 回の間隔で計 4 回免疫し、最終感作 10 日後に得られた⁷⁾抗血清は、8 日間 PCA で PCA titer を確認し、細胞の被動性感作やモルモットの被動製感作に使用した。

4. 好塩基球の分離と histamine 測定

Hartley 系モルモットの骨髓より、八木らの報告した方法⁸⁾、好塩基球を分離し、分取した好塩基球 (normal cell)、ならびに任意に選出した PCG と CMZ の抗血清で感作した好塩基球 (sensitized cell) の 10⁷ cells/ml に対し、対応する薬剤や側鎖、母核、coupling 抗原 (100 µg) の刺激による histamine 遊離を小松らの方法⁹⁾で測定した。

5. 薬剤刺激による血中 histamine 量の測定¹⁰⁾

Hartley 系モルモットを各薬剤の抗体で被動性感作し、8 日後に対応する薬剤は 10 mg/head、ならびに coupling 抗原は 1 mg/head を経口投与、または静脈注射して、薬剤の血中濃度が最高になる時に採血し、血中の histamine 量を測定した。

6. 血小板の分離と凝集能測定

常法通りにモルモットより 3.2% クエン酸ナトリウムを 1/10 容加えたプラスチックの注射器で採血し、室温、800 rpm で 10 分間遠心し、多血小板血漿 (PRP) を得た。残りの細胞液をさらに 2,000 rpm で 20 分間遠心し、乏血小板血漿 (PPP) を得た¹¹⁾。

PRP の細胞数を 10⁷/ml に PPP で調整し、細胞浮遊液 200 µl に対し、最終濃度が 100 µg となるように薬剤を添加、3 分間 incubate し、ADP 10⁻⁵M を加えた後、血小板凝集計 (Nkk Hema tracer, 二光バイオサイエンス社) を用いて凝集率および最大凝集に達するまでの凝集時間を測定した。

7. 薬剤による血小板からの histamine 遊離と serotonin 遊離

常法にしたがって血小板を洗浄し、130 mM NaCl, 0.1% に glucose と albumin を加えた 25 mM Tris

HCl buffer に 10⁷/ml となるように洗浄血小板を浮遊させた。細胞 10⁷個に対して薬剤 100 µg を最終濃度となるように添加し、10 分間 incubate し、細胞内、および血清中の histamine の割合を遊離率として表現した。同様に serotonin についても血清中と細胞内の含有量を Pasonen ら¹²⁾の方法で測定し、遊離率を算出した。

II. 結 果

1. Cepheids の好塩基球に対する影響

モルモット骨髓細胞より分離した好塩基球 (抗体非感作, normal) に薬剤単独、薬剤の構造部分、HSA coupling 抗原を表に示した濃度を添加した。抗原非添加の control 群では 6.5% の histamine 遊離を起こす条件下ではいずれの構造物も histamine 遊離に影響をおよぼさなかった。抗原に対応する抗血清で好塩基球を感作した (sensitized) 場合には HSA coupling 抗原で刺激すると control の 7.8% に比べ PCG-HSA 37.0%, CMZ-HSA 35.9% の histamine が遊離されたが他の構造物では遊離されなかった。この傾向はいずれの薬剤でも同じ結果であったので、その傾向の顕著な PCG, CMZ について Table 1 に示した。

2. 薬剤添加による血中 histamine 量におよぼす影響

添加する薬剤に対応する抗血清でモルモットを被動性に感作し 8 日後に薬剤を静注または経口投与した。その結果 (Table 2)、薬剤無処置のモルモットでは血中 histamine 濃度が 38.5 ng/ml である条件下での 10 mg/head の薬剤の添加では control とほぼ同程度の数値を示したが CEZ, CCL, CEX, LMOX, CMZ はそれぞれ 19.5 ng/ml ~ 23.5 ng/ml の範囲内で対照に比べ低い傾向を示した。また別に 1 mg/head の HSA coupling 抗原を投与すると PCG を始め、いくつかの薬剤は無処置に比べ血中 histamine が 59.9 ng/ml ~ 140.2 ng/ml となり著しい上昇が観察されたが CCL, CEX, CMZ では 31.5 ng/ml ~ 49.8 ng/ml となり上昇は認められなかった。

3. Cepheids の血小板機能におよぼす影響

上記の 2. の結果から histamine 濃度が上昇しない原因を検討するために血小板凝集能におよぼす影響を測定した (Table 3)。各抗生物質添加による最大凝集率は ADP 添加による凝集を 100% とした場合、わずかに凝集抑制の傾向が観察され、薬剤濃度を最終濃度 1 mg/ml に増量するとさらに抑制は顕著であった (data not shown)。凝集時間は最大凝集までが薬剤平均 181 秒で ADP 添加の場合とほとんど変化はみられなかった。

4. 血小板からの histamine および serotonin 遊

Table 1. Histamine release from basophils stimulated with antibiotics

Stimulant	Final conc.	% release of histamine	
		normal	sensitized
PCG	100 mcg	5.1	17.3
6 APA		5.2	7.2
PAG		8.3	5.3
PCG HSA		8.9	37.0
CMZ		7.9	19.0
7 ACA		4.5	5.8
Thiazole		3.7	4.1
1H tetrazole		4.9	3.3
CMZ HSA		7.3	35.9
None		6.5	7.8

Normal : normal cells

Sensitized: Ab sensitized cells

6-APA : 6-aminopenicillanic acid

PAG : phenyl acetyl glycine

7-ACA : 7-aminoccephalosporanic acid

Thiometa: 2-aminothiazole

PCG : penicillin G

CMZ : cefmetazole

Table 2. Histamine contents isolated from whole blood of guinea pigs passively sensitized with antibodies (ng/ml)

Sensitized with antibody	Challenging antigen	
	antibiotic	HSA-coupling Ag
anti-cefazolin	23.5	83.5
anti-cefaclor	23.7	42.6
anti-cephalothin	27.4	119.0
anti-cephalexin	23.6	31.5
anti-cefotiam	38.9	88.3
anti-cefmenoxime	41.2	140.2
anti-ceftazidime	51.1	73.3
anti-latamoxef	21.1	59.9
anti-cefmetazole	19.5	49.9
anti-penicillin G	37.3	455.9
none	38.5	42.0

Challenging antibiotics were injected 8 days after sensitization with antibody.

離におよぼす影響

洗浄血小板細胞液 $10^7/ml$ に 0.1 mM の ADP を添加すると 12.8 % の serotonin が遊離された。また対照

の ADP 非刺激の control は 6.6 % の遊離率であった (Table 4)。細胞浮遊液に表に示した濃度の薬剤を加えると serotonin の平均遊離率は 4.95 % であり、control

Table 3. Inhibitory effects of antibiotics on platelet aggregation stimulated with ADP

Antibiotics	Max. aggreg. (%)	Aggreg. time (sec)
cefazolin	99.4	184.5
cefactor	97.8	186.0
cephalothin	97.4	186.0
cephalexin	96.6	172.0
cefotiam	96.4	174.0
cefmenoxime	94.1	181.5
ceftazidime	99.0	174.0
latamoxef	94.7	192.0
cefmetazole	96.0	181.5
penicillin G	96.2	182.0
(means)	96.8	181.3
ADP	100.0	195.0

Platelets (5×10^6) were incubated with antibiotics (100 mcg) at 37°C for 10 min.

Table 4. Serotonin and histamine release from platelet stimulated with antibiotics

Antibiotics 100 mcg	% release	
	serotonin	histamine
cefazolin	6.3	7.6 (60.0)
cefactor	3.4	4.2 (34.5)
cephalothin	6.4	16.9 (59.5)
cephalexin	2.2	3.9 (29.8)
cefotiam	7.4	21.9 (55.9)
cefmenoxime	7.0	22.4 (51.3)
ceftazidime	2.8	28.6 ND
latamoxef	ND	14.7 (66.6)
cefmetazole	7.1	16.8 ND
penicillin G	2.0	18.5 (40.9)
(means)	4.9	15.5 —
none	6.6	21.3 (17.3)
ADP	12.8	58.3 (67.5)

() indicates that platelet were incubated with the antibiotics and stimulated with ADP

に比較して低値を示した。特に CCL, CEX, CAZ, PCG が顕著であった。LMOX は一定の傾向の数値を示さないので ND とした。

同様に洗浄血小板を用いて histamine の遊離について測定した。薬剤非添加(control)で 21.3 %, ADP 添加で 58.3 % の遊離が観察された。薬剤添加による his-

tamine 遊離率の平均は 15.5% で対照よりも低く、特に CCL, CEX が 4.2%, 3.9% で顕著であった。

() 内に示した数値は薬剤と細胞浮遊液を incubate した後に ADP を添加して histamine 遊離を測定した数値である。薬剤および ADP を添加しない場合は 17.3% の遊離率であるのに対し、ADP 添加では 67.5% の遊離、薬剤の添加によりすべてが 67.5% より低い値で、特に CCL, CEX は 34.5%, 39.8% と低値であった。

III. 考 察

IgE 抗体は組織肥満細胞ならびに血中好塩基球の細胞表面の receptor に結合し、それに対応する抗原の結合による刺激で種々の chemical mediator が遊離される。その中で histamine はヒトおよびモルモットにおいて shocking agent としての生物活性が強い¹³⁾とされている。

著者ら¹⁴⁾は anti-CCL-Ase IgE モルモット血清で感作されたモルモットは IgE で mediate される PCA 反応は誘発するか、全身性に感作されたモルモットのショック誘発実験において、抗原 challenge でショック死するにもかかわらず血中 histamine 値の上昇が認められない結果がえられた。一方、同様に PCG 抗体で感作された場合には血中 histamine 量は正常値が 30~40 ng/ml であるものが抗原投与によって 100 ng/ml 以上に上昇し、ショック死した。これらの実験はすべて IgE rich の抗体とその抗原とによる反応であるので CCL での結果には論理的に著しい矛盾がある。

すでに報告¹⁵⁾されているように cephem 系抗生物質は血小板凝集能を抑制し、しかも今回の実験の結果で示されたように、濃染顆粒中の serotonin および histamine の放出も抑制する傾向が観察された。特に CCL と CEX はその抑制が強く、3 位側鎖の構造類似性に起因するものと推測された。これらの薬剤の投与による shock 誘発時に histamine 濃度の増加が示されない事実は血中の血小板機能の抑制¹⁶⁾が重要な因子として関与している可能性が推測された。

細胞別の histamine 含有量¹⁷⁾は mast cell は 21~34 pg/cell で basophil も同程度である。血小板は 0.001~0.002 pg/cell である。血液 1 ml に basophil は 2~3/ml で血小板は 60×10^4 /ml¹⁸⁾である。その結果、血小板に由来する histamine 量は 60~120 pg/ml となる。

抗原抗体反応の結果、mast cell, basophil から chemical mediator が遊離され、局所において毛細血管透過性亢進による炎症反応、すなわち、PCA が生じ、同時にその mediator は血小板をも活性化する¹⁹⁾はずであるが抗原である薬剤は同時に血小板の機能を

抑制した状態 (Tables 3, 4) にあるので、連鎖的に生じるはずの血小板からの chemical mediator の遊離が阻止される可能性が推測される。

すなわち Lett Brown⁹⁾が報告したように血中の histamine の 90% 以上が血小板に由来するのであれば、ショック時においても血小板機能の低下によって血中 histamine の上昇は起こらず、他の因子によってショック死が起こる可能性が示唆されるものと考えられた。

以上の結果から、CCL と CEX に共通する aminobenzyl 基側鎖をもち抗生物質の免疫学的特異性について詳細な解析が必要であることが示唆された。

文 献

- 1) 医薬品副作用情報 No.81 (昭和 61 年 10 月)~No.93 (63 年 10 月) 厚生省薬務局安全課
- 2) 山田静雄: Cephacloer の抗原性に関する研究 *Chemotherapy* 37: 889~895, 1989
- 3) Michael A. Lett Brown, David O. Thueson and Andrew Grant: Antigen induced histamine release from guinea pigs. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* 64: 341~348, 1981
- 4) 蔵本 淳 編: 血小板 1984. 21~31. 化学評論社 (東京)
- 5) 仲村恒敬: 血小板活性化因子. *呼吸* 4: 526~529, 1985
- 6) Parker C W: Conjugation of penicillin and derivatives. *Methods of immunology*: 133~143, Academic press New York 1967
- 7) Perni A, Mota I: The production of IgE and IgG antibodies in guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology* 25: 297~305, 1973
- 8) 八木和郎: Aminobenzylpenicillin の単独投与で惹起されるモルモットを用いての PCA 反応ならびにその発来機作に関する研究. *アレルギー* 33: 148~157, 1984
- 9) 小松道俊: 気管支喘息における histamine に関する研究. *アレルギー* 27: 67~74, 1978
- 10) May C D, Lyman M, Alberto R, Chang J: Procedures for immunological studies of histamine release from leukocytes with a small volume of blood. *J Allergy* 46: 1012~1020, 1970
- 11) 日高弘義: 血小板の分子薬理. 74~80, 1983 講談社
- 12) Pasonen M K: Release of 5-hydroxytryptamine from platelets *J. Pharmacol.* 17:681~697, 1956
- 13) 山内信和, 須甲松信, 伊藤幸治, 宮本昭正: モルモットの気管支喘息モデル. *アレルギー* 32: 1084~1092, 1983
- 14) 本間義春, 竹内良夫, 西村葉子, 栗山純一, 横室公三: 薬剤アレルギーに関する基礎的研究. Cefaclor の抗原性について. *アレルギー* 37: 842, 1988 (会報)

- 15) Shattil S J, Bennett J S, McDonough M, Turnbull J: Carbenicillin and penicillin G inhibit platelet function *in vitro* by impairing the interaction of agonist with the platelet surface. *J. Clin. Invest.* 65: 329-337, 1980
- 16) Weitekamp M R, Caputo G M, Al-Mondhiri A B, Aber R C: The effects of latamoxef, cefotaxime and cefoperazone on platelet function and coagulation in normal volunteers. *J. of Antimicrob. Chemother.* 16: 995-1001, 1985
- 17) 田坂賢三: ヒスタミンの産生細胞と生合成。治療学 18: 150-156, 1987
- 18) 堀内茂友: 実験動物の生物学的特性データ: 98-99, 1989 ソフトサイエンス社 (東京)
- 19) Saxena S P, McNicol A, Brandes L J, Becker A B, Gerrard J M: A role for intracellular histamine in collagen induced platelet aggregation. *Blood* 75: 407-414, 1990

EFFECTS OF CEPHALOSPORINS (CEPHEMS) ON BASOPHILS AND PLATELET FUNCTION

Yoshiharu Honma, Yoshio Takeuchi, Kou Kawasumi, Yoko Nishimura,
Jun-ichi Kuriyama and Kozo Yokomuro

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

In comparative studies among on the ten cepheems were determined histamine release from basophils and platelet function, and obtained the resulting.

1. Guinea pigs sensitized with IgE antibodies to cefaclor (CCL)-Ase, cephalixin (CEX)-Ase and cefmetazole (CMZ)-Ase showed changes in histamine levels in blood, but died when injected with the challenging antigen. In contrast, histamine isolated from guinea pigs sensitized with IgE antibody to penicillin G (PCG)-Ase increased and they also died.

2. Histamine release was observed from basophils isolated from guinea pigs sensitized with IgE antibodies when antigen was added.

3. To confirm the difference in the results of the *in vivo* and *in vitro* studies, histamine and serotonin released from platelets were suppressed with CCL, CEX and CMZ.

Our results, we suggest that in the induction of anaphylactic shock by CCL and CEX histamine may not be the major agent.