

新キノロン系抗菌剤Fleroxacinの抗原性試験

原 三郎・中西宣彦・阿部泰夫

杏林製薬株式会社 中央研究所*

新キノロン系抗菌剤fleroxacinの抗原性をモルモット、ウサギ及びマウスを用いて検討した。

1) モルモットに、fleroxacinを週1回ずつ計3回、Freund's complete adjuvant(FCA)と共に背部皮下及び臀筋内に投与して感作した。これらモルモットについて能動的全身性アナフィラキシー誘発試験及び能動的皮膚アナフィラキシー誘発試験を行ったが、アナフィラキシーショックを含めた即時型反応あるいは遅延型反応は観察されなかった。また、モルモットのMaximization testも行ったが、陰性であった。

2) ウサギに、fleroxacinあるいはfleroxacin-bovine γ -globulin混合物(fleroxacin-BGG)を週1回ずつ計4回、FCAと共に背部皮下及び臀筋内に投与して感作した。これらの血清について寒天ゲル内沈降反応、間接赤血球凝集反応及びモルモット 4h PCA反応を行ったが、fleroxacinに対する抗体は検出されなかった。

3) マウスに、fleroxacinあるいはfleroxacin-BGGを1回、2回あるいは4回、Al(OH)₃ゲルと共に腹腔内に投与して感作した。これらの血清について寒天ゲル内沈降反応、マウス 1h PCA反応及びラット 4h PCA反応を行ったが、fleroxacinに対する抗体は検出されなかった。

従って、fleroxacinは本実験条件下ではモルモット、ウサギ及びマウスのいずれに対しても抗原性を示さなかった。

Key words : Fleroxacin, モルモット, ウサギ, マウス, 抗原性

6,8-Difluoro-1-(2-fluoroethyl)-1,4-dihydro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (fleroxacin)は、杏林製薬株式会社で開発された新しい合成抗菌剤で、グラム陰性菌及びグラム陽性菌に対して優れた抗菌力と広範な抗菌スペクトルを示すことが認められている¹⁾。

本報では、fleroxacinの安全性評価の一環として、モルモット、ウサギ及びマウスを用いて、その抗原性の有無について検討を行ったので、それらの成績を報告する。

I. 材料及び方法

1. 試験物質及び試薬

被験物質として、杏林製薬株式会社で合成されたfleroxacin(Lot No.830825)を使用した。陽性対照物質及び担体蛋白としては、2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB,和光純薬), penicillin G (PCG, 明治製薬), 卵白アルブミン(OA, 生化学工業), ヒト血清アルブミン(HSA, Miles Lab.), 及びウシ γ -グロブリン(BGG, Miles Lab.)を、その他に、Freund's complete adjuvant(FCA, Difco Lab.)及び綿羊保存血(日本生物材料センター)を用いた。

2. 使用動物及び飼育条件

感作用動物としてはStd : Hartley系モルモット(雄性; 体重333~448g, 5~6週齢, 雌性; 体重403~475g, 7

週齢, 静岡県実験動物農業協同組合), ニュージーランドホワイト種ウサギ(雄性; 体重2.76~3.38kg, 17~18週齢, 市川屋), Crj : C3H/He系マウス(雌性; 体重20.6~27.8g, 11週齢, 日本チャールス・リバー), Crj : BALB/c系マウス(雌性; 体重21.8~27.2g, 11週齢, 日本チャールス・リバー), 及びCrj : CD-1系マウス(雌性; 体重27.0~34.9g, 11週齢, 日本チャールス・リバー)を使用した。

また、受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA反応)のレシピエント動物としては、Std Hartley系モルモット(雄性; 体重359~534g, 5~6週齢, 静岡県実験動物農業協同組合), Crj : CD-1系マウス(雌性; 体重22.9~38.6g, 10~14週齢, 日本チャールス・リバー), 及びCrj : CD系ラット(雄性; 体重379.0~530.7g, 13~15週齢, 日本チャールス・リバー)を用いた。

これらの動物は、温度21~24℃, 湿度35~75%に調節されたバリア・システムの飼育室内で、固形飼料(モルモット : CG-3, ウサギ : CR-3, ラット・マウス : CE-2, 日本クレア)と水を自由に摂取させて飼育した。

3. 薬物の蛋白混合物または蛋白結合物の調製

Fleroxacinと蛋白の混合物は、以下の方法で調製した。Fleroxacinを少量の生理食塩水と、1N-NaOHで溶解し、

* 〒329-01 栃木県下都賀郡野木町御手洗2399-1

希塩酸でpHを約9に調整した。このfleroxacin溶液に、蛋白(BGG又はHSA)の生理食塩水溶液を重量比としてfleroxacin:蛋白=3:1になるように加えて混合した後、濃度を調整し、37℃で24時間インキュベートした。このfleroxacinと蛋白の混合物を透析することなく、そのままfleroxacin-BGGまたはfleroxacin-HSAとして使用した。なお、調製物の濃度は蛋白の濃度で表した。

PCGと蛋白の結合物は、LEVINEらの方法²⁾に従って調製した。Penamaldate法³⁾により求めた1分子の蛋白に結合したPCGは、PCG-BGG結合物(PCG-BGG)で11~17、PCG-HSA結合物(PCG-HSA)で9であった。

4. モルモットを用いた抗原性試験

(1) 感作方法

能動的全身性アナフィラキシー誘発試験(ASA試験)及び能動的皮膚アナフィラキシー試験(ACA試験)に用いるモルモットは、以下のように感作した。雄性モルモットに、10% fleroxacin生理食塩水懸濁液に等容量のFCAを加えエマルジョンにしたものを、個体当たり1ml(50mg/body)ずつ、1週間に1回の割合で計3回、背部皮下及び腎筋内に投与した。また、陽性対照としてOAを10mg/bodyの用量でfleroxacinと同様な方法で感作した。

(2) ASA試験

Fleroxacin感作群では12匹、OA感作群では6匹のモルモットを用いた。最終感作3週間後に、fleroxacin感作群には0.5% fleroxacin生理食塩水懸濁液又は0.2% fleroxacin-HSA溶液を、OA感作群には0.5% OA溶液を、1mlずつ静脈内投与して、全身性アナフィラキシー反応を誘発した。誘発後1時間にわたりショック症状を観察して、以下に示す原田らの方法⁴⁾に従い判定した。ただし、生死の判定は誘発24時間後までとした。

Grade	観察される症状
0	何ら症状が認められないもの
I	不安状態を呈し、口をもぐつかせ顔や耳をこする動作、立毛、軽い吃逆発作を示すもの
II	吃逆発作がかなり強くチアノーゼを呈するが、横転には至らないもの
III	強い吃逆発作が生じ、横転し、衰弱が著しいもの
IV	呼吸困難のため死亡するもの

(3) ACA試験

1群につき6匹のモルモットを用いた。最終感作3週間後に、あらかじめ背部を剪毛したfleroxacin感作モルモットに、0.5% fleroxacin生理食塩水懸濁液、0.2% fleroxacin-HSA溶液及び生理食塩水を、また、陽性対照として、OA感作群に0.5% OA溶液及び生理食塩水を0.05mlずつ皮下投与して誘発した。

判定は、抗原誘発3、24及び48時間後に行い、皮膚表面の紅斑の有無について観察した。紅斑があれば、その直径と短径を測定して平均値を求め、肉眼的に変化のないものをGrade0、5mm以下をI、10mm以下をII、15mm以下をIII、15mmより大きいものをIVとして表わした。

以下の条件の他はMAGNUSSONらの方法⁵⁾に従って行った。

1群10匹の雌性モルモットを用いて、その肩甲骨上に、FCAのみ、試験物質(1% fleroxacin、又は0.125% DNCB)生理食塩水懸濁液、試験物質生理食塩水懸濁液+FCAの各0.05mlを、それぞれ左右2箇所ずつ皮下感作投与した。初回感作6日目に同一部位に10%ラウリル硫酸ナトリウム処置、その24時間後に試験物質(5% fleroxacin、又は2.5% DNCB)含有白色ワセリンを0.5gずつ濾紙に塗り、48時間密着貼付した。貼付後14日目に、右側腹部を剪毛した後、2回目の感作と同じ方法で、試験物質を24時間密着貼付して誘発した。

誘発48時間後及び72時間後に誘発部位を観察し、肉眼的に変化のないものをGrade 0、軽度又はまばらな紅斑が観察されたものをI、中程度の紅斑をII、強度の紅斑及び浮腫をIIIとして表わした。

5. ウサギを用いた抗原性試験

(1) 感作方法

1群6匹のウサギに、10% fleroxacin生理食塩水懸濁液あるいは2% fleroxacin-BGG生理食塩水溶液、また、陽性対照として10% PCG生理食塩水溶液あるいは2% PCG-BGG生理食塩水溶液に、等容量のFCAを加えエマルジョンにしたものを、個体当たり1ml(10%液:50mg/body、2%液:10mg/body)ずつ1週間に1回の割合で計4回、0.5mlずつ背部皮下及び腎筋内に分割投与し感作した。

最終感作7日後及び14日後に耳静脈より採血し、抗血清を得た。

(2) 寒天ゲル内沈降反応(Ouchterlony法)

1.2%寒天平板を用い、抗原と抗血清を室温で48時間恒湿箱内で反応させ、沈降線の有無を観察した。抗原濃度はfleroxacin又はPCGでは0.01%、0.1%、1%とし、fleroxacin-HSA又はPCG-HSAでは0.01%、0.1%とした。また、抗血清は原液~16倍希釈の範囲を用いた。

(3) 間接赤血球凝集反応(HA反応)

綿羊保存血より赤血球を分離し、今井らの方法⁶⁾に準じて、グルタルアルデヒド-タンニン酸処理羊赤血球に抗原(fleroxacin-HSA, PCG-HSA, 又はHSA)を感作した。

凝集反応は、マイクロタイター法で行い、凝集の有無を観察した。凝集を示した被験血清の最大希釈倍数をHA抗体価とした。

(4) モルモットにおける 4h PCA反応

抗血清量は0.05ml, 誘発抗原量は個体当たり, fleroxacin, PCGでは5mg, fleroxacin-HSA, PCG-HSAでは2mgとし, 他はOVARYの方法⁷⁾に従って実施した。2匹のレシビエントのどちらにも直径5mm以上の青色斑が形成された場合を陽性とし, 陽性を示した抗血清は更に倍数希釈して実験を行い, 陽性反応を示す最大希釈倍数をPCA抗体価とした。

6. マウスを用いた抗原性試験

(1) 感作方法

1群10匹のマウスに, 被験物質あるいは対照物質を, 個体当たり2.5mgのA1(OH)₃ゲル(Alum)に吸着させ, 腹腔内に投与して感作した。投与は, fleroxacinでは, 個体当たり1 μ g, 10 μ g, 100 μ gを, OAではBALB/c系及びCD-1系マウスに, BGGではC3H/He系及びCD-1系マウスに, 個体当たり10 μ gずつを, 1週間に1回の割合で計4回, また, fleroxacin-BGG及びPCG-BGGではC3H/He系マウスに個体当たり1 μ g, 10 μ g, 100 μ gを, 1回あるいは3週間の間隔を置き2回行った。

各群とも, 最終感作12日後に採血し, 抗血清を得た。

(2) Ouchterlony法

ウサギを用いた抗原性試験と同様の方法で行った。抗原濃度は, fleroxacin又はPCGでは0.01%, 0.1%, 1%とし, fleroxacin-HSA, PCG-HSA, OA又はBGGでは, 0.01%, 0.1%とした。抗血清は原液~64倍希釈の範囲

を用いた。

(3) マウスにおける 1h PCA反応

抗血清量は0.05ml, 誘発抗原量はfleroxacin, PCG, OA及びBGGの場合, 個体当たり2mg, fleroxacin-HSA及びPCG-HSAの場合は個体当たり0.5mgとし, 他は原田らの方法¹⁾に従いマウスを用いて実施した。判定はモルモット4h PCA反応と同様な方法で行った。

(4) ラットにおける 4h PCA反応

抗血清量は0.1ml, 誘発抗原量は, fleroxacin, PCG, OA及びBGGの場合, 個体当たり5mg, fleroxacin-HSA及びPCG-HSAの場合, 個体当たり2mgとし, 他はMOTA⁸⁾らの方法に従いラットを用いて実施した。判定はモルモット4h PCA反応と同様な方法で行った。

II. 成績

1. モルモットを用いた抗原性試験

(1) ASA試験

FleroxacinあるいはOAで感作したモルモットについてASA試験を行った結果をTable 1に示した。

Fleroxacinでモルモットを感作した後, fleroxacinあるいはfleroxacin-HSAで誘発した場合, 全例においてアナフィラキシー症状は全く観察されなかった。陽性対照のOA投与群は, OAで誘発すると全例に激しい吃逆発作がみられ, 横転し, 呼吸困難の後誘発3~6分で死亡した(Grade IV)。死亡例を剖検したところ, いずれの個体にも肺の膨満及び出血斑が認められた。

無処置モルモットにfleroxacinあるいはfleroxacin-HSAを投与しても全例にアナフィラキシー症状は観察されなかった。

(2) ACA試験

FleroxacinあるいはOAで感作したモルモットについてACA試験を行った結果をTable 2に示した。

Fleroxacin感作群のモルモット皮内にfleroxacin懸濁液あるいはfleroxacin-HSA溶液を誘発投与しても, すべて

Table 1. Active systemic anaphylaxis test of fleroxacin and ovalbumin(OA) in guinea pigs

Immunogen	Dose (mg/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Number of animals	Grade				
					0	I	II	III	IV
Fleroxacin	50	FCA	fleroxacin	6	6	0	0	0	0
			fleroxacin-HSA	6	6	0	0	0	0
Non treated			fleroxacin	6	6	0	0	0	0
			fleroxacin-HSA	6	6	0	0	0	0
OA	10	FCA	OA	6	0	0	0	0	6

At three weeks after the last sensitization, the eliciting antigen was injected intravenously to the animals.

FCA: Freund's complete adjuvant

HSA: human serum albumin

の観察期間を通じて皮膚反応は陰性であった。一方、OA感作群のモルモット皮内にOA溶液を誘発投与した場合、3時間後に全例に紅斑が見られ、そのうち2例は出血斑も併せて観察された(Grade II~III)。惹起24時間後では全例に紅斑と出血斑が認められ(Grade III~IV)、48時間後では全例に紅斑及び壊死が認められた(Grade III)。

無処置モルモットを fleroxacin あるいは fleroxacin-HSA で誘発しても皮膚反応は全例陰性であった。

(3) Maximization test

Maximization testの成績をTable 3に示した。

溶媒対照群には、全例皮膚反応は認められなかった。Fleroxacinによる誘発では、fleroxacin感作群及び非感作群のいずれにも紅斑や浮腫などの皮膚反応は認められず、陰性であった。DNCB感作群では、全例に誘発48時間及び72時間後に強度の紅斑や浮腫が観察された(Grade

III)。また、非感作群において、DNCBによる誘発では全例に一次刺激による軽度の紅斑が認められた(Grade I)。

2. ウサギを用いた抗原性試験

(1) Ouchterlony法

Fleroxacin, fleroxacin-BGG, PCGあるいはPCG-BGGで感作したウサギより採取した血清について、Ouchterlony法を実施した結果をTable 4に示した。

最終感作7日後及び14日後に採血した抗fleroxacin血清あるいは抗fleroxacin-BGG血清は、いずれも fleroxacin または fleroxacin-HSA との間に沈降線を形成しなかった。抗PCG血清では、PCG-HSAとの間に、最終感作7日後で6例中4例、14日後で6例中1例に沈降線が認められた。抗PCG-BGG血清は、いずれの時期に採血したもので、PCG-HSAとの間に全例沈降線を形成した。しかし、いずれの抗PCG血清あるいは抗PCG-BGG血清

Table 2. Active cutaneous anaphylaxis test of fleroxacin and ovalbumin (OA) in guinea pigs

Immunogen	Dose (mg/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Number of animals	Grade																
					3 h				24 h				48 h								
					0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV		
Fleroxacin	50	FCA	saline	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
			fleroxacin	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
			fleroxacin-HSA	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Non treated			saline	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
			fleroxacin	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
			fleroxacin-HSA	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
OA	10	FCA	saline	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	
			OA	4	0	1	3	0	0	0	1	3	0	0	0	4	0	0	0	0	0
Non treated			saline	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	
			OA	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0

At three weeks after the last sensitization, the eliciting antigen was injected intradermally to the animals.

The skin reaction was observed 3, 24 and 48 h after the challenge.

Erythema, 0: normal, I: ≤ 5 mm, II: ≤ 10 mm, III: ≤ 15 mm, IV: > 15 mm.

Table 3. Maximization test of fleroxacin and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in guinea pigs

Group	Immunization		Elicitation topical challenge	Number of animals	Grade								
	intradermal induction	topical induction			48 h			72 h					
					0	I	II	III	0	I	II	III	
Control	0	0	0	10	10	0	0	0	10	0	0	0	
Fleroxacin	1% fleroxacin	5% fleroxacin	5% fleroxacin	10	10	0	0	0	10	0	0	0	
	Non treated		5% fleroxacin	10	10	0	0	0	10	0	0	0	
DNCB	0.125% DNCB	2.5% DNCB	2.5% DNCB	10	0	0	0	10	0	0	0	10	
	Non treated		2.5% DNCB	10	0	10	0	0	0	10	0	0	

The skin reaction was observed at 48 and 72 h after the challenge.

0: normal, I: scattered mild erythema, II: moderate and diffuse erythema, III: intense erythema and edema.

も、PCGとの間には、沈降線を形成しなかった。

(2) HA反応

Fleroxacin, fleroxacin-BGG, PCGあるいはPCG-BGGで感作したウサギより採取した血清について、HA反応を実施した結果をTable 5に示した。

最終感作7日後及び14日後に採血した抗fleroxacin血清あるいは抗fleroxacin-BGG血清は、全例陰性であった。抗PCG血清あるいは抗PCG-BGG血清は、いずれの時期に採血したものでも、全例陽性であり、それぞれ64倍以上、512倍以上の抗体価を示した。

(3) モルモットにおける4h PCA反応

Fleroxacin, fleroxacin-BGG, PCGあるいはPCG-BGGで感作したウサギより採取した血清について、モルモット4h PCA反応を実施した結果をTable 6に示した。

最終感作7日後及び14日後に採血した抗fleroxacin血清あるいは抗fleroxacin-BGG血清は、4h PCA反応において、fleroxacin又はfleroxacin-HSAでの誘発により、何ら青色斑を形成しなかった。最終感作7日後及び14日後に採血した抗PCG血清あるいは抗PCG-BGG血清は、PCG-HSAで誘発すると全例陽性であり、それぞれ256倍以上、512倍以上の抗体価を示した。しかし、PCGで誘発した場合、全例陰性であった。

3. マウスを用いた抗原性試験

(1) Ouchterlony法

Fleroxacin, fleroxacin-BGG, OA, BGGあるいはPCG-BGGで感作したマウスより採取した血清について、Ouchterlony法を実施した結果をTable 7に示した。

FleroxacinでBALB/c, C3H/He又はCD-1系マウスを

Table 4. Titration of antibodies against fleroxacin and penicillin G(PCG) in rabbit sera by Ouchterlony test

Immunogen	Dose (mg/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Positive/Total after the last sensitization	
				7 days	14 days
Fleroxacin	50	FCA	fleroxacin	0/6	0/6
			fleroxacin-HSA	0/6	0/6
Fleroxacin-BGG	10	FCA	fleroxacin	0/6	0/6
			fleroxacin-HSA	0/6	0/6
PCG	50	FCA	PCG	0/6	0/6
			PCG-HSA	4/6 (1) ¹⁾	1/6 (1)
PCG-BGG	10	FCA	PCG	0/6	0/6
			PCG-HSA	6/6 (1-4)	6/6 (1-2)

At 7 and 14 days after the last sensitization, sera were collected.

When precipitum was identified, it was regarded as positive.

¹⁾antibody titer

BGG: bovine gamma-globulin

Table 5. Titration of antibodies against fleroxacin and penicillin G(PCG) in rabbit sera by passive hemagglutination test

Immunogen	Dose (mg/body)	Adjuvant	Eliciting antigen SRBC sensitized with	Positive/Total after the last sensitization	
				7 days	14 days
Fleroxacin	50	FCA	fleroxacin-HSA	0/6	0/6
Fleroxacin-BGG	10	FCA	fleroxacin-HSA	0/6	0/6
			HSA	0/6	0/6
PCG	50	FCA	PCG-HSA	6/6 (64-2048) ¹⁾	6/6 (64-512)
			PCG-HSA	6/6 (512-2048)	6/6 (512-2048)
PCG-BGG	10	FCA	HSA	0/6	0/6

At 7 and 14 days after the last sensitization, sera were collected.

¹⁾antibody titer

SRBC: sheep red blood cells

感作して得た血清は、いずれも、floxacinあるいはfloxacin-HSAとの間に沈降線を形成しなかった。また、floxacin-BGGでC3H/He系マウスを感作して得た血清も、1回感作、2回感作にかかわらず、floxacinあるいはfloxacin-HSAとの間に沈降線を形成しなかった。一方、陽性対照であるOAで感作したマウスの抗血清では、全例陽性であった。同じく、抗BGG血清では、C3H/He系では全例、CD-1系では10例中6例が陽性を示した。また、PCG-BGGで感作したマウスの抗血清は、PCGまたはPCG-HSAとの間に沈降線を形成しなかった。

(2) マウスにおける 1h PCA 反応

Floxacin, floxacin-BGG, OA, BGGあるいはPCG-BGGで感作したマウスより採取した血清について、マウス 1h PCA反応を実施した結果をTable 8に示した。

3系統のマウスから得られた抗floxacin血清でマウスの皮膚を感作し、floxacinあるいはfloxacin-HSAで誘発した場合、PCA反応は全例陰性であった。floxacin-BGGで感作したC3H/He系マウスより得られた血清でも、1回感作、2回感作にかかわらず、floxacinあるいはfloxacin-HSAの誘発で、全例陰性であった。陽性対照としての抗OA血清及び抗BGG血清では全例陽性であり、それぞれ2560倍以上、80倍以上というPCA抗体価を示した。PCG-BGG1回感作により得られた血清について、PCG-HSAを用いて誘発すると、10例中1 μ g投与群で2例、10 μ g投与群で8例、100 μ g投与群で5例が、また、2回感作により得られた血清では、10例中1 μ g投与群で9例、10 μ g及び100 μ g投与群で全例が、PCA反応陽性を示した(PCA抗体価5倍以上)。しかし、PCGで誘発した場合は、全例陰性であった。

(3) ラットにおける 4h PCA 反応

Floxacin, floxacin-BGG, OA, BGGあるいはPCG-

BGGで感作したマウスより採取した血清について、ラット4h PCA反応を実施した結果をTable 9に示した。

3系統のマウスから得られた抗floxacin血清でラットの皮膚を感作し、floxacinあるいはfloxacin-HSAで誘発した場合、PCA反応は全例陰性であった。Floxacin-BGGで感作したC3H/He系マウスより得られた血清でも、1回感作、2回感作にかかわらず、floxacinあるいはfloxacin-HSAの誘発で、全例陰性であった。陽性対照としての抗OA血清は全例陽性であり160倍以上のPCA抗体価を示し、抗BGG血清は、C3H/He系マウスで全例に(PCA抗体価40倍以上)、またCD-1系マウスで10例中8例に、陽性反応を示した(PCA抗体価5倍以上)。PCG-BGG 1回感作により得られた血清について、PCG-HSAを用いて誘発すると、10例中1 μ g投与群で4例、10 μ g投与群で2例、100 μ g投与群で3例が、また、2回感作により得られた血清では、10例中1 μ g投与群で3例、10 μ g投与群で全例、100 μ g投与群で5例がPCA反応陽性を示した(PCA抗体価5倍以上)。しかし、PCGで誘発した場合は、全例陰性であった。

III. 考 察

Floxacinの抗原性の有無を明らかにするため、モルモット、ウサギ、マウスを用いて抗原性試験を行った。ヒトにおける薬物アレルギー発症の条件を考慮すると、免疫条件は、動物実験においても薬物を単独で投与することが望ましいが、通常、低分子化合物は、蛋白などの高分子担体と非可逆的に結合しない限り、それ自身では抗原性を発現しないと考えられている⁹⁾。そこで本試験においては、免疫原として、floxacin以外に、生理的に近い条件で薬物と蛋白の結合を促進するためにfloxacinとBGGを37°Cで24時間インキュベートして調製したfloxacinとBGGの混合物も使用した。免疫応答を増

Table 6. Titration of antibodies against floxacin and penicillin G(PCG) in rabbit sera by 4 h guinea pig PCA test

Immunogen	Dose (mg/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Positive/Total after the last sensitization	
				7 days	14 days
Floxacin	50	FCA	floxacin	0/6	0/6
			floxacin-HSA	0/6	0/6
Floxacin-BGG	10	FCA	floxacin	0/6	0/6
			floxacin-HSA	0/6	0/6
PCG	50	FCA	PCG	0/6	0/6
			PCG-HSA	6/6 (1024 \leq) ¹⁾	6/6 (256-1024)
PCG-BGG	10	FCA	PCG	0/6	0/6
			PCG-HSA	6/6 (1024)	6/6 (512 \leq)

At 7 and 14 days after the last sensitization, sera were collected.

¹⁾antibody titer

強させるアジュバントとしては、モルモット及びウサギの試験系では、IgGやIgM型抗体産生誘導に有効とされているFCA¹⁰⁾を、また、マウスの試験系では、IgE型抗体産生誘導に有効とされているAlum¹⁰⁾を用いた。

モルモットを用いた抗原性試験では、ASA試験、ACA試験、およびMaximization testを行った。陽性対照

であるOAとFCAで感作したモルモットでは、ASA試験で全例Grade IVのアナフィラキシー症状を、ACA試験で、誘発3時間後から48時間後まで全例にGrade II～IVの即時型および遅延型の皮膚反応を示した。一方、fleroxacinとFCAで感作したモルモットを用いてASA試験を行ったところ、アナフィラキシー症状はまったく認め

Table 7. Titration of antibodies against fleroxacin, ovalbumin (OA), bovine gamma-globulin (BGG) and penicillin G (PCG) in mouse sera by Ouchterlony test

Immunogen	Strain	Dose (μ g/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Immunization		
					once	twice	four times
Fleroxacin	BALB/c	1	Alum	fleroxacin			0/10 ¹⁾
				fleroxacin - HSA			0/10
	C3H/He			fleroxacin			0/10
		fleroxacin - HSA				0/10	
	CD-1			fleroxacin			0/10
		fleroxacin - HSA				0/10	
	BALB/c	10		fleroxacin			0/10
				fleroxacin - HSA			0/10
	C3H/He			fleroxacin			0/10
	fleroxacin - HSA			0/10			
CD-1		fleroxacin			0/10		
	fleroxacin - HSA			0/10			
	BALB/c	100	fleroxacin			0/10	
	fleroxacin - HSA				0/10		
C3H/He	fleroxacin				0/10		
	fleroxacin - HSA			0/10			
	CD-1		fleroxacin			0/10	
	fleroxacin - HSA		fleroxacin			0/10	
OA	BALB/c	10	Alum	OA			10/10 (8~32) ²⁾
	CD-1						10/10 (16~32)
BGG	C3H/He	10	Alum	BGG			10/10 (2~8)
	CD-1						6/10 (1~4)
Fleroxacin - BGG	C3H/He	1	Alum	fleroxacin	0/10	0/10	
				fleroxacin - HSA	0/10	0/10	
		10		fleroxacin	0/10	0/10	
	fleroxacin - HSA	0/10	0/10				
	100	fleroxacin	0/10	0/10			
	fleroxacin - HSA	0/10	0/10				
PCG - BGG	C3H/He	1	Alum	PCG	0/10	0/10	
				PCG - HSA	0/10	0/10	
		10		PCG	0/10	0/10	
	PCG - HSA	0/10	0/10				
	100	PCG	0/10	0/10			
	PCG - HSA	0/10	0/10				

¹⁾positive/total

²⁾antibody titer

られず、ACA試験でも、即時型反応及び遅延型反応陽性を示唆する皮膚反応所見は認められなかった。また、Maximization testにおいても、DNCBで感作したモルモットでは全例にGrade IIIの反応が認められたが、fleroxacinの感作では紅斑、浮腫等の遅延型反応陽性を示唆

する皮膚反応は認められなかった。

ウサギを用いた抗原性試験では、薬物で感作したウサギから採取した血清中の抗体の検出を、Ouchterlony法、HA反応及びモルモット4h PCA反応により試みた。陽性対照として用いたPCG-BGGでは、いずれの方法によ

Table 8. Titration of antibodies against fleroxacin, ovalbumin (OA), bovine gamma-globulin (BGG) and penicillin G (PCG) in mouse sera by 1 h mouse PCA test

Immunogen	Strain	Dose ($\mu\text{g}/\text{body}$)	Adjuvant	Eliciting antigen	Immunization				
					once	twice	four times		
Fleroxacin	BALB/c	1	Alum	fleroxacin fleroxacin - HSA			0 ¹⁾ /10 ²⁾ 0/10		
	C3H/He			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	CD-1			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	BALB/c	10		fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	C3H/He			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	CD-1			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	BALB/c	100		fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	C3H/He			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	CD-1			fleroxacin fleroxacin - HSA			0/10 0/10		
	OA	BALB/c		10	Alum	OA			10/10 (2560 \leq) ³⁾
		CD-1							10/10 (5120 \leq)
	BGG	C3H/He		10	Alum	BGG			10/10 (640 ~ 2560)
CD-1							10/10 (80 ~ 640)		
Fleroxacin - BGG	C3H/He	1	Alum	fleroxacin fleroxacin - HSA	0/10 0/10	0/10 0/10			
		10		fleroxacin fleroxacin - HSA	0/10 0/10	0/10 0/10			
		100		fleroxacin fleroxacin - HSA	0/10 0/10	0/10 0/10			
PCG - BGG	C3H/He	1	Alum	PCG PCG - HSA	0/10 2/10(5)	0/10 9/10(5 ~ 20)			
		10		PCG PCG - HSA	0/10 8/10(5)	0/10 10/10(80 ~ 160)			
		100		PCG PCG - HSA	0/10 5/10(5)	0/10 10/108(160)			

¹⁾PCA titer is negative at 1/5 dilution of serum

²⁾positive/total

³⁾antibody titer

でも全例陽性であり、PCGで感作を行った場合、Ouchterlony法では検出されない個体がみられたが、HA反応及びPCA反応では抗PCG抗体の産生が認められた。しかし、fleroxacinあるいはfleroxacin-BGGで感作したウサギの血清は、上記のいずれの方法によって検出しても全

例陰性であり、fleroxacinに対する抗体産生は全く認められなかった。

ヒトで最も重篤な全身性アナフィラキシーに関与すると言われているIgE型抗体¹⁾の産生を検討する場合に、マウスは適した動物である。今回、マウスを用いた抗原

Table 9. Titration of antibodies against fleroxacin, ovalbumin (OA), bovine gamma-globulin (BGG) and penicillin G (PCG) in mouse sera by 4 h rat PCA test

Immunogen	Strain	Dose (μ g/body)	Adjuvant	Eliciting antigen	Immunization		
					once	twice	four times
Fleroxacin	BALB/c	1	Alum	fleroxacin			0 ¹⁾ /10 ²⁾
				fleroxacin - HSA			0/10
	C3H/He			fleroxacin			0/10
		fleroxacin - HSA				0/10	
	CD-1	10		fleroxacin			0/10
				fleroxacin - HSA			0/10
	BALB/c			fleroxacin			0/10
		fleroxacin - HSA				0/10	
	C3H/He	100		fleroxacin			0/10
	fleroxacin - HSA				0/10		
CD-1	fleroxacin				0/10		
	fleroxacin - HSA			0/10			
OA	BALB/c	10	Alum	OA			10/10 (160 ~ 1280) ³⁾
	CD-1						10/10 (640 ~ 1280)
BGG	C3H/He	10	Alum	BGG			10/10 (40 ~ 160)
	CD-1						8/10 (5 ~ 40)
Fleroxacin - BGG	C3H/He	1	Alum	fleroxacin	0/10	0/10	
				fleroxacin - HSA	0/10	0/10	
		10		fleroxacin	0/10	0/10	
	fleroxacin - HSA	0/10	0/10				
	100	fleroxacin	0/10	0/10			
	fleroxacin - HSA	0/10	0/10				
PCG - BGG	C3H/He	1	Alum	PCG	0/10	0/10	
				PCG - HSA	4/10(5 ~ 10)	3/10(5)	
		10		PCG	0/10	0/10	
	PCG - HSA	2/10(5 ~ 10)	10/10(10 ~ 160)				
	100	PCG	0/10	0/10			
	PCG - HSA	3/10(5)	5/10(5)				

¹⁾PCA titer is negative at 1/5 dilution of serum

²⁾positive/total

³⁾antibody titer

性試験では、H-2遺伝子の異なるBALB/c, C3H/He, およびCD-1系マウスを用い、種々の感作条件で薬物のIgE型抗体産生能について検討し、ラット4h PCA反応により血清中のIgE型抗体の検出を試みた。また、マウス1h PCA反応及びOuchterlony法も同時に実施して、IgG₁等その他の抗体産生についても検討した。その結果、陽性対照であるOA, BGG, あるいはPCG-BGGとAlumで感作したマウスでは、IgE型およびIgG型抗体産生が認められた。一方、floxacinあるいはfloxacin-BGGとAlumで感作したマウスの血清中には、いずれの方法で検出しても、floxacinに対する抗体は検出されなかった。

以上の成績から明らかなように、floxacinは、モルモット、ウサギ、及びマウスのいずれに対しても抗原性を示さなかったので、ヒトに対しても薬物アレルギーを惹起する可能性は低いものと思われる。

文 献

- 1) HIRAI K, AOYAMA H, HOSAKA M, OOMORI Y, NIWATA Y, SUZUE S, IRIKURA T : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AM-833, a new quinolone derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 1059~1066, 1986
- 2) LEVINE B B, OVARY Z : Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D- α -benzoylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for the hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med* 114 : 875~904, 1961
- 3) LEVINE B B : N(α -D-Penicilloyl)amines as univalent haptens inhibitors of antibody-dependent allergic reactions to penicillin. *J Med Pharm Chem* 5 : 1025~1034, 1962
- 4) 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(S-7) : 755~763, 1979
- 5) MAGNUSSON B, KLIGMAN A M : The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Derm* 52 : 268~276, 1969
- 6) 今井光信, 高橋 隆, 真弓 忠, 大河内一雄 : 受身赤血球凝集反応によるAu抗体の検出. *医学のあゆみ* 78 : 759~760, 1971
- 7) OVARY Z : Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Prog Allergy* 5 : 459~508, 1958
- 8) MOTA I, WONG D : Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sciences* 8(II) : 813~820, 1969
- 9) LANDSTEINER K : The specificity of serological reactions, Harvard University Press, 1945
- 10) 萩田 厚, 水島 裕 : 薬物の抗原性の検討—とくにIgE型抗体産生検討のための動物モデルについて. *医学のあゆみ* 100 : 812~814, 1977
- 11) 浦口健二, 上野芳夫, 粕谷 豊, 北川晴雄, 酒井文徳 トキシコロジー, アレルギー(村中正治) 154~173頁, 地人書館, 1978

ANTIGENICITY STUDY OF FLEROXACIN

SABURO HARA, NORIHIKO NAKANISHI and YASUO ABE

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

2399-1 Mitarai, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-01, Japan

Using various methods, we investigated the antigenicity of fleroxacin in guinea pigs, rabbits and mice.

1. For sensitization, fleroxacin was injected subcutaneously and intramuscularly with Freund's complete adjuvant (FCA) to guinea pigs once a week for three weeks. The sensitized guinea pigs showed neither active systemic nor active cutaneous anaphylaxis. The results of the guinea pig maximization test of fleroxacin were also negative.

2. Rabbits were sensitized intradermally and intramuscularly with fleroxacin + FCA or a fleroxacin-bovine γ -globulin (BGG) mixture + FCA once weekly for four weeks. Anti-fleroxacin antibodies were not detected by Ouchterlony's test, passive hemagglutination test or 4 h guinea pig passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test.

3. In mice, fleroxacin or fleroxacin-BGG mixture was injected intraperitoneally with $Al(OH)_3$ gel once, twice or four times. Anti-fleroxacin antibodies were not detected by Ouchterlony's test, 1 h mouse PCA or 4 h rat PCA test.

These results suggest that fleroxacin has no antigenicity in guinea pigs, rabbits or mice under the experimental conditions used.