

β-ラクタム剤過敏症におけるフルオレセインのアジュバント効果

—白血球遊走阻止因子産生誘発能の検討—

宇野 勝次¹⁾・八木 元広¹⁾・鈴木 康稔²⁾関根 理³⁾・山作房之輔³⁾¹⁾ 水原郷病院薬剤科*²⁾ 水原郷病院内科³⁾ 新潟東保健所

(平成4年7月13日受付・平成4年12月4日受理)

β-ラクタム剤 cefclidin (CFCL) と眼科検査薬フルオレセインナトリウムおよび眼科麻酔薬塩酸オキシプロカインの併用による眼科学的ボランティア試験で67% (12例中8例) に発疹が発現した。この発症機序を解明するために、β-ラクタム剤過敏症のリンホカインマーカーの1つである白血球遊走阻止因子 (LMIF) 産生能について検討した。方法は、正常人の末梢血から採取したリンパ球を 1×10^6 cells/ml に調製し、上記の3種類の薬剤と 37°C 、4日間 CO_2 培養器で培養し、反応上清液を分離した。遊走試験は、正常人から採取した顆粒球を 2.5×10^8 cells/ml に調製し、さきに分離した反応上清液に浮遊し、アガロース平板で24時間遊走を行い、遊走野の面積から遊走指数 (MI) 値を求めた。Phytohemagglutinin - P (PHA), フルオレセインナトリウム, 塩酸オキシプロカインの $1 \mu\text{g/ml}$ の各 MI 値 (平均値 ± 標準誤差) は 77.0 ± 2.29 (正常範囲, 99.6 ± 3.04), 88.3 ± 1.19 (99.6 ± 2.52), 96.0 ± 1.27 (100.2 ± 2.40), CFCL の $100 \mu\text{g/ml}$ の MI 値は 95.3 ± 1.21 (98.6 ± 2.38) で、PHA ($p < 0.0005$) およびフルオレセインナトリウム ($p < 0.001$) に有意差を認めた。また、PHA $0.2 \mu\text{g/ml}$, PHA+フルオレセインナトリウム, PHA+塩酸オキシプロカイン, PHA+CFCL の各 MI 値 (平均値 ± 標準誤差) は、 93.6 ± 3.03 , 85.0 ± 1.79 , 94.6 ± 1.97 , 91.4 ± 2.14 で、PHA+FR だけが PHA 単独に比べ有意 ($p < 0.005$) に低い MI 値を示した。以上の結果から、フルオレセインが LMIF 産生誘発作用、ならびに PHA の LMIF 産生増強作用を有していることが示され、フルオレセインのこれらの作用が β-ラクタム剤過敏症の誘発能を高めたのに大きく関与したものと考えられる。

Key words: cefclidin (CFCL), フルオレセイン, 薬疹, アジュバント効果, 白血球遊走阻止因子

β-ラクタム剤 cefclidin (CFCL) の一般臨床試験の発疹の発現率が2.8% (1,122例中31例) であったのに対し、CFCL と眼科検査薬フルオレセインナトリウムおよび眼科麻酔薬塩酸オキシプロカインの併用による眼科学的ボランティア試験 (投与方法は Table 1 に示す) で67% (12例中8例) に発疹が発現した^{1,2)}。この発症機序を解明するために、池澤ら^{3,4)} は、モルモットの遅延型過敏症モデルを用いて、CFCL による実験的薬疹をフルオレセインが増強することを明らかにした。

一方、著者ら^{5,6)} は、β-ラクタム剤過敏症患者の原因薬剤検出同定に白血球遊走阻止試験 (leucocyte migration

inhibition test, LMIT) が有効であり、その発現に白血球遊走阻止因子 (leucocyte migration inhibitory factor, LMIF) が高く関与していることを明らかにした。そこで、CFCL, フルオレセインナトリウム, および塩酸オキシプロカインの3薬剤に対して、人の免疫細胞 (リンパ球) を用いて LMIF 産生誘発能について検討し、上記の高頻度発疹の発症メカニズムの解明を試みた。

I. 材料および方法

1. 試験薬剤

化学構造を Fig. 1 に示した CFCL (エーザイ株式会社, 治験番号 E 1040-Z 020, Lot No. k 702200),

Table 1. Method of administration of drugs in the ophthalmologic test

Drug	Dialy dose & method of administration		Duration of administration (days)													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Cefclidin	2.0 g	(2×1) iv		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Fluorescein sodium	1.4 mg	(1×1) ed*	○**	○	○	○		○		○		○		○		○
Oxybuprocaine hydrochloride	0.4 mg	(1×1) ed*	○**	○	○	○		○		○		○		○		○
No. of cases of induced skin eruption													1	3	3	1

* ed: eye drops

** ○: administration three times a day

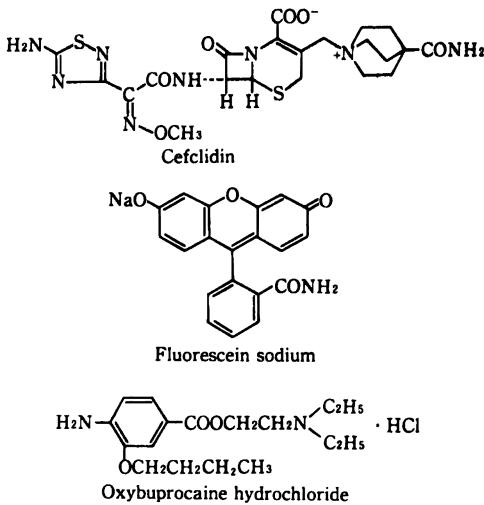


Fig. 1. Chemical structure of the agents.

フルオレセインナトリウム (和光純薬工業株式会社, 試薬特級ウランin, Lot No. PDJ 0193), および塩酸オキシブプロカイン (Aldrich Chemical Co. Lot No. 01408 DM) の3薬剤とマイトジェンの phytohemagglutinin-P (PHA, 生化学工場株式会社, Lot No. 41309) について試験を行った。

各薬剤の LMIF 産生誘発作用を検討する試験では, PHA, フルオレセインナトリウムおよび塩酸オキシブプロカインを 1 μg/ml, CFCL を 100 μg/ml の濃度で試験した。

3薬剤のマイトジェンによる LMIF 産生誘発を増強する作用を検討する試験では, PHA は, 0.2, 0.5, 1 μg/ml の3濃度, フルオレセインナトリウムと塩酸オキシブプロカインは 1 μg/ml, CFCL は 100 μg/ml の濃度を用いて, PHA 単独, PHA+フルオレセインナトリウム, PHA+塩酸オキシブプロカ

イン, PHA+CFCL の薬剤群で試験した。

2. LMIF 産生誘発試験^{5,6)}

正常人のヘパリン加末梢血から Ficoll-Paque 液 (Pharmacia) を用いた比重遠心法によりリンパ球 (中間層) を採取し, Hanks 液 (Gibco) で洗浄後, 1.25×10^6 cells/ml に調製して, 培養液 (10% 馬血清と 10 mM HEPES-buffer 添加の TC-199 medium, Gibco) に浮遊した。このリンパ球浮遊液 800 μl を試験薬剤溶液 200 μl と共に 5%-CO₂ インキュベーターで 37°C, 4 日間培養し, 上清液を分離し, -20°C に凍結保存した。

次に, 遊走試験では, 正常人のヘパリン加末梢血を 1/4 容の 5% デキストラン生理食塩水と混合し, 37°C, 40~60 分間放置後, 上清液 (白血球層) を採取し, この上清液から Ficoll-Paque 液により顆粒球 (沈殿層) を採取し, 赤血球の溶血および洗浄後, 遊走用白血球とした。この遊走用白血球をさきに分離保存した上清液に細胞数が 2.5×10^6 cells/ml になるように浮遊し, 1% アガロース添加の培養液で作成した平板の各ウエル (直径 3 mm) に 7 μl ずつ分注し, 5%-CO₂ インキュベーターで 37°C, 24 時間培養後, イミノビュウワー (常光株式会社) で白血球の遊走野の面積を測定した。

各薬剤に対する遊走指数 (MI) 値^{5,6)} は, (1) 式より求めた。また, 各薬剤の正常人白血球の遊走能に対する影響を調べるために, リンパ球と反応培養せずに各薬剤のみを溶解した培養液に浮遊した正常人白血球についても遊走試験を行い, 各薬剤の MI の対照値を (2) 式により求めた。

MI (%)

$$= \frac{\text{migration area in supernate with drug}}{\text{migration area in supernate without drug}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

MI(%)

$$= \frac{\text{migration area in medium with drug}}{\text{migration area in medium without drug}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

II. 結 果

1. LMIF 産生誘発作用

各薬剤のリンパ球に対する LMIF 産生誘発作用を Table 2 に示した。PHA, CFCL, フルオレセインナトリウム, および塩酸オキシブプロカインの対照 (リンパ球と非培養) の MI 値 (平均値±標準誤差) は, 99.6±3.04, 98.6±2.38, 99.6±2.52, および 100.2±2.40 で, 各薬剤とも白血球の遊走能に与える影響はほとんどなかった。一方, 各薬剤のリンパ球との反応上清液での MI の平均値±標準誤差は, 77.0±2.29, 95.3±1.21, 88.3±1.19, 96.0±1.27 を示し, 対照値との t 検定では PHA ($p < 0.0005$) とフルオレセインナトリウム ($p < 0.001$) が有意に低値を示した。したがって, フルオレセインナトリウムが, PHA と同様に LMIF 産生誘発能を有することが示された。

2. マイトジェンの LMIF 産生誘発能を増強する作用

各薬剤の PHA の LMIF 産生誘発能を増強する作用を Table 3 に示した。PHA が 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の場合, PHA 単独, PHA+CFCL, PHA+フルオレセインナトリウム, および PHA+塩酸オキシブプロカインの MI の平均値±標準誤差は, 93.6±3.03, 91.4±2.14, 85.0±1.79, 94.6±1.96 を示し, Wilcoxon U 検定で PHA+フルオレセインナトリウムが

PHA 単独より有意 ($p < 0.005$) に低値を示した。また, PHA の濃度が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ および 1 $\mu\text{g/ml}$ の場合でも, Table 3 に示すように, PHA+フルオレセインナトリウムのみが, PHA に比べ有意に ($p < 0.01$) 低い MI 値を示した。したがって, フルオレセインナトリウムが PHA の LMIF 産生能を増強する作用を有することが示された。

III. 考 察

CFCL の発疹の発現率が一般臨床試験では 2.8% であったのに対し, 眼科学的ボランティア試験では 67% と有意 ($p < 0.00001$) に高い発現率を示した。そこで, ボランティア試験と一般臨床試験との投与薬剤の相違を検討した結果, ボランティア試験では Table 1 に示すような投与方法で CFCL 以外にフルオレセインナトリウムと塩酸オキシブプロカインが投与されていた。池澤ら^{1,3,4)} は, モルモットの遅延型過敏症モデルを用いて検討し, 実験的薬疹の誘発能を有する薬剤は β -ラクタム系抗生剤の CFCL だけであるが, フルオレセインが CFCL による実験的薬疹を増強することを明らかにした。したがって, ボランティア試験でも, CFCL による発疹の発現をフルオレセインが増強した可能性が示唆されたが, このようなフルオレセインのアジュバント効果はヒトの場合についても言えるのか, また, フルオレセインはどのような免疫学的機序によりアジュバント効果を示すのかが, 次の重要な問題点となってくる。

一方, 著者ら^{5,6)} は, β -ラクタム剤過敏症患者の免疫細胞 (感作リンパ球) を薬剤抗原で刺激した場合に産生される LMIF が過敏症の発現に大きく関与する

Table 2. Production of leukocyte migration inhibitory factor in response to phytohemagglutinin, cefclidin, fluorescein sodium and oxybuprocaine hydrochloride

Agent	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	MI in reactions*	MI in the control**
Phytohemagglutinin-P	1	77.0±2.29	99.6±3.04
Cefclidin	100	95.3±1.21	98.6±2.38
Fluorescein sodium	1	88.3±1.19	99.6±2.52
Oxybuprocaine hydrochloride	1	96.0±1.27	100.2±2.40

* MI in reactions: leukocyte migration indices (mean±SE, n=10) in the reaction between the agent and lymphocytes.

** MI in the control: leukocyte migration indices (mean±SE, n=5) of agents not reacted with lymphocytes.

Significantly different (a: $p < 0.001$, b: $p < 0.0005$), t-test.

Table 3. Enhancing effect of cefclidid, fluorescein sodium and oxybuprocaine hydrochloride on the production of leukocyte migration inhibitory factor in response to phytohemagglutinin

Agent	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	MI**	Statistical analysis***
PHA* alone	0.2	93.6 \pm 3.03	} $p < 0.005$
PHA+cefclidid	0.2+100	91.4 \pm 2.14	
PHA+fluorescein sodium	0.2+ 1	85.0 \pm 1.79	
PHA+oxybuprocaine hydrochloride	0.2+ 1	94.6 \pm 1.96	
PHA* alone	0.5	83.8 \pm 4.04	} $p < 0.01$
PHA+cefclidid	0.5+100	82.4 \pm 4.59	
PHA+fluorescein sodium	0.5+ 1	75.6 \pm 3.27	
PHA+oxybuprocaine hydrochloride	0.5+ 1	86.0 \pm 3.54	
PHA* alone	1	80.8 \pm 2.92	} $p < 0.01$
PHA+cefclidid	1 +100	77.8 \pm 2.56	
PHA+fluorescein sodium	1 + 1	72.4 \pm 3.31	
PHA+oxybuprocaine hydrochloride	1 + 1	82.8 \pm 2.97	

* PHA: phytohemagglutinin-P.

** MI: leukocyte migration indices (mean \pm SE, n=5).

*** Statistical analysis: Willcoxon U-test.

ことをすでに明らかにしている。また、吉田は⁷⁾, *in vitro* で作ったリンホカインを生体内に注射して抗原特異的遅延型過敏反応(リンホカインを皮内に注射すると時間的に非常に短縮されて、肉眼のおよび顕微鏡的にも典型的遅延型皮内反応と同様の反応)を再現できるとしている。そこで、薬疹の高頻度発現に関与したと思われるCFCL, フルオレセインナトリウムおよび塩酸オキシプロカインのLMIF産生系におよぼす影響について正常人のリンパ球を用いて検討した。その結果、Table 2に示されるように、フルオレセインナトリウムだけがマイトジェンのPHAと同様にLMIF産生誘発作用を有し、またさらに、Table 3に示されるように、フルオレセインナトリウムだけがPHAのLMIF産生誘発能を増強する作用を有していることが明らかにされた。したがって、フルオレセインはリンパ球の炎症性リンホカイン産生誘発作用を有し、抗原であるCFCLによる感作リンパ球の炎症性リンホカイン産生誘発を増強することが示唆される。ポランティア試験における発疹の高頻度発現は、池澤ら^{1,3,4)}のモルモット薬疹モデルで示されたように、CFCLによる薬疹をフルオレセインが増強したものと考えられると同時に、そのアジュバント効果の免疫学的機序は、フルオレセインのリンパ球に対する炎症性リンホカイン産生誘発作用が重要な要因の一つであると考えられる。なお、フルオレセインの副作用発現には、補体活性⁸⁾、蛋白結合性⁹⁾、血液粘張性の変化¹⁰⁾

等の種々の作用の関与も否定できないと考えられるが、この点については今後の検討を待ちたい。

今後の問題点としては、フルオレセインが他のCFCL以外の薬剤(特に β -ラクタム系抗生剤)による過敏症にもアジュバント効果を示すかどうかである。池澤ら^{1,3,4)}のモルモット薬疹モデルでは、フルオレセインがペナム剤のsulbenicillin(SBPC)やセフェム剤のcefsulodin(CFS)に対してもアジュバント効果を有していることが明らかにされている。さらに、フルオレセインがリンパ球の炎症性リンホカインの産生誘発作用を有している以上、 β -ラクタム系抗生剤や解熱鎮痛剤のようにリンパ球への感作力が高い(抗原性の高い)薬剤の過敏症の発現をフルオレセインが増強する可能性は否定できない。したがって、抗原性の高い薬剤とフルオレセインの併用は十分注意する必要があると考える。ただし、今までの眼圧試験でフルオレセインのアジュバント効果があまり問題とならなかったこと、あるいはTable 1に示されるようにフルオレセインナトリウムが7回以上の投与でCFCLの発疹を誘発していることから、フルオレセインは1, 2回の投与ではなく、かなりの回数(期間)の投与ではじめてアジュバント効果を示すものと考えられる。この機序については今後多角的に検討されなければならないが、LMIF産生に関しては以下のように推測される。今回データとして示さなかったが、フルオレセインはリンパ球との反応培養期間が1日、2日で

は LMIF を産生しないこと、さらにマイトジェンの PHA も 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではリンパ球との反応培養期間が 1 日で LMIF を産生するが、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では LMIF を産生するには 4 日間の反応培養期間を要することを著者らは確認している。したがって、LMIF は、強い刺激に対しては早く短時間で産生されるが、弱い刺激に対しては徐々に長時間掛かって産生されると考えられる。また、フルオレセインの 2% 溶液を両眼に点眼 (1 滴の点眼を 0.05 ml と考えると 2 mg/ml の点眼) した場合、フルオレセインの血中内濃度は、投与後 45 分と 75 分で、それぞれ 36 と 40 ng/ml であり、血中内半減期は 2~3 時間¹²⁾と報告されている。ボランティア試験でのフルオレセインの血中濃度は、1.4 mg/ml 点眼されているので約 25~28 ng/ml と考えられる。すなわち、フルオレセインは、今回の LMIF 産生誘発作用の実験 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の約 40 分の 1 以下の濃度しか血中に存在しないことになる。したがって、フルオレセインの炎症性リンホカイン産生誘発能が PHA ほど強くない点と、フルオレセイン点眼の血中濃度が低い点を考慮すると、フルオレセイン点眼によるリンホカイン産生誘発には長時間を要し、フルオレセインの頻回投与によって初めて β -ラクタム剤過敏症の発現を増強するものと推測される。

さらに問題を発展させると、フルオレセインナトリウム以外に薬剤過敏症の発現を増強する薬剤があるかという点である。この点については今後多方面から検討されなければならないが、クマリン (1,2-benzopyrone) も PHA のマイトジェン作用を増強するという報告があり¹³⁾、注目する必要がある。また、近年 interleukin-2 (IL-2)、interferon- γ (INF- γ) や tumor necrosis factor (TNF) などのサイトカインが臨床治療に用いられるようになってきたが、このようなサイトカインは免疫細胞を賦活すると同時に、過敏症の発現を増強する可能性もあり、今後十分留意する必要があると考える。

多剤併用になりがちな今日の薬物治療では、薬剤が抗原としてだけでなく、薬剤過敏症発現の増強因子として関与する場合は問題となってくると考える。

文 献

1) 池澤義郎, 中島 弘, 杉本芳樹, 勝 鎌政: β -ラクタ

ム剤過敏症におよぼす眼科検査薬フルオレセインの影響。アレルギー (第 40 回日本アレルギー学会号) 39: 1216, 1990

- 2) Tone T, Ikezawa Z, Nishioka K, Aoki S, Miyata M: Enhancing effects of fluorescein on β -lactam rash I: High incidence of cefclidin rashes in an ophthalmological volunteer trial. *J Dermatol (Tokyo)* 19: 534~536, 1992
- 3) 池澤義郎, 齊藤すみ, 金 秀沢, 吉田貞夫: 薬疹の発症に影響を及ぼす各種因子。日本病院薬剤師会雑誌 27: 1359~1365, 1991
- 4) Ikezawa Z, Sugihara Y, Ueno J: Enhancing effects of fluorescein on β -lactam rash II: Enhancing effects of fluorescein on generalized rash induced by β -lactam antibiotics in guinea pigs. *J Dermatol (Tokyo)* 19: 537~543, 1992
- 5) Uno K, Yamasaku F: Application of leucocyte migration tests to detection of allergenic drugs in patients with hypersensitivity to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 24: 241~250, 1989
- 6) 宇野勝次: 白血球遊走促進および阻止因子の検出からみた β -ラクタム剤過敏症の発現機構の検討。アレルギー 39: 1605~1611, 1990
- 7) 吉田 彪: DTH とリンホカイン。特集 遅延型アレルギー (DTH) の機序をめぐって。臨床免疫 17: 198~202, 1985
- 8) 石田常康, 山口とし美, 河島敏夫: けい光剤フルオレセインナトリウム溶液の補体系におよぼす影響について。日本眼科紀要 32: 880~887, 1981
- 9) 瀬戸千寿, 新家 真, 高瀬正弥: フルオレセインモノグルクロイド, 血しょう中タンパク結合率。あたらしい眼科 2: 387~389, 1985
- 10) Roenblum W I: Effects of blood pressure and blood viscosity on fluorescein transit time in the cerebral microcirculation in the mouse. *Circ Res* 27: 825~833, 1970
- 11) Mattern J, Mayer P R: Excretion of fluorescein into breast milk. *Am J Ophthalmol* 109: 598~599, 1990
- 12) Larsen M, Loft S, Hommel E, Lund-Andersen H: Fluorescein and fluorescein glucuronide in plasma after intravenous injection of fluorescein. *Acta Ophthalmol* 66: 427~432, 1988
- 13) Marshall M E, Conley D, Hollingsworth P, Brown S, Thompson J S: Effects of coumarin (1, 2-benzopyrone) on lymphocyte, natural killer cell, and monocyte functions in vitro. *J Biol Response Mod* 8: 70~85, 1989

Potentiating effect of fluorescein sodium on β -lactam hypersensitivity

—Studies on ability inducing the production of leukocyte migration inhibitory factor—

Katsuji Uno and Motohiro Yagi

Pharmacy, Suibarago Hospital, Okayama-cho 13-23, Suibara-machi,
Kitakanbara-gun, Niigata 959-21, Japan

Yasutoshi Suzuki and Osamu Sekine

Department of Internal Medicine, Suibarago Hospital

Fusanosuke Yamasaku

Niigata-higashi Health Center

When cefclidin (a β -lactam antibiotic), fluorescein sodium (an ophthalmologic test agent) and oxybuprocaine hydrochloride (an ophthalmologic test anesthetic) were administered in combination, 67% (8/12) of the ophthalmologic test volunteers developed skin eruption. To clarify the pathogenetic mechanism, we assessed ability to produce leukocyte migration inhibitory factor (LMIF), one of the lymphokines involved in β -lactam hypersensitivity. Lymphocytes collected from the peripheral blood of healthy humans were adjusted to a cell count of 1×10^6 cell/ml and incubated with the three drugs mentioned above at 37°C for four days in a CO_2 -incubator. The supernatant was isolated, and the migration test was performed as follows. Granulocytes collected from healthy humans were adjusted to a density of 1×10^6 cell/ml, suspended in the supernatant fluid which had been isolated as described above, and migrated on an agarose plate for 24 hours. Migration index (MI) values were calculated from the area of the field of migration. The MI values (mean \pm SE) for $1 \mu\text{g/ml}$ concentrations of phytohemagglutinin (PHA), fluorescein sodium, and oxybuprocaine hydrochloride were 77.0 ± 2.29 (normal range, 99.6 ± 3.04), 88.3 ± 1.19 (99.6 ± 2.52), and 96.0 ± 1.27 (100.2 ± 2.40), respectively. The MI value for a $100 \mu\text{g/ml}$ concentration of cefclidin was 95.3 ± 1.21 (98.6 ± 2.38). A significant difference was found in both PHA ($\rho < 0.0005$) and fluorescein sodium ($\rho < 0.001$). The MI values for PHA ($0.2 \mu\text{g/ml}$), PHA+fluorescein sodium, PHA+oxybuprocaine hydrochloride, and PHA+cefclidin were 93.6 ± 3.03 , 85.0 ± 1.79 , 94.6 ± 1.97 and 91.4 ± 2.14 , respectively. PHA+fluorescein sodium was found to have a significantly ($\rho < 0.005$) lower MI value than PHA alone. Our findings indicate that fluorescein sodium induces LMIF production by lymphocytes and that it potentiates LMIF induction by PHA, and these effect may be largely involved in increasing its ability to induce β -lactam hypersensitivity.