

Temafloracinの抗原性試験

渡辺 潔・水戸誠二・浅野裕三・有行史男
田辺製薬株式会社安全性研究所*

新規合成抗菌薬であるtemafloxacin(TMFX)の抗原性(免疫原性および誘発原性)を、モルモットおよびマウスを用いて検討した。

モルモットの場合は、TMFXの免疫原性(主としてIgG抗体産生能)および誘発原性(I型アレルギー反応誘発能)を能動性全身アナフィラキシー(ASA)、同種4時間受身皮膚アナフィラキシー(PCA)およびゲル内沈降反応により検討した。TMFXを経口投与(臨床適用経路)あるいはフロイント完全アジュバンド(FCA)と共に皮下投与したモルモットおよびそれらから得られた抗血清をTMFXによる惹起のみならず、TMFXのアセチル体とウシ血清アルブミンとの結合物(TMFX-BSA)で惹起した際にも、ASAおよびPCA反応は陰性を示し、さらにTMFX-BSAで惹起したゲル内沈降反応も陰性を示し、モルモットにおいてTMFXの免疫原性は認められなかった。また、TMFXのアセチル体と卵白アルブミンとの結合物(TMFX-OVA)をFCAと共に皮下投与し、TMFXのアセチル体に対する抗体の産生が確認されたモルモットおよびそれらから得られた抗血清に対して、TMFX単独による惹起では、ASAおよびPCA反応は陰性を示し、TMFXの誘発原性も認められなかった。

マウスの場合は、免疫原性(IgE抗体産生能)および誘発原性を、ラットをレシピエントとした24時間PCA反応により検討した。その結果、モルモットを用いた試験同様、TMFXを単独で投与した際には、免疫原性は認められず、また、TMFX単独で惹起した際には、誘発原性も認められなかった。

以上の成績から、TMFXはモルモットおよびマウスにおいて、抗原性を有さないものと判断された。

Key words : TMFX, モルモット, マウス, 抗原性, temafloxacin

塩酸テマフロキサシン(temafloxacin; TMFX)は、Abbott社において開発されたキノロン系抗菌薬である。TMFXは、既存のニューキノロン系薬剤よりも広範囲な抗菌スペクトルを持ち、吸収が良く、かつ持続性があり、安全域の広い化合物の開発を目的として合成されたアリルフロロキノロン誘導体である。TMFXの抗原性(免疫原性および誘発原性)を、モルモットおよびマウスを用いて検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 試験物質および試薬

1) 被験物質

被験物質のTMFXは、吸湿性を有し、水に溶けにくい物質である。本試験には、Abbott社で合成されたLot No. 28-929-AIを用いた。

2) TMFXと蛋白との結合物

TMFXと蛋白との結合物として、TMFXのアセチル体と卵白アルブミン(OVA, Lot No. 19F-8105, Sigma

社)との結合物(TMFX-OVA)およびウシ血清アルブミン(BSA, Lot No. 79F9302, Sigma社)との結合物(TMFX-BSA)を用いた。

TMFXのピペラジン環の遊離アミノ基をアセチル基で保護したTMFXのアセチル体のカルボキシル基に、OVAあるいはBSAの遊離アミノ基を、混合酸無水物法によりアミド結合させ、TMFXのアセチル体と蛋白との結合物を作製した。

TMFXのアセチル体の合成ならびに蛋白との結合物の作製および精製(透析)は、当社応用生化学研究所で行われ、使用まで-40℃で保存した。

本試験に用いたTMFX-蛋白結合物の試験開始時における蛋白1分子当りのハプテン結合分子数は、TMFX-OVA結合物で4.8分子、TMFX-BSA結合物で15.4分子であった。

3) 陰性対照および陽性対照物質

陽性対照物質として、OVA(上述)を用い、モルモッ

トを用いた試験では、陰性対照物質として、生理食塩液(大塚製薬)を用いた。

4) 媒体

蒸留水で作製した0.2%メチルセルロース400(MC 400, 片山化学工業)溶液, 注射用蒸留水(大塚製薬)および生理食塩液(大塚製薬)を用いた。

5) 免疫増強剤

フロイント完全アジュバンド(FCA, Lot No. 784560, Difco社)および水酸化アルミニウムゲル(Alum, 濃度20mg/ml, 自家調製)を用いた。

2. 使用動物および飼育条件

1) 使用動物

感作用動物として、雌性Std: Hartley系モルモット(日本エスエルシー), 雄性BALB/cCrSlc系およびC3H/HeSlc系マウス(日本エスエルシー)を用いた。モルモットは3週齢で購入し, 6週齢(体重329~436g)より試験に供した。マウスは4週齢で購入し, 7週齢(BALB/cで22.0~25.6g, C3H/Heで23.9~26.9g)より試験に供した。

受身皮膚アナフィラキシー(PCA)反応のレシピエント用動物として、雌性Std: Hartley系モルモット(日本エスエルシー)および雄性Slc:SD系ラット(日本エスエルシー)を用いた。モルモットは3週齢で購入し, 6あるいは7週齢(体重351~486g)で試験に供した。ラットは9週齢で購入し, 12あるいは13週齢(359~462g)で試験に供した。

モルモットは室温23±2℃, 湿度55±5%, 換気12

回以上/時間および12時間照明/日に設定された動物室で, モルモット専用ケージ(日本クレア)に収容し, 固形飼料(RC4, オリエンタル酵母工業)および水(水道水)は自由に摂取させた。

マウスおよびラットは室温23±1℃, 湿度55±5%, 換気12回以上/時間および12時間照明/日に設定された動物室で, マウスはポリカーボネイト製ケージ(日本クレア)に収容し, ラットは4連金網ケージ(夏目製作所)に個別収容し, 固形飼料(CRF-1, 放射線滅菌15kGy, オリエンタル酵母工業)および水(水道水)は自由に摂取させた。

3. 感作群, 感作方法および抗血清の採取

1) モルモット

Table 1に示す感作群を設けた。AおよびB群のモルモットには, 0.2% MC 400溶液で調製したTMFXの0.2%溶液あるいは1%懸濁液を, ゴム製カテーテルを用いて5ml/kg宛(A群は10mg/kg, B群は50mg/kg)で15日間(5日連続/週, 3週間)経口投与した。C群のモルモットには, 0.2% MC 400溶液で調製したTMFXの5%懸濁液とFCAとを等量混合して作製した乳化液の0.4ml(10mg/匹)を, 背部皮下の2ヵ所(各0.2mlずつ)に7日間隔で3回投与した。DおよびE群のモルモットには, 生理食塩液で調製したTMFX-OVAの0.5%溶液あるいはOVAの0.5%溶液とFCAとを等量混合して作製した乳化液の0.4ml(1mg/匹)を, 背部皮下の2ヵ所(各0.2mlずつ)に7日間隔で3回投与した。F群のモルモットには, 生理食塩液とFCAとを等量混合して作製し

Table 1. Sensitization groups of temafloxacin in guinea pigs

Group	Sensitization antigen (dose × times)	Route	Adjuvant	No. of animals
A	TMFX (10 mg/kg × 15 ^{*1})	p.o.	—	10
B	TMFX (50 mg/kg × 15 ^{*1})	p.o.	—	10
C	TMFX (10 mg/animal × 3 ^{*2})	s.c.	FCA	10
D	TMFX-OVA (1 mg/animal ^{*3} × 3 ^{*2})	s.c.	FCA	10
E	OVA (1 mg/animal × 3 ^{*2})	s.c.	FCA	10
F	Physiological saline (0.2 ml/animal × 3 ^{*2})	s.c.	FCA	10

*1: Five successive days a week for 3 weeks *2: Once a week for 3 weeks *3: 1 mg/animal in terms of protein
TMFX: temafloxacin TMFX-OVA: TMFX-ovalbumin FCA: Freund's complete adjuvant

た乳化液の0.4mlを、背部皮下の2ヵ所(各0.2mlずつ)に7日間隔で3回投与した。

AおよびB群のモルモットからは最終感作17日後に、C～F群のモルモットからは最終感作21日後に、心臓穿刺により採血し、遠心分離して得られた血清(抗血清)を使用まで-20℃で保存した。F群の血清はプールし、使用まで-20℃で保存した。

なお、A群の10mg/kg投与は臨床推定量に相当する。

2) マウス

Table 2に示す感作群(A-1～A-5群はBALB/cマウス、B-1～B-5群はC3H/Heマウス)を設けた。A-1、A-2、B-1およびB-2群のマウスには、0.2% MC 400溶液で調製したTMFXの0.2%溶液あるいは2%懸濁液を、胃ゾンデを用いて体重10gあたり0.05ml宛(A-1、B-1群は10mg/kg、A-2、B-2群は100mg/kg)で15日間(5日連続/週、3週間)経口投与した。A-3およびB-3群のマウスには、注射用蒸留水で調製した0.01% TMFX溶液とAlumとの等量混合液の0.2ml(10 μ g/匹)を18日間隔で2回腹腔内に投与した。A-4およびB-4群のマウスに

は、生理食塩液で調製した0.01% TMFX-OVA溶液とAlumとの等量混合液の0.2ml(10 μ g/匹)を18日間隔で2回腹腔内に投与した。A-5およびB-5群のマウスには、生理食塩液で調製した0.01% OVA溶液とAlumとの等量混合液の0.2ml(10 μ g/匹)を18日間隔で2回腹腔内に投与した。

すべての群のマウスから最終感作10日後に、腹大静脈より全採血し、遠心分離して得られた血清(抗血清)を生理食塩液で5倍希釈し、使用まで-20℃で保存した。

なお、A-1およびB-1群の10mg/kg投与は臨床推定量に相当する。

4. 観察項目

1) モルモットを用いた能動性全身アナフィラキシー(ASA)反応

AおよびB群のモルモットは最終感作20日後に、C、DおよびE群のモルモットは最終感作25日後に、F群のモルモットは最終感作24日後にASA反応に供した。A～DおよびF群の各5匹のモルモットには、注射用蒸

Table 2. Sensitization groups of temafloxacin in BALB/c mice (groups A-1 to A-5) and C3H/He mice (groups B-1 to B-5)

Group	Sensitization antigen (dose \times times)	Route	Adjuvant	No. of animals
A-1	TMFX (10 mg/kg \times 15 ^{*1})	p.o.	—	5
A-2	TMFX (100 mg/kg \times 15 ^{*1})	p.o.	—	5
A-3	TMFX (10 μ g/animal \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5
A-4	TMFX-OVA (10 μ g/animal ^{*3} \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5
A-5	OVA (10 μ g/animal \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5
B-1	TMFX (10 mg/kg \times 15 ^{*1})	p.o.	—	5
B-2	TMFX (100 mg/kg \times 15 ^{*1})	p.o.	—	5
B-3	TMFX (10 μ g/animal \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5
B-4	TMFX-OVA (10 μ g/animal ^{*3} \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5
B-5	OVA (10 μ g/animal \times 2 ^{*2})	i.p.	Alum	5

^{*1}: Five successive days a week for 3 weeks ^{*2}: Two times at intervals of 18 days ^{*3}: 10 μ g/animal in terms of protein

Alum: aluminum hydroxide gel

留水で調製した0.5% TMFX溶液の1mlあるいはTMFX-BSA原液の0.8ml(TMFX-BSAを5mg含有)を後肢静脈内に惹起投与した。E群の10匹のモルモットには、生理食塩液で調製した0.5% OVA溶液の1mlを後肢静脈内に惹起投与した。惹起投与後、アナフィラキシー症状発現の有無を観察し、アナフィラキシー症状の程度を下記の基準に従い判定した。

I(陰性): 惹起20分間以内に下記症状が見られない

II(軽度): 顔や耳をこする

III(中等度): 咳嗽発作, 歩行不安定を呈する

IV(強度): 痙攣, 横転を呈するが, 2時間以内に死亡しない

V(死亡): 2時間以内に死亡する

2) モルモット血清を用いた同種PCA反応

Ovaryの方法¹⁾に従い, 同種4時間PCA反応を行い, モルモット血清中の特異IgG₁抗体の有無および誘発原性の有無を検討した。すなわち, A~F群のモルモットより得られた抗血清およびその希釈血清(生理食塩液で希釈)の0.1mlを, 正常レシピエントモルモットの背部皮内に投与した。抗血清の皮内投与4時間後に, A~D群のモルモットより得られた抗血清を投与したレシピエントには, 生理食塩液で調製した1% Evans blue(Merck社)溶液の0.5mlを後肢静脈より投与した後, 注射用蒸留水で調製した0.5% TMFX溶液の1mlあるいはTMFX-BSA原液の0.8ml(TMFX-BSAを5mg含有)を直ちに後肢静脈より投与した。E群のモルモットより得られた抗血清を投与したレシピエントには, 生理食塩液で調製した1% OVA溶液と1% Evans blue溶液との等量混合液の1mlを後肢静脈より投与した。惹起投与30分後に, レシピエントを放血死させ, 背部皮膚を剥離し, 抗血清投与部位での色素漏出の有無を観察し, 色素斑の直径(短径+長径)/2が5mm以上のものをPCA反応陽性とし, PCA抗体価は陽性となる血清の希釈倍数で示した。

3) モルモット血清を用いたゲル内沈降反応

Ouchterlonyの方法²⁾に従い, リン酸緩衝生理食塩液(0.1% Na₂S₂O₃含有)で作製した1%寒天(特製寒天末, Difco社)ゲルを用い, 沈降反応を実施した。抗原液としては, 生理食塩液で調製した0.5% TMFX-BSA溶液および0.5% OVA溶液を用い, 湿度を保ちながら37°Cで2日間インキュベーションし, 沈降線形成の有無を観察した。

4) マウス血清を用いた異種PCA反応

Motaらの方法³⁾に従い, ラットを用いた異種24時間PCA反応を行い, マウス血清中の特異IgE抗体の有無

および誘発原性の有無を検討した。すなわち, A-1~A-5およびB-1~B-5群のマウスより得られた希釈抗血清(生理食塩液で希釈)の0.05mlを, 正常ラットの背部皮内に投与した。抗血清の皮内投与24時間後に, A-1~A-4およびB-1~B-4群のマウスより得られた抗血清を投与したラットには, 1% Evans blue溶液の0.5mlを後肢静脈より投与した後, 注射用蒸留水で調製した0.5% TMFX溶液の1mlあるいはTMFX-BSA原液の0.8ml(TMFX-BSAを5mg含有)を直ちに後肢静脈より投与した。A-5およびB-5群のマウスより得られた抗血清を投与したラットには, 生理食塩液で調製した1% OVA溶液と1% Evans blue溶液との等量混合液の1mlを後肢静脈より投与した。惹起投与30分後に, ラットを断頭により放血死させ, 背部皮膚を剥離し, 抗血清投与部位での色素漏出の有無を観察し, 色素斑の直径(短径+長径)/2が5mm以上のものをPCA反応陽性とし, PCA抗体価は陽性となる血清の希釈倍数で示した。

III. 結 果

1. モルモットを用いたASA反応

結果をTable 3に示す。TMFX感作群(A~C群)のモルモットにおいては, 陰性対照の生理食塩液感作群(F群)同様, TMFXあるいはTMFX-BSAの惹起投与によるアナフィラキシー症状の発現は観察されなかった。また, TMFX-OVA感作群(D群)のモルモットにおいては, TMFXの惹起投与によるアナフィラキシー症状の発現は観察されなかったが, TMFX-BSAの惹起投与により, 5例全例がアナフィラキシー症状を発現し死亡した。一方, 陽性対照のOVA感作群(E群)のモルモットにおいては, OVAの惹起投与により, 10例全例がアナフィラキシー症状を発現し死亡した。

2. モルモット血清を用いた同種PCA反応

結果をTable 4に示す。TMFX感作群(A~C群)のモルモットの血清は, TMFXおよびTMFX-BSA惹起に対して, いずれもPCA反応は陰性を示した。また, TMFX-OVA感作群(D群)のモルモットの血清は, TMFX惹起に対して, PCA反応は陰性を示したが, TMFX-BSA惹起に対しては, いずれも4096倍以上のPCA抗体価を示した。一方, 陽性対照のOVA感作群(E群)のモルモットの血清は, OVAの惹起に対して, いずれも6400倍以上のPCA抗体価を示した。

3. モルモット血清を用いたゲル内沈降反応

結果をTable 5に示す。TMFX感作群(A~C群)のモルモットの血清では, TMFX-BSAに対して, 沈降線の形成は観察されなかったが, TMFX-OVA感作群(D群)のモルモットの血清では, TMFX-BSAに対して, 9

Table 3. Active systemic anaphylaxis in guinea pigs

Group	Challenge antigen (mg/animal)		No. of animals	Grade of anaphylaxis				
				I	II	III	IV	V
A	TMFX	(5)	5	5				
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5				
B	TMFX	(5)	5	5				
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5				
C	TMFX	(5)	5	5				
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5				
D	TMFX	(5)	5	5				
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5					5
E	OVA	(5)	10					10
F	TMFX	(5)	5	5				
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5				

*1: 5 mg/animal in terms of protein

Grades of anaphylaxis were evaluated as follows:

I (Negative): No occurrence of anaphylactic signs within 20 minutes

II (Slight): Scratching of face and/or ears

III (Moderate): Coughing attack and/or ataxia

IV (Severe): Convulsions and lateral turning (no occurrence of death within 2 hours)

V (Death): Occurrence of death within 2 hours

TMFX-BSA: TMFX-bovine serum albumin

Table 4. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs using guinea pig antisera

Group	Challenge antigen (mg/animal)		No. of antisera	PCA titer		
				- ^{*2}	4096 ≤	6400 ≤
A	TMFX	(5)	10	10		
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10		
B	TMFX	(5)	10	10		
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10		
C	TMFX	(5)	10	10		
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10		
D	TMFX	(5)	10	10		
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10		10	NT ^{*3}
E	OVA	(5)	10			10

*1: 5 mg/animal in terms of protein *2: negative with undiluted serum *3: not tested

PCA: passive cutaneous anaphylaxis

Table 5. Diffusion-in-gel precipitin using guinea pig antisera

Group	Challenge antigen (mg/ml)		No. of antisera	Precipitin line	
				- ^{*2}	+ ^{*3}
A	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10	
B	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10	
C	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	10	
D	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	10	1	9
E	OVA	(5)	10		10

*1: 5 mg/ml in terms of protein *2: Precipitin line formation was not observed

*3: Precipitin line formation was observed

血清で沈降線の形成が観察された。一方、陽性対照のOVA感作群(E群)のモルモットの血清では、OVAに対して、全血清で沈降線の形成が観察された。

4. マウス血清を用いた異種PCA反応

結果をTable 6に示す。TMFX感作群(A-1～A-3およびB-1～B-3群)のマウスの5倍希釈血清は、TMFXおよびTMFX-BSA惹起に対して、いずれもPCA反応は陰性を示した。また、TMFX-OVA感作群(A-4およびB-4群)のマウスの5倍希釈血清は、TMFX惹起に対して、PCA反応は陰性を示したが、TMFX-BSA惹起に対しては、いずれも20～160倍のPCA抗体価を示した。一方、陽性対照のOVA感作群(A-5およびB-5群)のマウスの血清は、OVAの惹起に対して、いずれも320～2560倍以上のPCA抗体価を示した。

IV. 考 察

以上述べたように、TMFXはモルモットおよびマウスにおいて、抗原性を示さなかった。今回得られた成績は、既に報告されているキノロン系抗菌薬の抗原性試験の成績¹⁻⁶⁾と一致しており、TMFX自体には抗原性はないものと考えられる。

しかし、一般に低分子物質はハプテンと呼ばれ、蛋白などの高分子物質(担体)と非可逆的に結合し、ハプ

テン-担体結合物を形成して抗原性を発揮するものと考えられている。従って、TMFX(分子量453.85)の抗原性を調べるためには、TMFX単独での感作・惹起を行う他に、TMFX-担体結合物での感作・惹起を行う必要があるため、それら両者を用いて試験を実施した。なお、薬物-担体結合物を用いる場合は、薬物はできる限り本来の化学構造を保つことが望ましいが、TMFXには遊離アミノ基が存在するため、これをアセチル基で保護したTMFXのアセチル体にOVAあるいはBSAを結合させた物質を作製し、各々感作抗原および惹起抗原として用いた。

その結果、TMFX単独で感作したモルモットおよびマウスにおいて、TMFXに対する抗体(主としてIgG抗体、モルモット)あるいはIgE抗体(マウス)が産生された所見は得られず、モルモットおよびマウスにおいて、TMFXの免疫原性は認められなかった。また、TMFX-OVAで感作したモルモットおよびマウスにおいては、TMFXのアセチル体に対する抗体あるいはIgE抗体の産生が確認されたが、これらの動物および抗血清に対して、TMFX単独で惹起した際には、ASAおよびPCA反応は陰性を示し、TMFXの誘発原性も認められなかった。

Table 6. Passive cutaneous anaphylaxis in rats using mouse antisera

Group	Challenge antigen (mg/animal)		No. of antisera	PCA titer								
				<5	20	40	80	160	320	1280	2560≤	
A-1	TMFX	(5)	5									
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
A-2	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
A-3	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
A-4	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5		1	3	1					
A-5	OVA	(5)	5						1	4		
B-1	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
B-2	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
B-3	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5	5								
B-4	TMFX	(5)	5	5								
	TMFX-BSA	(5 ^{*1})	5			1	2	2				
B-5	OVA	(5)	5						2	2	1	

*1: 5 mg/animal in terms of protein

以上の成績から、TMFXは化学的に蛋白などの高分子物質と結合させた状態で投与しない限り、抗原性を有さないものと考えられる。

本試験は、1991年10月から1992年1月に行った。

文 献

- 1) Ovary Z: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Progr Allergy* 5: 459 ~ 508, 1958
- 2) Ouchterlony Ö: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 5: 1 ~ 78, 1958
- 3) 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
- 4) 長谷川隆司, 常盤知宜, 仲吉 洋, 原田 稔: Cinoxacinの免疫学的研究。 *Chemotherapy* 28: 516 ~ 522, 1980
- 5) 宗村庚修, 松井幸春, 高瀬善行: AT-2266の抗原性試験。 *Chemotherapy* 32: 185 ~ 191, 1984
- 6) 沼田弘明, 直 弘, 津田敏治, 柳田知司: NY-198のモルモットにおける抗原性に関する試験。 *Chemotherapy* 36: 411 ~ 421, 1988

Antigenicity study on temafloxacin

Kiyoshi Watanabe, Seiji Mito, Yuzo Asano and Fumio Ariyuki
 Safety Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.
 3-16-89 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

The antigenicity (immunogenicity and allergenicity) of temafloxacin (TMFX), a new antibacterial agent, was examined in guinea pigs and mice.

In guinea pigs, immunogenicity (potential of mainly IgG antibody production) and allergenicity (potential of induction of type I allergic reaction) were examined by active systemic anaphylaxis (ASA), homologous 4-h passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and diffusion-in-gel precipitin tests. ASA was not elicited by a challenge of TMFX or acetylated TMFX-bovine serum albumin (TMFX-BSA) conjugate in guinea pigs treated orally with TMFX or subcutaneously with TMFX with Freund's complete adjuvant (FCA). The antisera obtained from these guinea pigs were shown by PCA and diffusion-in-gel methods to contain no anti-TMFX antibodies. ASA was elicited by a challenge of TMFX-BSA conjugate but not by that of TMFX in the guinea pigs treated subcutaneously with the acetylated TMFX-ovalbumin (TMFX-OVA) conjugate with FCA. In the antisera obtained from these animals, the PCA reaction was elicited by a challenge of TMFX-BSA conjugate, but could not be elicited by that of TMFX.

In mice, immunogenicity (potential of IgE antibody production) and allergenicity were examined by heterologous 24-h PCA test in rats. Similar to the results obtained from the study in guinea pigs, neither immunogenicity nor allergenicity was noted when TMFX was administered alone.

From these results, it was concluded that TMFX lacks antigenicity both in guinea pigs and mice.