

薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (続報)

— β ラクタム系抗生物質の血小板機能に対する影響—

本間 義春・川角 浩・横室 公三・竹内 良夫

日本医科大学微生物免疫学教室*

(平成6年8月3日受付・平成6年9月2日受理)

モルモットのアナフィラキシー誘発実験において, cefaclor (CCL)-HSA または cephalixin (CEX)-HSA を抗原とした場合にショック死したにもかかわらず血中ヒスタミン値は変動しなかった。この現象を解析するため, モルモットの血中ヒスタミンの major source である血小板に着目し, 血小板活性化因子 (PAF) の作用に対する薬剤の影響を検討し以下の結論が得られた。 $1.5 \times 10^{-7} \text{M}$ の PAF 刺激で起こる血小板凝集作用に対して薬剤濃度 1 mM, 10 mM 共に影響を与えなかったが, PAF 刺激による血小板からのヒスタミン放出作用に対しては aminobenzyl 基を側鎖にもつ β ラクタム系抗生物質は共通して有意な抑制傾向が認められた。以上の結果から, アナフィラキシーショック時の血中ヒスタミン値の無変化の原因の1つとして, CCL, CEX が血小板からのヒスタミン放出を抑制している可能性が示唆された。

Key words: β ラクタム系抗生物質, 血小板, モルモット, 副作用

I型アレルギーの発症は, 主として肥満細胞に結合した, IgE抗体と対応する抗原との反応の結果, chemical mediatorsの遊離とそれに伴う組織の器質的変化という一連の反応によってもたらされる。一方, IgE抗体の関与が認められない偽アレルギー反応は¹⁾ cefaclor (CCL), cephalixin (CEX) をはじめとした β ラクタム系抗生物質について認められ, これらの薬剤の使用頻度の増加に伴い副作用の報告は増加する傾向にある²⁾。

山田³⁾は CCL の免疫学的特性を検討した際にアナフィラキシーショック誘発実験において, ショック死を確認しながらも, 抗原抗体反応に由来する血中ヒスタミン値の上昇が認められない事実を観察し, CCL について抗原抗体反応以外の原因によるショックの誘因を推論した。

本論文は上述の結果を解析する目的で, モルモットの血中ヒスタミンの major source である血小板⁴⁾を材料として, PAFの血小板凝集作用, 血小板からのヒスタミン放出作用に対する β ラクタム系抗生物質の影響を検討した。

I. 材料および方法

1. 動物

体重 300 g 前後の Hartley 系雌性モルモット (埼玉実験動物社) を免疫, passive cutaneous anaphylaxis (PCA), および血小板の採取に使用した。

2. 薬品

薬剤は, β ラクタム系抗生物質の母核である 6-aminopenicillanic acid (6-APA Lot. 72 F-0837, Sigma 社製), 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA Lot. 62 F-0543, Sigma 社製), および側鎖類似構造物として phenylacetylglucosyl (PAG Lot. ECN-7583, 和光純薬社製), aminobenzylphosphonic acid (AMB Lot. 47 F-7819, Sigma 社製), さらに aminobenzyl 基を側鎖にもつ抗生物質として aminobenzylpenicillin (ABPC Lot. 47 F-7819, Sigma 社製), cefaclor (CCL Lot. 560 GK 7, 塩野義製薬社製), cephalixin (CEX Lot. 86 F-0059, Sigma 社製), benzyl 基を側鎖にもつ benzylpenicillin (PCG Lot. D 144 K, 万有製薬社製), 側鎖に methoxy 基を有する latamoxef (LM-OX Lot. WT-04, 塩野義製薬社製) を実験に使用した (Table 1)。

また, 血小板の刺激剤として platelet activating factor (PAF Lot. 83141355, フナコシ社製) を使用した。

3. 免疫用抗原と抗血清の作製

Parker らの方法⁵⁾に準じて, 薬剤と ascaris suum extract (Ase) ならびに human serum albumin (HSA) との結合物を作製した。Ase-coupling 抗原は免疫用抗原, HSA-coupling 抗原は反応用抗原として使用した。

* 東京都文京区千駄木 1-1-5

Table 1. Used materials
(nucleus, side chain and antibiotics)

	Side chain	Nucleus
6-APA (6-amino penicillanic acid)	—	6-APA
7-ACA (7-amino cephalosporanic acid)	—	7-ACA
Phenylacetylglysin	phenylacetyl	—
Aminobenzylphospholnic acid	aminobenzyl	—
Benzylpenicillin	benzyl	6-APA
Aminobenzylpenicillin	aminobenzyl	6-APA
Cefaclor	aminobenzyl	7-ACA
Cephalexin	aminobenzyl	7-ACA
Latamoxef	methoxy (7 α)	7-ACA

抗血清の作製は5 mg Al(OH)₃/Tris buffered saline 1 ml に対し Ase-coupling 抗原 10 μ g/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 日後に全採血して抗血清をえた⁹⁾。抗血清は 8 日間 passive cutaneous anaphylaxis (PCA)⁷⁾ で PCA titer 400 倍に調整して、アナフィラキシーショックの誘発実験に用いた。

4. アナフィラキシーショック誘発実験と血中ヒスタミンの測定^{8,9)}

Hartley 系モルモットを各薬剤に対する抗体 1 ml で被動性感作し、8 日後に各抗体に対応する HSA coupling 抗原または薬剤 100 mg を静脈注射した。呼吸困難、立毛、挙動不安等のショック様症状またはショック死した時点で採血し、血中のヒスタミン量を小松らの方法⁹⁾で測定した。

5. 血小板の分離と洗浄血小板の調整

常法により 3.12% 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を用いてモルモットから採血し¹⁰⁾、800 rpm で 10 分間遠心し、赤血球を除去後、多血小板血漿 (platelet rich preparation, PRP) をえた。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 (platelet poor preparation, PPP) をえた。この PRP 液に等量の 25 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 1.5 mM EDTA 溶液を加え、4°C, 2,000 rpm で 10 分間遠心し、えられた沈渣を 25 mM Tris-HCl 溶液, 130 mM NaCl, 0.1% glucose, 0.1% albumin 溶液に再浮遊させ、血小板数を 1.5×10^7 /ml に調整して洗浄血小板浮遊液とした。

6. PAF 刺激による血小板凝集に対する薬剤の影響

PRP の細胞数を PPP を用いて 10^7 /ml に調整し、その細胞浮遊液 200 μ l に対し 1 mM, 10 mM の各薬剤を PAF (1.5×10^{-7} M) と同時に添加し 3 分後に血

小板凝集計 (NKK Hema tracer, 二光バイオサイエンス社) を用いて、血小板凝集能を測定した。

7. PAF 刺激による血小板からのヒスタミン放出能に対する薬剤の影響

洗浄血小板浮遊液に PAF (1.5×10^{-7} M) と各薬剤を同時に作用させ、37°C, 3 分間 incubate した後、細胞内、および上清中のヒスタミン量を測定し、(遊離ヒスタミン量/遊離ヒスタミン量+細胞内ヒスタミン量) を遊離率とし、10 回の実験の means \pm SD として図表に示した。

II. 結 果

1. 実験的アナフィラキシーショック誘発時における血中ヒスタミン値の変動

PCA 値 400 倍力価の IgE 抗体を含有する抗血清で被動性感作されたモルモットに HSA-coupling 抗原を静脈注射して、全身アナフィラキシーショックの誘発を試みた。

Table 2 に示すように PCG の場合、5 匹のモルモットのすべてがショック状態となり、5 分以内に死亡した。その際、血中のヒスタミン値は 37 ng/ml (抗原誘発前) から 455 ng/ml へと有意の上昇が観察された。一方、CCL, CEX の場合、5 匹中 2 匹または 3 匹にショック死を認めたものの、血中ヒスタミン値は誘発前後でほとんど変化は認められなかった。同様の実験系 (Table 3) でアナフィラキシー反応を誘発する抗原として抗生物質を投与した場合に、その直後または 20 分を経過しても、血中ヒスタミン値は変動を認めなかった。その後さらに HSA coupling 抗原を投与し、20 分経過した時点で血中ヒスタミン値の測定を行った場合は、PCG, CET の系では血中ヒスタミン値は有意に上昇しショック死したのに対し、CCL の系では、CCL または CCL-HSA および他系の抗原でチャレンジした場合でも、血中ヒスタミン値

Table 2. Test of anaphylactic shock in guinea pigs

Sensitized antibody	anti-PCG	anti-CEX	anti-CCL	none
Challenging antigen	PCG-HSA	CEX-HSA	CCL-HSA	CCL-HSA
Tested animal	5	5	5	5
Positive number	5	2	3	0
Death time	3~5 min	3~20 min	15~30 min	servived
Blood histamine ng/ml				
(before challenge)	37.3±1.6	39.5±6.2	43.7±5.2	37.8±3.6
(after challenge)	455.0±63.6*	51.5±5.0	42.6±1.2	38.6±4.2

*(ng/ml, mean±SEM)

P<0.01 vs before PCG.

GPs were passively sensitized with each IgE antibody.

After 8 days, induction of anaphylactic shock was observed with injection of the challenging antigen.

PCG: benzylpenicillin, CEX: cephalixin, CCL: cefaclor

Table 3. Histamine assay of blood isolated from guinea pig passively sensitized with antibody

Sensitized antibody	Challenging antigen		Blood sample (ng/ml)			
	antibiotics	coupling antigen	(1)*	(2)**	(3)***	
PCG-Ase	PCG	PCG-HSA	30	27	75	(death)
CEX-Ase	CEX	CEX-HSA	37	23	31	
CET-Ase	CET	CET-HSA	54	45	119	(death)
CCL-Ase	CCL	CCL-HSA	30	24	31	
CCL-Ase	PCG	PCG-HSA	28.5	23	17.5	
	CEX	CEX-HSA	23	22	18	
	CET	CET-HSA	20.9	18.6	24	
	CCL	CCL-HSA	31	27	29	

GPs were passively sensitized with each antibody.

After 8 days,

* Sample 1 was obtained before the injection of antibiotics.

** Sample 2 was obtained 20 min after the injection of antibiotics.

*** Sample 3 was obtained 20 min after the injection of HSA coupling antigen.

PCG: benzylpenicillin, CEX: cephalixin, CET: cephalothin, CCL: cefaclor

の上昇はほとんど認められなかった。

2. PAF による血小板凝集作用への薬剤の影響

前記実験的アナフィラキシーショック誘発実験において、血中のヒスタミン値の動態に血小板中のヒスタミンが関与するか否かを検討するために、PAF 刺激による血小板凝集作用に対する薬剤の影響について検討した。

最終濃度 1 mM, または 10 mM の薬剤を 1.5×10^{-7} M の PAF と同時に 3 分間反応せしめ、血小板凝集計を用いて血小板凝集能を測定した。PAF 刺激のみの凝集を 100% とした場合、それぞれの薬剤で若干の凝集率の減少が認められたものの有意な凝集抑制は認められなかった (Table 4)。

3. PAF 刺激による血小板からのヒスタミン放出に対する薬剤の影響

1.5×10^{-7} M の PAF と最終濃度 0.5 mM の各薬剤をそれぞれ同時に血小板溶液に添加し PAF 刺激による血小板からのヒスタミン放出に対する各薬剤の影響を検討した (Fig. 1)。PAF 無刺激の control は $14.3 \pm 3.1\%$, PAF 刺激だけのときは $51.8 \pm 7.1\%$ のヒスタミン放出が起こる条件下で、母核および側鎖部分の 6-APA, 7-ACA, PGA はそれぞれ、 $50.1 \pm 17.3\%$, $54.2 \pm 11.2\%$, $50.3 \pm 7.8\%$, 側鎖類似構造物の AMB は $14.5 \pm 3.9\%$ の放出率を示した。PCG, LMOX の放出率は $51.9 \pm 8.3\%$, $48.1 \pm 3.9\%$ を示した。一方, ABPC, CCL, CEX では $24.7 \pm 5.1\%$,

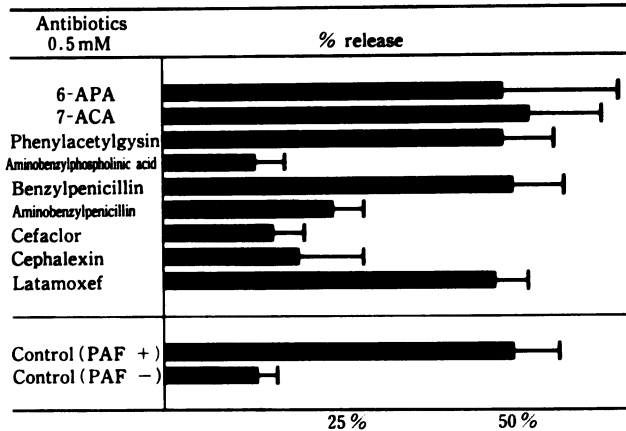
Table 4. Inhibitory effects of antibiotics on platelet aggregation stimulated with PAF

Antibiotics	% inhibition	
	1 mM	10 mM
6-APA	3.2±2.5	6.9±3.3
7-ACA	5.8±3.1	10.3±5.1
Phenylacetylglysin	6.7±3.2	5.9±2.2
4-aminobenzyl	1.6±1.0	0.9±0.9
Benzylpenicillin	1.5±1.3	16.4±7.7
Aminobenzylpenicillin	10.9±5.5	5.8±2.2
Cefaclor	8.1±5.3	16.3±7.9
Cephalexin	8.5±6.6	9.4±6.0
Latamoxef	8.7±6.1	18.2±8.0
PAF only	0.0	0.0

50 μl of PAF (1.5×10⁻⁷M) and antibiotics were added to 200 μl of platelets (1.5×10⁷ cells/ml) at the same time.

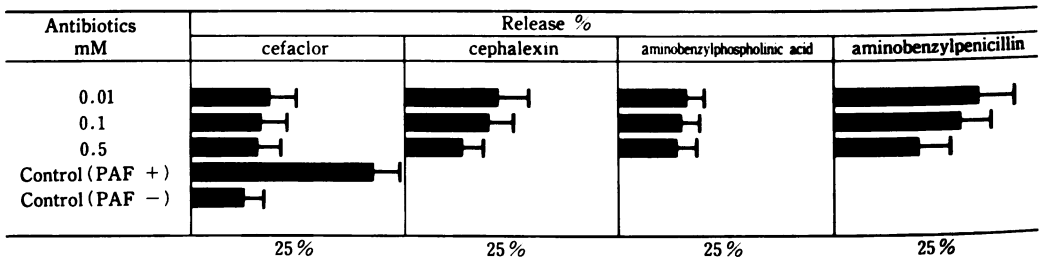
16.0±4.9%, 20.3±7.3%を示し、有意にヒスタミン放出の抑制が認められた。(Fig. 1)。

さらに AMB, ABPC, CCL, CEX について、上記結果を再確認する目的で最終濃度 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM の 3 濃度について検討した (Fig. 2)。無刺激 control 15.8±3.1%, PAF 刺激で 50.9±7.0% の放出率が認められた条件下で、CCL の場合、22.7±4.3% (0.01 mM), 20.5±4.0% (0.1 mM), 19.0±4.0% (0.5 mM) と濃度依存的にヒスタミン放出抑制が認められた。また CEX では、26.0±5.1% (0.01 mM), 23.4±4.4% (0.1 mM), 16.4±3.6% (0.5 mM), AMB では、18.3±3.6% (0.01 mM), 17.4±3.5% (0.1 mM), 16.0±3.1% (0.5 mM), さらに ABPC では、41.5±7.5% (0.01 mM), 36.5±6.0% (0.1 mM), 24.5±6.0% (0.5 mM) と CCL と同様に濃度依存的なヒスタミン放出の抑制が認めら



50 μl of PAF (1.5×10⁻⁷M) and antibiotics were added to 200 μl of platelets (1.5×10⁷ cells/ml) at the same time.

Fig. 1. Effects of antibiotics on the release of histamine from platelets stimulated with PAF.



50 μl of PAF (1.5×10⁻⁷M) and antibiotics were added to 200 μl of platelets (1.5×10⁷ cells/ml) at the same time.

Fig. 2. Effects of antibiotics on the release of histamine from platelets stimulated with PAF.

れた。

III. 考 察

全身性アナフィラキシーショックは即時型アレルギー反応の代表型である。これは、組織肥満細胞や血中の好塩基球と結合したIgE抗体が特異抗原と反応した結果、ヒスタミンをはじめ、slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A, leukotrien), eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A), platelet activating factor (PAF)などのchemical mediatorsが遊離される¹¹⁾。これらの化学物質のうち、ヒトおよびモルモットにおける反応誘発のmajor shocking agentはヒスタミンであるとされている¹²⁾。

今回の実験でanti-PCG-IgE抗体、anti-CCL-IgE抗体、anti-CEX-IgE抗体をモルモットに被動性感作したアナフィラキシーショック誘発実験において、各対応抗原をチャレンジした時に、PCGの場合はショック死時に血中ヒスタミン量が有意に増加したのに対し、CCL、CEXではショック死したにもかかわらず、血中ヒスタミン量の上昇が認められなかった(Table 2)。さらにanti-CCL-IgE抗体が被動性感作された場合、CCL以外のcoupling抗原で惹起しても血中ヒスタミンの上昇は認められなかった(Table 3)。

CCLとCEXの構造上の相異は3位側鎖のみがClとCH₃で異なるがその他の構造は一致している(Table 1)。その結果、CCLの反応性は免疫学的にも交叉性は高いが他薬剤との反応性は低い¹³⁾ことによるものと考えられる。

上記の血中ヒスタミンの変動に関しては、モルモットは他動物とは異なり、血中ヒスタミンの約90%は血小板に由来する⁴⁾という特徴がある。すなわち、今回の実験で血中ヒスタミンレベルの変動は、薬剤がなんらかの形で血小板に作用していることを示唆している。

血小板膜上にはIgEレセプターの存在が認められており¹⁴⁾、IgEで被動性感作されたモルモットに抗原を静注すると血小板からヒスタミンが遊離される¹⁵⁾と共に脱顆粒した好塩基球の周りに活性化した血小板の凝集塊が顕微鏡的に認められる。

しかしながら、今回の実験ではショック時において感作された白血球から放出されたPAFは血小板を活性化しているにもかかわらず、しかも血小板自身も感作されているはずであるのに、ヒスタミンの放出は抑制された。この抑制は薬剤濃度依存性であった(Fig. 2)。この結果から薬剤は血小板に直接作用してPAFの作用とヒスタミンの遊離作用を抑制することが示唆された。

以上に述べたCCLとCEXの薬理学的特異性を検討する目的で上記2薬剤に共通なaminobenzyl基について注目した。その結果、Fig. 1に示したように、*in vitro*におけるPAFによる血小板からのヒスタミン放出作用の抑制は、aminobenzyl基を側鎖にもつ、CCL、CEX、ABPC、AMBに特異的に認められ、しかも濃度依存的な抑制であった(Fig. 2)ことから、ヒスタミン放出機能に対してこれら薬剤の側鎖であるaminobenzyl基がなんらかの影響をおよぼしていることが推測され、aminobenzyl基をもつ抗生物質の血小板機能の抑制機序について更に詳細な検討が必要であることが示唆された。

また、以上の考察から推測するとCCL、CEXのアナフィラキシーショック誘発実験におけるshocking agentについては、血小板活性化に伴う血小板細胞内のヒスタミン^{16,17)}以外のchemical mediatorの関与が推測され、さらに詳細な検討が必要であろう。

一方、PAFによる血小板凝集作用に対し、CCL、CEXによる有意な抑制は認められず(Table 4)、血小板からのヒスタミン放出機能の抑制と相関する成績は得られなかった。この原因として、血小板の凝集反応と放出反応の機序の相違が考えられる。すなわち、血小板凝集は血小板膜糖蛋白質IIb/IIIa複合体とフィブリノーゲンとの結合¹⁸⁾による現象であり、放出反応は活性化された血小板の細胞内において起こる顆粒の集中化とそれに伴うopen canalicular systemとの接合を介しての細胞内内容物の放出¹⁹⁾という現象であり、両者の反応はそれぞれ独立した反応系で起こり得ると推察される。Cephem系抗生物質の血小板凝集機能の抑制については、latamoxef (LMOX)やcefmenoxime (CMX)による血小板表面の陰性荷電の増大²⁰⁾やmoxalactam disodium投与による著しい出血時間の延長を伴う可逆性の出血性素因の合併がみられた際にADPによる血小板凝集の障害による血小板機能異常が*in vitro*で認められる²¹⁾などが報告されており、特に嘉久志ら²²⁾はCCLの血小板凝集阻害作用をフィブリノーゲンと血小板膜糖蛋白質IIb/IIIa複合体との結合阻害によるとしている。したがって抗生物質による凝集と放出反応はさらに薬剤の種類を拡大して詳細な再検討が必要であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださった木村義民名誉教授、ご指導ご校閲を頂いた横室公三教授、直接ご指導ご助言を賜った竹内良夫助教授、ならびに日本医科大学微生物免疫学教室の皆様へ深く感謝致します。

文 献

- 1) Dukor P, Helsingborg P K, Schlumberger H D, Wuppertal, and West G B, Susrey E: Pseudo-Allergic Reaction Vol 1, p. 28~51, S. targer, New York., 1980
- 2) 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
- 3) 山田静雄: Cefaclor の抗原性に関する研究. *Chemotherapy* 37: 889~895, 1989
- 4) 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
- 5) Paker C W: Conjugation of Penicillin and derivatives. In Williams and Chase *Methods of immunology*, p.133~143, Academic Press, New York., 1967
- 6) Perni A, Mota I: The production of IgE and IgG antibodies in the guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology* 25: 297~305, 1973
- 7) Margani R A, Hajos S E: Guinea pig reaginic antibody II Physicochemical and Biological properties. *Immunology* 25: 333~342, 1973
- 8) May C D, Lyman M, Alberto R, Chang J: Procedures for immunological studies of histamine release from leucocytes with small volume of blood. *J. Allergy* 46: 12~20, 1970
- 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) 日高弘義: 血小板の分子薬理. p. 74~80, 講談社, 東京, 1983
- 11) 森田 寛: IgE と I 型アレルギー. p. 3~82, メビオ, 東京, 1986
- 12) 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
- 13) 原田 稔, 竹内三津男, 松本光史, 小池昌子, 江幡光男: Cefaclor の免疫学的特性. *Chemotherapy* 27: 755~763, 1979
- 14) Joseph M, Capron A, Ameisen J C, Capron M, Vorng H, Pancre V, Kusnierz J P, Auriault C: The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol* 16: 306~312, 1986
- 15) Benveniste J, Henson P M: Leucocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. *J. Exp. Med* 136: 1356~1377, 1972
- 16) Satya P, Lorne J B, Allan B B, Keith J S, Frank S L, Jon M G: Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science* 243: 1596~1599, 1989
- 17) 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: 407~417, 1990
- 18) Nachman R L, Leung L L K: Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and III a with fibrinogen. *J. Clin. Invest* 69: 263~269, 1982
- 19) F De Clerck, David J L: Pharmacological control of platelet and red blood cell function in the microcirculation. *J. Cardiovas. Pharmacol* 3: 1338~1412, 1981
- 20) 吉岡 宗, 飯田 夕, 間瀬勲史, 前原敬悟, 岡本綾子, 安永幸二郎: 血小板機能に及ぼす各種抗生物質の影響. *Chemotherapy* 32: 1013~1014, 1984
- 21) Michael R M, Robert C A: Prolonged bleeding times and bleeding diathesis associated with moxalactam administration. *JAMA* 249: 69~71, 1983
- 22) 嘉久志寿人, 四家 勉, 早崎洋子, 松原尚志, 内田清久, 本間義春, 川角 浩, 竹内良夫: 経口抗生物質 Cefaclor の血小板凝集に対する作用. *日薬理誌* 95: 335~346, 1990

Effects of β-lactam antibiotics on platelet function

Yoshiharu Honma, Kou Kawasumi, Kozo Yokomuro,
and Yoshio Takeuchi

Department of Microbiology and Immunology Nippon Medical School,
1-1-5 Sendagi Bunkyo-ku Tokyo 114

This report concerns the fact that the postmortem level of histamine in blood was unchanged in guinea pigs (GP) that they died of antibody reaction the cefaclor (CCL)-human serum albumin (HSA) conjugates or cephalixin (CEX)-HSA during anaphylactic shock. In order to analyze this result, we studied how antibiotics affect platelets activated by platelet activating factor (PAF), as platelets are major source of histamine in GP blood. When PAF ($1.5 \times 10^{-7}M$) reacts to platelets histamine is released and platelet aggregation is induced, CCL and CEX (1 mM or 10 mM) blocked histamine release but did not block platelet aggregation. From these results, it was suggested that the release of histamine from platelets was blocked by CCL and CEX, and therefore, the level of histamine did not increase during anaphylactic shock.