Mofezolac (N-22)の抗原性試験

竹本 稔, 松尾 弘也, 加藤 伸二, 吉田 良一*

第一化学薬品株式会社 東海研究所

*大鵬薬品工業株式会社 研究開発本部 安全性研究所

ANTIGENICITY TEST OF MOFEZOLAC (N-22)

Minoru TAKEMOTO, Kohya MATSUO, Shinji KATOH and Ryouichi YOSHIDA *

Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokai Research Laboratories

2117 Muramatsu, Tokai-mura, Ibaraki, 319-11, Japan

*Drug Safety Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.,

224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

Accepted December 20, 1989

Abstract.....Antigenicity studies of mofezolac (N-22) were examined in mice and guinea pigs and the following results were obtained.

The findings of active systemic anaphylaxis, passive hemagglutination test, 4 hour passive cutaneous anaphylaxis (4-hr PCA) and 8-day PCA in guinea pigs revealed that N-22 possessed neither immunogenic nor eliciting potentiality.

However, N-22 was shown to be eliciting antigenicity in mice when given N-22-ovalbumin conjugate plus Freund's complete adjuvant (FCA) as immunogen.

Key words : Mofezolac, N-22, analgesic and anti-inflammatory agent, antigenicity test, guinea pigs, mice,

緒 言

Mofezolac(以下N-22と記す)は, 大鵬薬品工業株式会社で新しく開発されたイソキサゾール骨格を有する鎮痛抗炎症剤である。今回著者らは, N-22の安全性試験の一環としてその抗原性について, マウスおよびモルモットを用いて*in vivo*および*in vitro*の試験を検討したので報告する。

連絡先: ☎771-01 *徳島市川内町平石字夷野224-2

大鵬薬品工業株式会社 研究開発本部 安全性研究所 吉田 良一

実験材料および方法

1. 被験物質

被験物質として、抗体化成工業株式会社で合成されたN-22 (Lot No. 86C1001) を用いた。化学名は、[3,4-di (4-methoxyphenyl)-5-isoxazolyl] acetic acidであり、構造式はFig. 1に示した。本剤は、白色の結晶性の粉末で、水にほとんど溶けず、ジメチルホルムアミドに極めて溶けやすく、クロロホルムに溶けやすい。

Fig. 1. Chemical structure of mofezolac (N-22).

2. 担体蛋白質およびN-22蛋白質結合物

担体蛋白質として卵白アルブミン (OVA ; Sigma chemical Co., Fraction V, 99%) を使用した。

N-22-OVA結合物の調製は、次の方法で行った。OVA (500mg, 11 μ mole) を 6 mlの蒸留水に溶解し、ピリジンにN-22 (188mg, 555 μ mole) を溶解した溶液 4 mlを加えた。次いで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (212mg, 1.1mmole) を徐々に加え、4℃で一夜攪拌下反応させた。反応後、蒸留水に対し2日間透析した後、凍結乾燥した。収量は458mgであった。

本試験に用いたN-22-OVA結合物の共有結合数はアミノ酸分析法により算出 (Ebataら, 1976) し、OVA 1 モルに対しN-22は8.1モルであった。

3. 試薬

試薬として、生理食塩液 (大塚製薬), Freund's Complete Adjuvant (FCA ; Calbiochem-behring Corp.), 水酸化アルミニウムゲル (Alum ; 第一化学薬品(株)東海研究所にて, Levineら (1970) の方法を参考にして調製), エバンスブルー (Sigma Chemical Co.), Carboxymethyl Cellulose Sodium (CMC ; 和光純薬) を用いた。

4. 使用動物および飼育条件

感作動物として、雄性BALB/c系マウス (BALB/cAnNCrj, 8週齢, 23.2~25.5g, Charles River Japan, SPF) および雄性Hartley系モルモット (Slc : Hartley, 4~5週齢, 335~385g, 静岡県実験動物農業協同組合, SPF) を使用した。また受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応用レシピエント動物として雄性Sprague Dawley系ラット (Crj : SD, 9

Antigenicity test of mofezolac (N-22)

週齢, 335～409g, Charles River Japan, SPF) および雄性Hartley系モルモット (Crj: Hartley, 6～8週齢, 366～497g, Charles River Japan, SPF) を使用した。また, N-22含有血漿採取用に雌性Hartley系モルモット (Crj: Hartley, 9～13週齢, 488～612g, Charles River Japan, SPF) を用いた。動物は, 温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 12時間人工照明に設定された飼育環境下, 1週間以上の予備飼育後, 健康な動物を試験に供した。1週間以上の予備飼育期間を含む試験期間中, マウスはポリカーボネート製ケージ (W235×D335×H130mm) に5匹ずつ, ラットはステンレス製ケージ (W290×D380×H225mm) に4匹ずつ, モルモットはアルミ製ケージ (W360×D520×H350mm) に5匹ずつ収容し飼育した。

飼料はマウス, ラットにはMF固型飼料 (オリエンタル酵母工業), モルモットにはGM-1固型飼料 (船橋農場) を, 水はフィルターを通した水道水をそれぞれ自由採取させた。

5. マウスを用いた試験

1) マウスの感作および採血

20匹のマウスを10匹毎2群に分け, 1群についてはN-22の生理食塩懸濁液1.5mg/mlとAlum (10mg/ml) を, 1:2容の割合で混合し, その0.3mlを腹腔内に投与した。2群については, N-22-OVA結合物の生理食塩懸濁液100 $\mu\text{g/ml}$ とAlumを, 1群と同様に調製し, その0.3mlを腹腔内に投与した。両群とも3週に1回, 計3回感作し, 最終感作の9日後に全採血を行い, 個体別に血清を得た。

2) ラットPCA反応

マウスIgE抗体の検出は, Motaら (1969) の方法に準じてラットPCA反応により行った。2倍段階希釈したマウス血清50 μl をラットの背部皮内に受身感作し, 24時間後にN-22の10mg/ml溶液 (N-22を生理食塩液と Na_2CO_3 で溶解後, HClでpHを中性に戻し, 生理食塩液で濃度を調製したもの) 1mlと1%エバンスブルー溶液0.5mlとの混合液計1.5mlあるいは, N-22含有血漿即ち, N-22を500mg/kgで正常ラットに経口投与し, 30分後に採血して得られた血漿 (N-22+RP) 1mlと1%エバンスブルー溶液0.5mlとの混合液計1.5mlを, 尾静脈より投与した。誘発30分後血清皮内投与部位の色素漏出を観察し, 色素斑の長短径の平均5mm以上を陽性とした。なお1血清につき2匹以上のレシピエント動物を用いて測定し, 陽性を示す最大希釈倍数の相乗平均値をPCA抗体価とした。

6. モルモットを用いた試験

1) モルモットの感作および採血

70匹のモルモットを1群20匹ずつ3群に分け, 残る10匹を無処置群とした。N-22単独投与群は, N-22の0.5%CMC懸濁液1.2mg/mlを2mlずつ経口投与した。N-22+FCA投与群は, N-22の生理食塩溶液9.6mg/mlを等量のFCAと混合してエマルジョンにし, その0.5mlを皮下に投与した。N-22-OVA結合物+FCA投与群は, N-22-OVAの生理食塩溶液4mg/mlを等量のFCAと混合して, エマルジョンにし, その0.5mlを皮下に投与した。N-22単独投与群は週3回 (隔日), 計10回, その他の群は2週に1回, 計5回感作し, 最終感作の12～13日後に各群より10匹ずつ部分採血を行いそれぞれ個体別に血清を得た。

2) モルモットのPCA反応

モルモットのPCA反応はOvaryら(1975)の方法に準じてモルモットIgG抗体(4時間PCA反応)およびIgE抗体(8日間PCA反応)の検出を行った。未希釈血清あるいは2倍段階希釈したモルモット血清50 μ lをレシピエントモルモットの背部皮内に受身感作し、4時間後および8日後に、N-22の10mg/ml溶液1 mlと1%エバンスブルー溶液0.5mlとの混合液計1.5mlあるいはN-22含有血漿、即ち、N-22を500mg/kgで正常モルモットに経口投与し、30分後に採血して得られた血漿(N-22+GPP)1 mlと1%エバンスブルー溶液0.5mlとの混合液計1.5mlを後肢静脈より投与した。またN-22-OVA結合物+FCA投与群より得られた血清については、OVAの生理食塩溶液2 mg/mlと等量の1%エバンスブルー溶液との混合液1 mlを用いての誘発も行った。誘発30分後ラットPCA反応と同様に色素漏出を観察した。

3) モルモット能動全身性アナフィラキシー反応

最終感作の15~16日後(部分採血した3日後)に、N-22の10mg/ml溶液1 mlあるいはN-22+GPP 1 mlを静脈内注射して能動全身性アナフィラキシー反応の誘発を行った。アナフィラキシー症状の観察は誘発30分後まで行い、搔鼻、立毛およびふるえのいずれかの症状が認められたものについては「±」、咳、チアノーゼ、元気消失、呼吸困難、転倒、腹部着床のいずれかの症状が認められたものを、陽性として「+」で表わし、死亡まで至ったものについては「++」で表わした。また無症状のものは、陰性として「-」で表わした。

4) 受身赤血球凝集(PHA)反応

Avrameasら(1969)の方法に従い、グルタルアルデヒドを用いて綿羊赤血球(SRBC)にN-22とモルモット血清アルブミンの混合物(37℃で2時間インキュベーションしたもの、以下N-22+GSAと略す)あるいはOVAを感作して抗原感作血球を調製した。抗原感作後、1%BSA添加0.1%Tween80-0.01M PBS(1%BSA-TPBS), pH7.4で1%血球浮遊液とした。マイクロタイター法によりPHA反応の測定を行った。1%BSA-TPBSでモルモット血清の2倍段階希釈系列を作り(25 μ l),それに1%感作血球浮遊液25 μ lを加え攪拌後、プレートを密閉して室温で一晩放置し、血球凝集の有無を観察した。1血清につきduplicateで行い、凝集反応を示す最大希釈倍数の相乗平均値をPHA抗体価とした。なお、N-22+GSA感作血球については、すべての血清について行い、OVA感作血球については、N-22-OVA結合物+FCA投与群および無処置群についてのみ行った。

実験結果

1. マウスを用いた試験(Table. 1)

N-22+Alum投与群については、N-22、N-22+RPで誘発した場合、IgE抗体産生は認められなかった。N-22-OVA結合物+Alumについては、N-22、N-22+RPで誘発した場合、いずれも10例中4例にIgE抗体の存在が認められた。PCA抗体価はN-22で誘発した場合2~91倍、N-22+RPで誘発した場合2~128倍であった。なお、N-22で陽性を示した血清

Antigenicity test of mofezolac (N-22)

Table 1. Passive cutaneous anaphylaxis in rats with sera obtained from sensitized mice.

Sensitizing antigen	Challenging ^{a)} antigen	PCA titer ^{b)}	Positive ratio
N-22+Alum	N-22	— ^{c)}	0/10
	N-22+RP ^{d)}	—	0/10
N-22-OVA+Alum	N-22	2~91	4/10
	N-22+RP	2~128	4/10

- a) Challenging antigen was intravenously injected 24 hours after sensitization of rats with sera.
b) PCA titer represents the maximum dilution factor of original serum which gives positive reactions.
c) — : Specific antibodies were not detected in 2-fold dilution of original sera.
d) N-22+RP is plasma from rats orally administered of N-22 (500mg/kg).

とN-22+RPで陽性を示した血清は、同一血清であった。

2. モルモットを用いた試験

1) モルモットPCA反応 (Table. 2)

いずれの群も、N-22あるいはN-22+GPPで誘発した場合、4時間および8日間PCA反応は陰性であった。N-22-OVA結合物+FCA投与群をOVAで誘発した場合は4時間および8日間PCA反応とともに全例が陽性を示し、PCA抗体価は4時間PCA反応で100倍以上、8日間PCA反応で200~400倍以上であった。

Table 2. Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs with sera obtained from sensitized guinea pigs.

Sensitizing antigen	Challenging ^{a)} antigen	4-hr PCA		8-day PCA	
		PCA titer ^{b)}	Positive ratio	PCA titer ^{b)}	Positive ratio
N-22	N-22	— ^{c)}	0 / 10	—	0 / 10
	N-22+GPP ^{d)}	—	0 / 10	—	0 / 10
N-22+FCA	N-22	—	0 / 10	—	0 / 10
	N-22+GPP	—	0 / 10	—	0 / 10
N-22-OVA+FCA	N-22	—	0 / 10	—	0 / 10
	N-22+GPP	—	0 / 10	—	0 / 10
	OVA	≥100	10 / 10	≥200~≥400	10 / 10
Non-treatment ^{e)}	N-22	—	0 / 1	—	0 / 1
	N-22+GPP	—	0 / 1	—	0 / 1

- a) Challenging antigen was intravenously injected 4 hours (4-hr PCA) or 8 days (8-day PCA) after sensitization of guinea pigs with sera.
b) PCA titer represents the maximum dilution factor which gives positive reactions.
c) — : Antibodies directed against corresponding sensitizing antigen were not detectable in serum by PCA reaction.
d) N-22+GPP is plasma from guinea pigs orally administered of N-22 (500mg/kg).
e) A pooled serum from ten guinea pigs.

2) 能動全身性アナフィラキシー反応 (Table. 3)

すべての感作動物について、N-22あるいはN-22+GPPで誘発した場合、何ら全身性アナフィラキシー症状は認められなかった。そのためN-22-OVA結合物+FCA投与群について、N-22+GPPで誘発した翌日に、同一動物についてOVA (1 mg/匹) による再誘発を試み、10例全例にアナフィラキシー症状を認めた。

3) モルモットの血清を用いたPHA反応 (Table. 4)

N-22+GSA感作血球を用いた場合すべての血清が全例陰性であった。OVA感作血球を用

Table 3. Active systemic anaphylaxis in guinea pigs.

Sensitizing antigen	Challenging antigen	Number of animals	Severity of anaphylaxis ^{a)}			
			—	±	+	++
N-22	N-22	10	10	0	0	0
	N-22+GPP ^{b)}	10	10	0	0	0
N-22+FCA	N-22	10	10	0	0	0
	N-22+GPP	10	10	0	0	0
N-22-OVA+FCA	N-22	10	10	0	0	0
	N-22+GPP	10	10	0	0	0
	OVA	10	0	0	9	1
Non-treatment	N-22	5	5	0	0	0
	N-22+GPP	5	5	0	0	0

a) Severity of anaphylaxis was expressed as follows,

— = symptom 0 ; ± = symptom 1~3 ; + = symptom 4~9 ; ++ = symptom 10 symptom,

0 = no symptom ; 1 = nose scratching ; 2 = piloerection ; 3 = tremor ;

4 = cough ; 5 = cyanosis ; 6 = weakness, diminishing tone ; 7 = dyspnea ;

8 = upset ; 9 = lying on stomach ; 10 = death

b) N-22+GPP is plasma from guinea pigs orally administered of N-22 (500mg/kg).

Table 4. Passive hemagglutination test with sera obtained from sensitized guinea pigs.

Sensitizing antigen	Antigen bound to SRBC	PHA titer ^{a)}	Positive ratio
N-22	N-22+GSA	— ^{b)}	0 / 10
N-22+FCA	N-22+GSA	—	0 / 10
N-22-OVA+FCA	N-22+GSA	—	0 / 10
	OVA	256~512	10 / 10
Non-treatment ^{c)}	N-22+GSA	—	0 / 1
	OVA	—	0 / 1

a) PHA titer represents the maximum dilution factor which gives hemagglutination.

b) — : Specific antibodies were not detected in 4-fold dilution of sera.

c) A pooled serum from ten guinea pigs.

Antigenicity test of mofezolac (N-22)

いた場合、無処置群は陰性であったが、N-22-OVA結合物+FCA投与群は10例全例が陽性を示し、PHA抗体価は256～512倍であった。

考 察

N-22は臨床投与経路として経口が予定されている鎮痛・抗炎症剤である。一般に実験動物では、経口投与による抗原性の発現は困難であることが知られていることから (Dolezel and Bienenstock, 1971 ; Walker and Isselbacher, 1972), 免疫増強剤のAlumあるいはFCAをN-22と併用して、前者をマウスに腹腔内投与し、後者をモルモットに皮下投与し、さらに卵白アルブミン (OVA) と共有結合させたN-22-OVAをAlumあるいはFCAとともにそれぞれ投与した。また経口投与経路については、モルモットにおいて検討した。

なお当初、誘発抗原としてN-22単独およびウシ血清アルブミン (BSA) との共有結合物であるN-22-BSAを用いる予定であったが、N-22-BSAが水系溶媒に不溶のため使用できなかった。そこで誘発に用いる動物と同一系の正常無処置ラットあるいはモルモットにN-22を経口投与し、30分後に採血して得られた血漿を誘発抗原として用いた。

モルモットにおいては、能動全身性アナフィラキシー反応、受身皮膚アナフィラキシー反応 (4時間PCA, 8日間PCA) および*in vitro*で受身赤血球凝集反応を行い、いずれの試験結果からもN-22の感作原性、誘発原性は認められなかった。

一方マウスにあっては、N-22-OVA+Alum感作により得られた血清を用いた24時間PCAでは、N-22単独誘発により約半数例に弱いながらも陽性が認められた。即ちN-22の誘発原性が示唆された。

また、今回マウスで誘発原性が認められた反応において、N-22に対する特異抗体は人工的に作製した多価抗原にさらに免疫増強剤を加えた抗原により産生されたもので、いわば非生理的条件下のものであり、臨床での条件下とは異なること、また本品は経口剤であることからN-22が臨床におけるアレルギー発現に係わる可能性は小さいものと考えられる。しかしながら臨床においてアレルギー性副作用が生じるという可能性は小さいながらも無視しうるものではないので、臨床使用時には副作用に関して細心の注意が必要であると考えられた。

結 論

N-22の抗原性をマウスを用いた実験、モルモットを用いた実験および受身赤血球凝集反応で検討し、次の結論を得た。

- 1) BALB/c系マウスを用いた実験において、ラットを用いた24時間PCA反応でN-22の誘発原性が示唆された。
- 2) モルモットを用いた実験では、4時間PCA反応、8日間PCA反応および能動全身性アナフィラキシー反応の結果、N-22の抗原性は認められなかった。
- 3) 受身赤血球凝集反応の結果、いずれのモルモットの血清も陰性であった。

以上の結果より、N-22は潜在的に誘発原性を有することが示唆された。

文 献

- Avrameas, S., Taudou, B. and Chuilon, S. (1969) : Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized *o*-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochemistry*, **6**, 67—76.
- Dolezel, J. and Bienenstock, J. (1971) : Immune response of the hamster to oral and parenteral immunization. *Cell. Immunol.*, **2**, 326—334.
- Ebata, M., Miyake, Y. and Uchida, J. (1976) : A quantitative assay of covalently bound cephalosporin derivatives in cephalosporin-protein conjugate. *J. Antibiot.*, **29**, 665—666.
- Leyvine, B. B. and Vaz, N. M. (1970) : Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **39**, 156—171.
- Mota, I. and Wong, B. (1969) : Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.*, **8**, 813—820.
- Ovary, Z., Caiazza, S. S. and Kojima, S. (1975) : PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **48**, 16—21.
- Walker, W. A. and Isselbacher, K. J. (1972) : Intestinal uptake of macromolecules : Effect of oral immunization. *Science*, **177**, 608—610.