

Amoxycillin (BRL2333) の抗原性および Ampicillin との免疫学的交差性について

峯 靖弘・野々山重男・西田 実

藤沢薬品工業株式会社中央研究所

五島瑳智子・桑原章吾

東邦大学医学部微生物学教室

Amoxycillin は Beecham 研究所で開発された Ampicillin の誘導体で、化学構造的には Ampicillin の 6 位アシル側鎖のベンゼン環の α 位に OH 基が導入されたものである。抗菌活性はほとんど Ampicillin と変わらないが、経口投与による吸収性がすぐれていることが特徴とされている¹⁾。

本報は、この抗生物質の免疫学的挙動について検討したので、その結果を報告する。

実験材料および実験方法

(1) 使用抗生物質

Amoxycillin (AMPC, BRL2333, Beecham Research Laboratories), Ampicillin (ABPC, Beecham Research Laboratories), Potassium benzyl penicillin (PC G, 万有製薬株式会社)

(2) 免疫動物

正常家兔 (δ , 日本白色在来種, 2.0~3.0 kg), モルモット (δ , ハートレー系, 250~300 g)

(3) AMPC および ABPC のタンパク結合物の作製法

AMPC あるいは ABPC の 200 mg とウサギ血清アルブミン (RSA) または Armour 製のウシ血清 γ -グロブリン (BGG) の 50 mg を 5 ml の Veronal buffer (pH 8.5) 中で、37°C で 24 時間反応させる。これを同 Veronal buffer で 6 日間透析し、未反応の抗生物質を完全に除去したものをタンパク結合物とした。

なおこの結合物の penicilloyl 基とタンパクとの結合分子数の算出は、Penamaldate assay²⁾ によつて求めた。

(4) 免疫方法および抗血清の作成

(i) 皮下免疫：抗原 (RSA 結合物) と Freund's complete adjuvant を等量加え、emulsion にしたものをお 1 群 2 羽のウサギの背部皮下、約 10カ所に 0.1~0.2 ml ずつ感作し、週 1 回、4~8 週間感作した。最終免疫から 5 日目の血清をプールし、抗血清とした。

(ii) 経口免疫：AMPC および ABPC ハブテンの 0.5% メチルセルロース浮遊液を、100 mg/kg, 30 日間

連続経口投与を行ない、経目的に採血し、血球凝集抗体価のチェックを行なつた。

(5) 赤血球凝集反応

抗原の感作血球の作成は、LEY ら³⁾の方法に従がつた。すなわち、各抗生物質の 120 mg を含む Alsever 液 4 ml に等量のウサギ血液を加え、37°C, 1 時間 incubate した後、遠心分離した。沈渣の感作血球を生理食塩水で 3 回洗浄し、生理食塩水に 2% 浮遊液としたものを抗原とした。

各抗血清を生理食塩水で 0.3 ml の 2 倍希釈系列を作り、そのおののに感作血球を 1 滴加え 4°C, 20 時間静置した。これを鏡検で凝集を観察して、凝集を示す抗血清の最大希釈倍数で、抗体価および交差性の程度を求めた。

(6) 赤血球凝集ハブテン阻止反応

AMPC および ABPC ハブテンを 500 mM/ml になるように生理食塩水に溶解し、0.5 ml ずつの 2 倍希釈系列を作る。そのおののに 4 単位の希釈抗血清 0.5 ml を加え、37°C, 2 時間 incubate した後、その反応混合液の 0.3 ml に抗体と Homologous な感作血球 1 滴を加えた。その他は赤血球凝集反応と同様に処理し、凝集反応を 100% 阻止するに必要な最小ハブテン濃度で抗血清の特異性および交差性の程度を表わした。

(7) 定量沈降ハブテン阻止反応

通常の方法⁴⁾で抗血清 (抗 ABPC : RSA および抗 AMPC : RSA) とそれぞれ対応する完全抗原 (ABPC : BGG および AMPC : BGG) との当量域となる抗原量、抗体量を求めた。

抗生物質 (ハブテン) を 200 mM/ml になるように冷食塩加リソ酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し、0.5 ml ずつの段階希釈系列を作つた。そのおののに当量域を求めた抗血清 0.5 ml を加え、4°C, 20 時間反応させた後、あらかじめ決定しておいた抗原量を加え、さらに 4°C, 48 時間静置した。これを 3,000 rpm, 20 分、4°C で遠心し、沈降タンパクを冷食塩加リソ酸緩衝液で 3 回洗浄

後、沈降タンパク量を FOLIN-CIocalteau 法⁵⁾により測定した。

ハプテン相互の阻止力を比較するために、沈降反応を 50% 阻止するハプテン mM 数で表わした。

(8) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応

Ovary の方法⁶⁾に従つた。1 群 5 匹のモルモットの背部皮内に、各抗血清の 2 倍連続希釈液 0.05 ml を感作し、5 時間後抗原（抗生物質：BGG 結合物）とエバンス・ブルー混合液を足静脈に注入した。30 分後に反応部位の色素出現を観察し、色素流出を示す最大希釈血清濃度でもつて PCA 力値を表わした。

実験結果

(1) ペニシリン・タンパク結合物の解析

Table 1 に示すように、前述の条件下でのタンパク・モル当りの両ペニシリンの結合数は、RSA に対し、ABPC : 13, AMPC : 9; また、BGG に対し、ABPC : 23, AMPC : 20 と両ペニシリン間に大差は認められな

Table 1 Analysis of conjugates

Conjugates	pH	*Penicilloyl groups per mole conjugate
ABPC : RSA	8	13
ABPC : BGG	8	23
AMPC : RSA	8	9
AMPC : BGG	8	20

* Penamaldate assay

Table 2 The extent of cross-reactions obtained between AMPC and ABPC in passive haemagglutination reactions

Antiserum to	HA titers (antiserum dilution)		
	Normal cells	ABPC : treated cells	AMPC : treated cells
ABPC : RSA	0	256	256
AMPC : RSA	0	16	64

かつた。

(2) 赤血球凝集反応

経口的に AMPC および ABPC を投与し、経口的に採血し、血球凝集抗体価を測定した。

前述の条件下では、両ペニシリンに対する赤血球凝集抗体の産生は認められなかつた (Fig. 1, a)。また、皮下免疫で両ペニシリンに対する赤血球凝集抗体の産生が認められた (Fig. 1, b)。

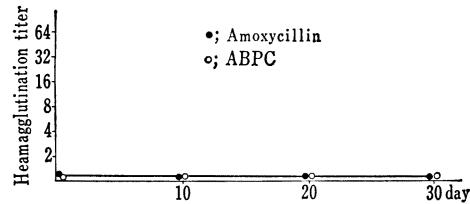
交差性は Table 2 に示すように、抗 ABPC : RSA 血清に対し、ABPC および AMPC 感作血球は同等の凝集力価を示した。他方、抗 AMPC 血清に対しては、

この成績から、赤血球凝集抗原抗体系で、ABPC 抗体に対して AMPC と ABPC は同程度の交差性を示す。他方、AMPC 抗体に対して ABPC は AMPC にくらべ弱い交差性を示す。

(3) 赤血球凝集ハプテン阻止反応

Table 3 に示すように、ABPC 抗原・抗体系の赤血球凝集反応を 100% 阻止するに必要な ABPC および

Fig. 1 Antigenicity of AMPC and ABPC
a) oral administration



b) intradermal administration

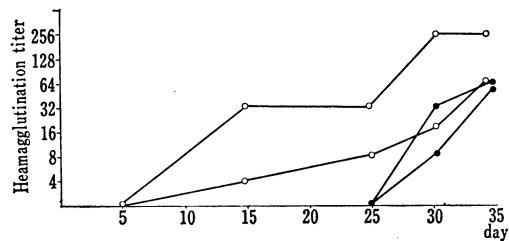


Table 3 Hapten concentrations required for 100% inhibition on passive haemagglutination reactions

Hapten Ag-Ab system	ABPC	AMPC
ABPC : treated cells-Anti-ABPC serum	6.25 mM	50.00 mM
AMPC : treated cells-Anti-AMPC serum	25.00 mM	3.13 mM

AMPC 感作血球は 64 倍の凝集力値を示したのに対し、ABPC 感作血球は 16 倍、すなわち 1/4 力値を示した。AMPC ハプテン mM 数は、それぞれ 6.25 mM, 50 mM であつた。すなわち、ABPC 抗体に対し、AMPC は ABPC にくらべ約 1/8 の交差性を示す。

いっぽう、AMPC 抗原・抗体系で阻止するに必要な AMPC および ABPC の濃度は、それぞれ 3.13 mM, 25 mM であつた。すなわち、AMPC 抗体に対し ABPC は AMPC にくらべ約 1/8 の交差性を示す。

以上の成績から、赤血球凝集抗体に対し、両ペニシリンの交差性を定量的に比較すると、それぞれ Homologous なペニシリンにくらべ、交差性は 1/8 となる。

(4) 定量沈降ハプテン阻止反応

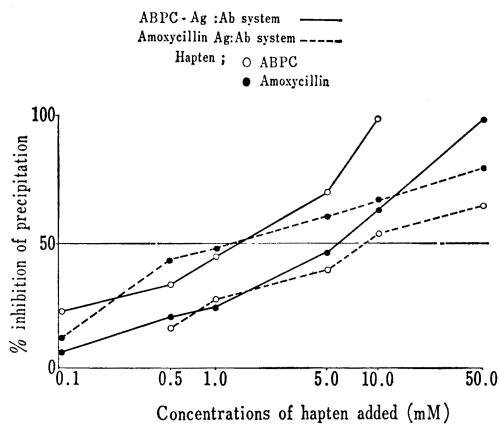
両ペニシリンの沈降抗体に対する交差性の程度を、Homologous な抗原・抗体系の沈降反応を 50% 阻止するに必要な AMPC または ABPC ハプテン mM 数を比較した。Table 4 および Fig. 2 から明らかなように、ABPC 抗原・抗体系で ABPC ハプテンは 1.25 mM で 50% 阻止するのに反し、AMPC は 5.5 mM を必要とする。すなわち、ABPC 沈降抗体に対し、AMPC は ABPC にくらべ約 1/4 の交差性を示す。

また、AMPC 抗原・抗体系で、AMPC ハプテンは 1.2 mM, ABPC は 8.75 mM 必要であつた。このこと

Table 4 Hapten concentrations required for 50% inhibition on quantitative precipitin reactions

Hapten Ag-Ab system	ABPC	AMPC
ABPC : BGG- Anti-ABPC : RSA	1.25 mM	5.5 mM
AMPC : BGG- Anti-AMPC : RSA	8.75 mM	1.2 mM

Fig. 2 Hapten inhibition of the precipitation of rabbit antisera against ABPC : RSA and AMPC : RSA by ABPC : BGG and AMPC : BGG



から AMPC 沈降抗体に対し、ABPC は AMPC の約 1/7 の交差性を示す。

以上の成績から、両ペニシリンの沈降抗体に対しても Homologous なペニシリンにくらべて約 1/4~1/7 の交差性を示すことが明らかになつた。

(5) PCA 反応

両ペニシリンの PCA 抗体に対する交差性の程度を、モルモットを用いる PCA 反応力値で比較した。

Table 5 に示すように、ABPC 抗体に対し、ABPC 抗原は 128 倍の力値を示すのに対し、AMPC は 16 倍であつた。すなわち、ABPC の PCA 抗体に対し、AMPC は ABPC にくらべ 1/8 の交差性を示す。また、AMPC 抗体に対し、両ペニシリンは完全交差性を示した。

他方、Benzylpenicilloyl 抗体に対する ABPC, AMPC の交差性を PCA 反応で比較すると、PC G にくらべ ABPC は 1/8 の交差性を示したのに対し、AMPC はさらに交差性が弱く 1/128 以下であつた。

Table 5 Cross reaction of passive cutaneous anaphylaxis of rabbit antisera against ABPC : RSA and AMPC : RSA

Antibody	PCA titer (Antiserum dilution)	
	ABPC : BGG	AMPC : BGG
Anti-ABPC : RSA	128	16
Anti-AMPC : RSA	256	256

Antibody	PCA titer (Antiserum dilution)		
	PC G : BGG	ABPC : BGG	AMPC : BGG
Anti-PC G : RSA	128	16	0

考 察

Amoxycillin は Ampicillin の新しい誘導体で、構造的には Ampicillin のアシル側鎖のベンゼンの α 位に OH 基が導入されている。ペニシリソ誘導体はいずれも β -ラクタム環を有し、penicilloyl-protein 結合物を形成するため当然抗体の産生が認められる。しかし交差性の面でペニシリソ抗体は、母核に対する抗体、アシル側鎖に対する抗体および Carrier タンパクを含めたペニシリソ全分子に対する抗体に分類できる⁷⁾。それ故に Amoxycillin と Ampicillin との交差性の程度は、共通の母核を有するため、そのアシル側鎖の免疫学的特性によつて影響をうける。

ここで得られた成績、すなわち Amoxycillin と Ampicillin との交差性を定量的に比較すると、完全交差をせず、約 1/4~1/8 弱いことが示された。これは Ampicillin の側鎖ベンゼンに OH 基が導入されることによつて免疫学的挙動に若干の差異が生じたものと解される。また、PC G 抗体に対しても Amoxycillin が Ampicillin にくらべ、さらに弱い交差性を示すのはアシル側鎖の α -NH₂ 基による立体障害および α 位の OH 基の導入の両方による結果と考えられる。

要 約

- (1) Amoxycillin は Ampicillin と同様、30日間、連続経口投与しても、抗体産生が認められなかつた。
- (2) Amoxycillin は他のペニシリソ、セファロスボリン系抗生素と同様、非経口的に投与すると Carrier protein と結合して特異血球凝集抗体、沈降抗体、PCA 抗体の産生が認められた。
- (3) Amoxycillin と Ampicillin との交差性は、赤血球凝集反応および阻止反応、定量沈降ハプロテイン阻止反

応および PCA 反応により、交差性を示す。しかしその程度は相互に約 1/4~1/8 程度となつた。

(4) PC G 抗体に対しても Amoxycillin は Ampicillin にくらべ弱い交差性を示した。

稿を終るにあたり、この研究に御援助をいただいた当中央研究所・中野所長および熊田副所長に感謝します。

文 献

- 1) 村川武雄、横田好子、河野洋子、西田実 : Amoxycillin の経口投与時の吸収排泄、代謝について。 Chemotherapy 投稿中
- 2) LEVINE, B. B. : N-(α -D-Penicilloyl) amines as univalent hapten inhibitors of antibody-dependent allergic reactions to penicillin. J. Med. Phar. Chem. 5 : 1025~1034, 1962
- 3) LEY, A. B.; J. P. HARRIS, M. BRINKLEY, B. LILES & J. A. JACK : Circulating antibody directed against penicillin. Science 127 : 1118~1119, 1958
- 4) KABAT, E. A. & M. M. MAYER : Experimental immunochemistry. 2nd Ed. 22~96 (Chap. 2) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A. 1961
- 5) FOLIN, O. & V. CIOCALTEU : Tyrosine and tryptophan determination in proteins. J. Biol. Chem. 73 : 627~650, 1927
- 6) OVARY, Z. : Progress in allergy. 5 : 459, 1958 (S. Karger, Basel & New York)
- 7) 峯靖弘 : セファロスボリン C 抗生物質の免疫学的研究。アレルギー 20(10), 798~808, 1971

AMOXYCILLIN, ANTIGENICITY AND ITS CROSS-REACTION WITH AMPICILLIN

YASUHIRO MINE, SHIGEO NONOYAMA and MINORU NISHIDA
Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
Osaka, Japan

SACHIKO GOTO and SHOGO KUWAHARA
Department of Microbiology, Toho University, School of Medicine
Tokyo, Japan

The antigenicity of amoxycillin and its cross reactivity with ampicillin and benzylpenicillin were studied and the following results were obtained.

1. Amoxycillin was shown to have no sensitizing activity in rabbits even after oral administration for as long as 30 consecutive days.

2. When injected into experimental animals, amoxycillin bound covalently with carrier protein and produced specific antibodies, hemagglutinin antibodies, precipitin antibodies and PCA antibodies.
3. The extent of cross reaction between amoxycillin and ampicillin was 1/4 to 1/8 that of the homologous penicillin system in passive hemagglutination and its inhibition tests and hapten inhibition of precipitation.
4. The cross reactivity of amoxycillin to benzylpenicillin was weaker than that of ampicillin.