

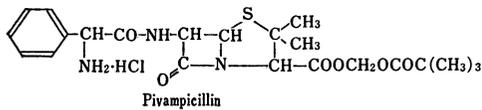
## Pivampicillin に関する免疫学的研究

岩田 正之・芹沢 淳

三共株式会社生産技術研究所

## 緒 言

Pivampicillin は Ampicillin の Pivaloyloxymeffryl ester であり、下記構造を有する。



Pivampicillinは、その臨床評価を終え2, 3の特性がみだされている。経口投与により Ampicillin に比較して、短時間に高い血中濃度がえられ<sup>1)</sup>、その原因は、Pivampicillin が腸管壁から組織内に速やかに移行するためであり、移行とともに esterase により Ampicillin に水解されるといわれている<sup>2)</sup>。

ペニシリンによる薬剤アレルギーは、他の薬剤によるものに比し非常に高く、臨床アレルギーの分野から、hypoallergenic なペニシリンの開発が望まれているところである。新規ペニシリン誘導体の開発に際し、その免疫学的挙動を明らかにすることは上述の意味からして必須の事項といえる。上記のごとく3位測鎖に特長ある構造を有する Pivampicillin の免疫原性、あるいは他のペニシリン誘導体との交差反応性は興味ある点で、今回の実験では市販ペニシリン誘導体との免疫原性を比較するとともに、それらの交差反応性を検討したので報告する。

## 材料および方法

## 1. 材 料

## (1) ペニシリン誘導体

Potassium benzylpenicillin	(PCG 三共 Co.)
Aminobenzyl penicillin	(ABPC 三共 Co.)
Pivampicillin	(PVPC 三共 Co.)
Pivaloyloxymethyl benzylpenicillin (PCG-POM)	三共 Co.)
Pivaloyloxymethyl aminobenzyl penicillenic acid	(PVPC-APA 三共 Co.)
6-aminopenicillenic acid	(6-APA Behringer Co.)
Benzylpenicillenic acid	(BPE)

Cephalexin (CEX 塩野義 Co.)

(2) Carrier および Adjuvant

Bovine Serum Albumin (BSA Frac V Armour Co.)

Bovine Gamma Globulin (BGG Frac II Armour Co.)

Rabbit Serum Albumin (RSA Crystallin Pentex Co.)

Human Serum Albumin (HSA Frac V Armour Co.)

Cytochrome C (Cyt C Horse 三共 Co.)

Taka amylase A (Taka A 三共 Co.)

Sheep red blood cell (SRBC 椎橋商店)

Freund's complete adjuvant (FCA Yatron Co.)

E. coli Lipopolysaccharide (LPS)

## (3) 動 物

ウサギ (2~3 kg) 白色在来種 雄

マウス (30~40 g) 浜松 d d Y系雄

モルモット (300~400 g) 浜松 Hartley 系雄

## 2. 免 疫 方 法

(1) ウサギに対する各種ペニシリン誘導体の免疫

JOSEPHSON<sup>3)</sup>の方法に準じて行なった。すなわち、PCG と ABPC 各 100mg/ml の水溶液、Pivampicillin 140mg/ml の水溶液および PCG-POM 140mg/ml の懸濁液をそれぞれ調製し、各液 1 volume と FCA 1.5 volume を混じ、ポッテンマイヤーガラスホモゲナイザーで W/O の emulsion を調製した。

この emulsion 2.5ml を第1日にウサギの四肢足蹠に各 0.6 ml ずつ皮下注射し、10日目に同様の emulsion を臀筋部に数カ所に分割して筋注した。さらに 18, 20, 22, 24 および26日目に ABPC と PCG の 100mg/ml 水溶液を各1ml ずつ静脈注射し、Pivampicillin および PCG-POM の 140mg/ml 水溶液あるいは懸濁液各 1ml を背部に皮下注射した。

最終の免疫から2週間放置して採血し、えられた抗血清について間接血球凝集反応で抗体価を測定した。

(2) ペニシリンと蛋白との結合物の調製

i) pH11 におけるペニシリンと蛋白との結合物の調製

PCG および ABPC 各 200 mg と BGG, RSA および BSA 200 mg を 10 ml の 0.15 M NaCl 加 0.01 M Phosphate Buffer (PBS) に溶解し、1 N-NaOH を加えて pH 11 に

補正し、37°Cで24~48時間放置した。その後セファデック G-25 (Fine) でカラムクロマトグラフィーを行ない、蛋白分画をえた。

#### ii) BPE を用いた蛋白結合物の調製

LEVINE<sup>4)</sup> の方法に準じ、BPE から benzylpenicilloyl (BPO) 蛋白結合物を調製した。

すなわち、BPE 100 mg を 0.2 ml のエタノールに溶解しこれを 1% HSA 水溶液に pH を 7.5 に 補正しつつ滴下した。75分間反応後、反応物を遠心分離し、上清を十分に透析した。

#### (3) 結合物でのウサギ免疫

ABPC-BGG 結合物と PCG-BGG 結合物でウサギを免疫した。各結合物の 5 mg/ml (蛋白量として) 溶液 1 容と FCA 1.5 容とで water in oil の emulsion を調製した。emulsion 2.5 ml をウサギの四肢・足趾に各 0.6 ml ずつ皮内注射し、2週後に同様の emulsion 2.5 ml を臀筋に数カ所に分けて筋注した。

さらに、2週間放置した後、結合物の水溶液 1 ml (5 mg/ml) を皮下注射し、最終感作から10日後に採血した。

#### (4) マウスに対する各種ペニシリン結晶の免疫

各種ペニシリン溶液の 10 mg/ml 液 1 容と、LPS 1 mg/ml 溶液 1 容とを混じ、この混合液 0.2 ml をマウス腹腔内に注射した (この条件でペニシリンおよび LPS の投与量は、マウス当り前者で 1 mg、後者で 0.1 mg となる)。

免疫スケジュールは 1, 3, 6, 10 および 13 日目に注射し、さらに 26 日目に booster 注射を行なった。

採血は尾静脈から 7, 15, 20, 26 および 31 日目に計 5 回行なった。

### 3. 血清免疫学的測定法

#### (1) 赤血球凝集反応およびハプテン阻止反応

LEVINE<sup>5)</sup> の方法に準じて行なった。すなわち、ヒツジ赤血球 (SRBC) を PBS でよく洗浄後、16% 血球浮遊液 2~3 容と抗生物質の 40 mg/ml 液 10 容とを混じ、37°C で 1 時間反応させて感作血球を調製した。使用した緩衝液は等張の 0.1 M Trimethanolamine pH 10.0 で、感作後の血球の洗浄および凝集反応には等張の 0.02 M Tris hydroxyaminomethane pH 8.2 (TBS) 緩衝液を用いた。BPO-HSA 感作血球は AVRAMEAS<sup>6)</sup> の方法に準じ、グルタルアルデヒドを用いて調製した。すなわち、2-(2)-ii) で調製した BPO-HSA 25 mg と SRBC の沈渣 1 ml および PBS 25 ml を混じ、dropwise に 2.5% グルタルアルデヒド 5 ml を滴下し、1 時間反応後、よく遠慮で洗浄し、最終 1% として用いた。赤血球凝集反応はマイクロタイタープレートを用いて行なった。すなわち、TBS に 2~3% に Dextran T-70 を溶解した緩衝液 (Dex-TBS) をプレートの第 1 管目にのみ

マイクロタイター用のドロップパーで 2 滴々下し、さらに被検血清 5 ないし 10 ml を加え、2 管以降に Dex-TBS を 1 滴ずつ滴下し、その後はダイリューターで 2 倍希釈を行ない希釈終了後、上記感作血球の 1% Dex-TBS 浮遊液を各管に 1 滴ずつ滴下し、混和後一夜放置し、管底像から反応を読みとった。

2-(1) または 2-(3) 項でえられた抗血清を用いてハプテン赤血球凝集阻止反応を行なった。予めえられた抗血清の最高凝集陽性希釈倍数を 1 単位とし、4 単位の凝集価を有する希釈液を調製し、一方、マイクロタイタープレート上でハプテンの 2 倍希釈系列を作成しておき、各管に 4 単位の抗血清希釈液を滴下した。プレートを混和後、室温で 1 時間放置してから感作血球液を滴下し、再度混和、一夜放置して反応を判読した。Pivampicillin の阻止反応の場合、本品は中性およびアルカリ性の緩衝液中で溶解性が低いため、すべて緩衝能のない生食水を用いた。

#### (2) モルモットの全身アナフィラキシー

KABAT<sup>7)</sup> の方法に準じて行なった。アナフィラキシーの強さは(卅)死、(卅)重篤なチアノーゼ、(+)充血、発咳症状、(±)正常とは異なるが、明らかな症状も認められない、(-)正常の段階に分け、(+)以上の反応を陽性とした。

#### (3) 定量沈降反応およびハプテン阻止反応

定量沈降反応では抗血清 0.25 ml と濃度遞増抗原液 0.25 ml を混和、37°C で 1 時間放置させ、さらに、一夜 4°C におき、沈降物を生ぜしめた。沈降物を冷 PBS で 3 回遠慮洗浄し、含有蛋白量を Folin-Ciocalteu 法で測定した。定量沈降反応で求められた当量域の抗原量を用い、それに対するハプテンの阻止能を次のごとく測定した。すなわち、適当な濃度のハプテン溶液 0.25 ml と抗血清 0.25 ml を加え、37°C で 1 時間放置、先に決定された抗原量を加え、さらに 37°C で 1 時間、4°C で一夜放置後、前述の定量沈降反応と同一操作で沈降物の蛋白量を求めた。

#### (4) IgM, IgG 抗体の分別測定

成内ら<sup>8)</sup> の方法に準じて、血球凝集反応における IgM, IgG 抗体の分別的測定を行なった。すなわち、マイクロタイタープレートの第 1 管に TBS に溶解した 0.2 M メルカプトエタノールを常法通り滴下し、抗血清を所定量加え、混和後 37°C で 3 時間放置し、その後は本項 3-(1) に記載した方法で行なった。

## 実験結果

1. Pivampicillin および各種ペニシリン誘導体のウサギにおける免疫原性

Table 1 Hemagglutination titers of rabbit antisera for penicillin-coated SRBC (Titers were expressed as multiplicity of serum dilution)

Antiserum (No of rabbits)	Penicillin-coated SRBC		
	PCG-SRBC	ABPC-SRBC	BPO-HSA-SRBC
PCG (8)	128	0	640
	8	0	320
	16	0	320
	64	0	320
	2	1	160
	1	0	160
	1	0	320
	32	0	1280
average	31	0.1	440
ABPC (6)	256	64	5120
	512	64	5120
	128	128	640
	128	64	640
	4	8	640
	2	2	320
average	171	55	2080
PVPC (10)	8	0	40
	0	0	20
	0	0	40
	1	0	320
	4	1	80
	1	1	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	2	1	40
average	1.6	0.3	54
PCG-POM (9)	0	0	20
	2	1	80
	2	1	320
	1	1	0
	1	1	0
	2	0	160
	1	1	20
	1	1	20
	2	2	40
	average	1.3	0.9

Table 1 には4種のペニシリン誘導体を FCA とともに免疫してえられた抗血清を正常 SRBC で吸収した後の、ペニシリン感作 SRBC に対する赤血球凝集反応の結果が示されている。PCG 免疫血清は PCG 感作血球と強い凝集反応を示したが、ABPC 感作血球とは凝集反応を示さなかった。ABPC 免疫血清は対応する感作血球のほかにも PCG 感作血球とも強い凝集反応を示した。一方、Pivampicillin および PCG-POM 免疫血清は PCG 感作血球と ABPC 感作血球との間にほとんど凝集反応を示さず、わずかに Pivampicillin 免疫血清10例中1例のみが8倍の凝集価を示したにすぎなかった。これら4種の免疫抗血清は BPO-HSA 感作血球で assay すると他の2種の感作血球を用いた場合より高い凝集価がえられたが、ABPC 免疫抗血清の凝集価が最も高く、次に PCG 免疫抗血清の順位で、これらに比較し、Pivampicillin および PCG-POM 免疫抗血清の凝集価は有意に低かった。

以上の結果から、ABPC および PCG それぞれの pivampicillin ester 誘導体である Pivampicillin と PCG-POM はいずれも原体の ABPC および PCG より免疫原性が弱いと結論される。

今回用いた血球凝集反応系で Pivampicillin および PCG-POM で感作した血球と、それらに対する抗血清との間の反応がみられなかったのは、Pivampicillin と赤血球とを混ぜるとき、凝血あるいは溶血が起こること、また PCG-POM はきわめて水に対する溶解度が低いことなどの理由で、感作血球を調製できないためであった。しかし、後述するごとく、Pivampicillin と ABPC は密接な交差反応性を有するから、ABPC 感作血球を用いることで Pivampicillin 免疫抗血清の抗体価を類推しようものと考ええる。

## 2. 蛋白結合抗原の免疫によってえられた抗血清の血

Table 2 Hemagglutination titers of antisera against penicillin-protein conjugates.

Antiserum	Animal No	Penicillin-coated SRBC	
		ABPC-SRBC	PCG-SRBC
ABPC-BGG	1	256	256
	2	32	16
	3	1,024	128
PCG-BGG	1	256	1,024
	2	256	2,048
	3	16	32

Table 3 Inhibition of hemagglutination with various penicillin derivatives<sup>1)</sup>

Antibody-Antigen reaction system		Penicillin derivatives					
Antiserum	Penicillin-coated SRBC	ABPC	PCG	PVPC	6-APA	6-APA-POM	CEX
Anti PCG-BGG conjugate	PCG-SRBC	0.01	<0.01	0.02	1.25	1.25	1.25
	ABPC-SRBC	0.01	<0.01	0.01	1.25	0.62	>5.0
Anti ABPC-BGG conjugate	PCG-SRBC	0.08	<0.01	0.04	>5.0	>5.0	>5.0
	ABPC-SRBC	<0.01	5.0	<0.01	>5.0	>5.0	2.5
Anti ABPC <sup>2)</sup>	PCG-SRBC	0.04	0.15	0.15	1.25	1.25	>5.0
	ABPC-SRBC	0.01	0.08	0.01	0.08	0.08	5.0

1) Data represent the lowest concentration (mM) of penicillin derivatives required to inhibit hemagglutination

2) Anti ABPC was obtained by immunization of ABPC crystallin

### 球凝集反応

ABPC-BGG および PCG-BGG をウサギに免疫してえられた抗血清の血球凝集反応の結果を Table 2 に示した。各抗原をそれぞれ3匹のウサギに免疫し、このうち各2匹に比較的高い凝集価を有する血清がえられた。

### 3. 赤血球凝集反応に対するハプテン阻止反応

Table 1 に示した ABPC 結晶免疫血清のうち、比較的高い凝集価を示した No.2 の抗血清、Table 2 に示した ABPC-BGG 免疫血清中 No.1 の抗血清、および PCG-BGG 免疫血清中 No.1 の抗血清の3種を用いて、赤血球凝集反応に対するハプテン阻止反応を行ない、種々のペニシリン誘導体の交差反応を検討した。

結果を Table 3 に示した。PCG-BGG 抗血清と PCG-SRBC または ABPC-SRBC との反応系において、PCG が最も低濃度で凝集阻止活性を示した。これに比較し、ABPC は 0.01mM、Pivampicillin は 0.01 かまたは 0.02 mM の阻止濃度を示し、ほぼ阻止活性は同等であった。

また、ABPC-BGG 抗血清と ABPC-SRBC の反応系では、ABPC と Pivampicillin の阻止濃度はともに 0.01 mM 以下であった。

さらに、ABPC 抗血清と ABPC-SRBC との系でも ABPC と Pivampicillin の阻止活性は同等であった。

次に他のハプテンの阻止能に興味ある点をあげると、いずれの反応系においてもセファロスポリン誘導体の CEX が非常に阻止活性が低いこと、6-APA と 6-APA-POM はいずれも阻止活性が低いが、両者間はほぼ同等であること、さらに、ABPC-BGG 血清と ABPC-SRBC の反応系で PCG の阻止能がきわめて弱いこと (5mM で阻止) などがあげられる。

最後にあげた知見は、多分この抗血清が ABPC のア

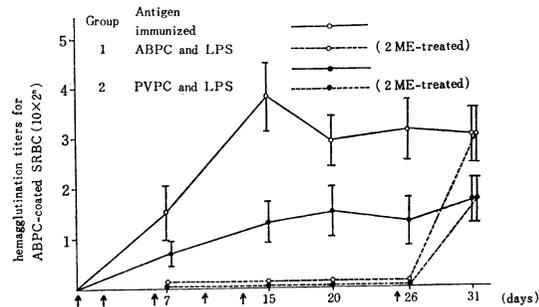
シル側鎖に高い特異性を有すること、あるいは、この側鎖部の抗原抗体反応が立体障害的に骨格部の反応を阻害している可能性を示していると思われる。

ABPC と Pivampicillin の交差反応性は上記のデータが示すごとく、ほとんど同等であり、従って、Pivampicillin の3位に存在する長いエステルは凝集反応においては影響を与えないと結論される。

### 4. マウスにおける Pivampicillin および ABPC の免疫原性

Fig. 1 は Pivampicillin と ABPC をそれぞれ LPS とともにマウスに免疫し、その後の抗体産生を赤血球凝集

Fig. 1 Antibody responses of mice immunized with ABPC or Pivampicillin.



Mice of group 1 were injected 1mg of ABPC and 0.1 mg of LPS, and mice of group 2, 1.3mg of PVPC and 0.1mg of LPS. Antigen was injected six times on day 1, 3, 6, 10, 13 and 26. Arrows indicate dates of injection. Each point and bar represents mean hemagglutination titers of sera and their SE in 10 mice.

反応により追跡した結果を示したものである。

ABPC では数回の免疫後、急激な抗体価の上昇が認められ、15日目に抗体価のピークがみられ、そのピークの高さは  $10 \times 23.8 \pm 0.68$  であった。その後、抗体価は低減し、Booster 後も顕著な抗体価上昇は認められなかった。

一方、Pivampicillin の場合は、免疫に伴って抗体価の上昇を認めたものの、その度合は ABPC に比し有意に低く、明らかなピークを示さなかった。

次に、これら凝集抗体の class を 2-ME 処理によって調べた。7, 15, 20 および 26 日目の抗体はすべて 2-

ME 処理によって ABPC 群、Pivampicillin 群ともに、失活し、IgM 抗体であることが明らかであった。しかし、Booster 後は両群ともに凝集価の低下は全くなく、従って、IgG 抗体におき換っていることが推察された。

以上のごとく、マウスに対する Pivampicillin の抗原性はウサギの実験成績と同様に、ABPC に比較して有意に弱いことが明らかにされた。

5. 蛋白結合抗原の免疫によってえられた抗血清の定量沈降反応と、ハプテン阻止反応

Fig. 2 に ABPC-BGG 結合物または PCG-BGG 結合物でウサギを免疫してえた抗血清の定量沈降反応曲線を示した。

ABPC-BGG 抗血清は蛋白量として 75mcg の抗原添加により maximum の沈降物がえられ、一方、抗 PCG-BGG 抗血清は 100mcg の抗原量が当量域と推察された。

次に、これら当量域の抗原、抗体系に、ハプテン量を過量的に添加して阻止反応を行なった。その結果を Fig. 3 に示した。ABPC-BGG 抗血清対 ABPC-RSA 系においては、homologous な ABPC が最も低濃度のハプテン活性を示し、これに対し Pivampicillin ではやや弱く、さらに PCG, 6-APA, CEX の順に阻止能は弱まった。

一方、抗 PCG-BGG 対 PCG-RSA 系では、PCG が最も阻止能が強く、これに対し ABPC および Pivampicillin は著しく弱い阻止能しか認められなかった。

以上のごとく、Pivampicillin は ABPC-BGG 抗血清に対しては、PCG よりはるかに交差反応性が高く、

Fig. 2 Quantitative precipitin curves obtained from anti Penicilloyl-BGG conjugate and Penicilloyl-RSA conjugate.

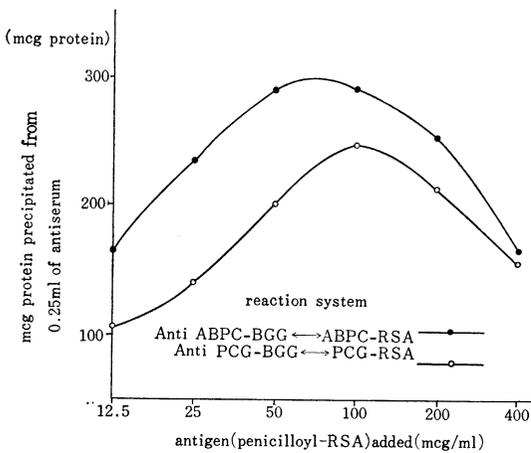
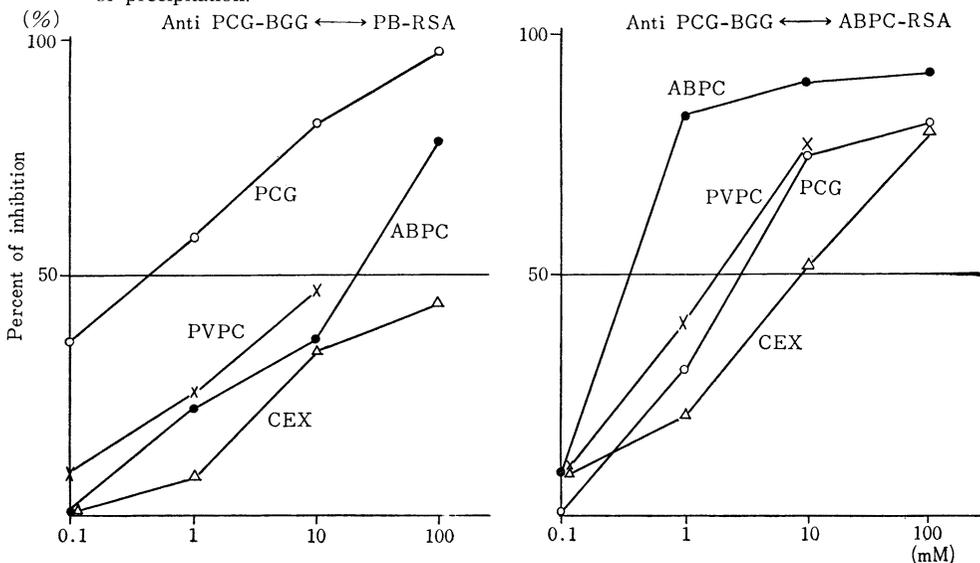


Fig. 3 Hapten inhibition of precipitation with penicillin derivatives and cephalixin. Hapten (0.25ml) of different concentrations (0.1~100mM) were added to equivalent zone of Ag-Ab reaction system. Each point represents percent inhibition of precipitation.



PCG-BGG 抗血清に対しては PCG より弱く、ABPC とほぼ同等の交差性を有するものであった。

#### 6. Pivampicillin と蛋白との結合および結合物の抗原性

ペニシリンの抗原性については多くの報告に明らかごとく、生体内でのペニシリンと蛋白との結合物の生成に基因すると考えられている。この場合、major antigenic conjugate は penicilloyl-protein conjugate であろうと思われ、この結合物生成のメカニズムが direct aminolysis によるのか、あるいは一旦 penicillic acid を経て生成されるかは論議の多いところではあるが、ペニシリンの免疫原性を推察するため *in vitro* でのペニシリンと蛋白との結合量を測定することが有力である。

実験は pH 5.0 において 10 $\mu$ mol の Pivampicillin または ABPC と 0.1 $\mu$ mol BSA を incubate したときの BSA に対する結合量を測定したものである。pH 5.0 は Pivampicillin の溶解しうる最高の pH であり、望むらくは生体と同様、中性条件で incubate したいが、沈殿物ができ、不可能であった。結合モル数は ABPC の場合は LEVINE による Penamaldate 法<sup>9)</sup>により算出した。

一方、Pivampicillin は Penamaldate 法による分子吸光係数が不明のため、放射性 Pivampicillin を tracer として加え、放射活性から結合モル数を算出した。Table 4 から明らかごとく、Pivampicillin の BSA に対する結合は ABPC の場合の約1/7.5であり、Pivampicillin

Table 4 Protein conjugation of ABPC or PVPC

	conjugated mol/BSA mol
PVPC-BSA	0.48
ABPC-BSA	3.62 <sup>2)</sup>

#### Experimental conditions

BSA 0.1 $\mu$ mol (7mg) in 1ml H<sub>2</sub>O : 0.1 $\mu$ mol  
 ←PVPC 49mg or ABPC 38mg in 7ml H<sub>2</sub>O : 100 $\mu$ mol  
 ←C<sup>14</sup>-PVPC<sup>1)</sup> 1mg  
 ←universal Buffer pH 5.01 ml

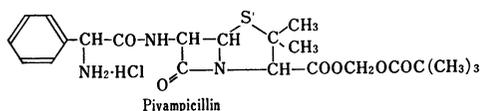
37°C 72hr. incubation

dialysis 1 week

Sephadex G-25 (Fine) column chromatography

measurement of radioactivity of protein fraction

1)



2) penamaldate assay

Table 5 Anaphylactic responses of guinea pigs immunized with penicillin-protein conjugates

immunogen	inducer	anaphylactic responses				positive percentage	
		##	++	+	± -		
PCG-BSA	BPO-HSA HSA	0	2	1	1	1	60
		0	0	0	0	5	0
ABPC-BSA	BPO-HSA HSA	0	1	4	1	2	62
		0	0	0	0	5	0
PVPC-BSA-SUP	BPO-HSA HSA	0	0	0	4	6	0
		0	0	0	3	2	0
PVPC-BSA-PPT <sup>(1)</sup> EtOH-sol	BPO-HSA HSA	0	0	0	0	5	0
		0	0	0	0	5	0
PVPC-BSA PPT <sup>(2)</sup> EtOH-insol.	BPO-HSA	5	0	2	0	0	100
	HSA	5	0	0	0	0	100
	BPO-Taka-A	0	0	0	0	3	0
	Taka-A	0	0	0	0	3	0
	BPO-Cyt. C	0	0	0	0	3	0
	Cyt. C	0	0	0	1	2	0

Immunogen (1) and (2) were obtained from the reaction mixture of PVPC-BSA conjugation which yielded water insoluble precipitate. (1) was ethanol soluble fraction, and (2) insoluble fraction of the precipitate respectively. Immunization procedure was as follows; groups of guinea pigs were administered i.p. 1.5 mg (protein) of conjugate, 20mg of PVPC-BSA PPT EtOH-sol. and 2mg of EtOH insol each per injection. Injection was repeated 3 times at intervals of 4 days in weeks after the last injection, animals were challenged by inducer as indication.

の抗原性が弱いことと考え合わせ興味深い。

次に Table 4 に示した実験とは別に、preparative な conjugation を Pivampicillin, ABPC, PCG 三者について行ない、えられた conjugate をモルモットに免疫し、その免疫原性を比較した。この場合、えられる結合物(Hapten-carrier conjugate) の Hapten 結合モル数があまりに少ないと、Anti-hapten の産生がないため、preparative な実験では pH を 7.0 にして incubate し、結合モル数を増した。この条件では Pivampicillin の場合、前述のごとく沈殿物が出るため、上清分画 (PVPC-BSA-SUP) と沈殿部分に分け、沈殿物は水洗後、エタノール抽出によりエタノール不溶 (PVPC-BSA ppt EtOH-insol.) と可溶 (PVPC-BSA ppt EtOH-sol.) の分画に分け、これら三分画を免疫した。

結果を Table 5 に示した。まず、惹起抗原として BPO-HSA を用いると、PCG-BSA 結合物免疫モルモットは60%の陽性率を示し、一方、ABPC-BSA 結合物免疫モルモットも62%の陽性率を示し、ほぼ両者は同程度の免疫原性を有するものであることがわかった。他方、

PVPC-BSA 結合物の上清分画と沈殿分画中エタノール可溶分画は全例が疑陽性または陰性を示し、その免疫原性はきわめて弱かった。次にこれら免疫モルモットを carrier 蛋白の HSA で惹起すると、いずれのグループの動物もアナフィラキシー陽性反応を示さなかった。従って、PCG-BSA および ABPC-BSA 免疫モルモットを BPO-HSA で惹起したときにみられた陽性反応は BPO-group に特異的な反応であることが明らかで、一方、PVPC-BSA 上清部と PVPC-BSA 沈殿部のエタノール可溶分画は同一感作条件において BPO-group に対する免疫原性が発現しなかったと解釈される。

次に、PVPC-BSA 沈殿部のエタノール不溶分画についてみると、BPO-HSA で惹起した場合、100%の陽性率を示したが、HSA で惹起しても同様の結果がえられた。従って、この不溶分画は少なくとも HSA と交差する抗原性をもつものと考えられた。

次に、BPO-group に対する免疫原性の有無を確認する目的で carrier 蛋白 (BSA) と全く交差しない Taka-A および cyt. C と、それぞれの BPO 結合物を惹起抗原に用いて検討した。

その結果は Table 5 の下段から明らかなごとく、いずれの惹起抗原を用いてもアナフィラキシー反応陰性であり、従って、この分画も BPO-group に対する免疫原性を、ここで用いた実験条件下で、発現しなかったと考えられた。

以上のごとくエタノール不溶分画は HSA に交差する強い免疫原性を有するが、一般にヒト血清蛋白がウシあるいはウマなどの血清蛋白と同一クラス同士の蛋白間に交差反応性を示すことが知られているように、エタノール不溶分画の成績もこのことを示すと思われ、多分 Pivampicillin と BSA との *in vitro* での反応中、BSA が水に対して不溶化するような変性を与えられ、その結果、強い免疫原性を獲得し、HSA とも交差反応を有するに至ったものと考えられる。このことはエタノール不溶分画のアミノ酸分析の結果からも支持され、Native BSA ときわめてよく合ったアミノ酸組成を示した。

## 考 察

ペニシリンの抗原性は標品に混在する Macro-molecular impurity に原因するという根強い主張がある<sup>10)</sup>が、むしろ生体蛋白との結合物生成によるペニシリン hapten の免疫原性の発現を示す多くの報告があり、このことの方がより重要であろう。*in vitro* でのペニシリンと蛋白との結合に関しては数多くの様式が知られている<sup>11)</sup>が、Penicilloyl-protein conjugate が major antigen で

あることは臨床アレルギーの分野から明らかであるし<sup>12)</sup> また、動物実験の成績<sup>4)</sup>からも支持を受けている。

Penicilloyl-protein conjugate の生成メカニズムに関して FEINBERG<sup>13)</sup>, LEVINE<sup>14)</sup>, DEWECK<sup>15)</sup> らの Penicillic acid を中間産物として penicilloyl-diastereomer mixture が生成されるという考え方があり、一方、lysine の  $\epsilon$ -アミノ基などによるペニシリンの direct aminolysis<sup>16)17)</sup> による conjugate 生成も重要な経路と考えられている<sup>13)</sup>。我々は Pivampicillin の結晶をウサギとマウスに対し、アジュバントとともに免疫し、その抗原性が ABPC および PCG に比較して弱いことを明らかにしたが、その原因は 3 位側鎖の pivaloyloxymethyl ester の存在に基づくものと考えられた。

なぜなら、PCG に同一側鎖をつけた PCG-POM の場合、同様に PCG の免疫原性の低下が認められるためである。*in vitro* における Pivampicillin と蛋白による penicilloyl conjugate の生成は ABPC のそれに比し少なく、えられた標品をモルモットの全身アナフィラキシーによって、その抗原性を検討した結果、Pivampicillin と蛋白の反応物は penicilloyl conjugate に対してアナフィラキシーショックを発現しなかった。Pivampicillin の吸収排泄に関する実験成績は、本品が経口投与後速やかに血中に ABPC として出現することを示した<sup>1)</sup>。このことと本品の抗原性が弱いこととは相反するようと思われる。しかし、抗原性に関する今回の実験条件が注射投与であることを考慮する必要がある。注射投与においては、本品は生体の緩衝能から不溶化する。事実 *in vitro* で中性条件で蛋白と incubate すると多量の沈殿物がえられ、その 90% が Pivampicillin または Pivampicillin の分解物であった。注射局所の不溶化した Pivampicillin はその後わずかずつ生体 esterase によって水解され、ABPC になると思われるが、注射局所での蛋白との interaction による結合物生成は、少なくとも ABPC を注射した場合より少ないであろうことは容易に推察される。また、注射局所は炎症を伴い、マクロファージを初めとして多くの immuno reactive cell が集簇すると思われ、この場合これら細胞の esterase によっても Pivampicillin は水解されると思われ、この際生成される formalin または pivalic acid が cytotoxic に作用し、細胞の immunological recognition を阻害する可能性も考えられる。

次に Pivampicillin と ABPC の交差反応性であるが、血球凝集反応において、両者にほとんど差のないことが明らかにされた。一方、定量沈降反応では、抗 ABPC-BGG 対 ABPC-RSA の反応系でやや ABPC より Pivampicillin が交差性が弱かったが、抗 PCG-BGG 対

PCG-RSA 系ではむしろ ABPC より Pivampicillin の方が交差性が強い傾向が認められた。このように Pivampicillin と ABPC との交差性は、ほぼ同等程度と考えられ、3 位側鎖は *in vitro* における抗原抗体反応には影響を与えないことがわかる。

同様の知見はセファロsporin系抗生剤で<sup>18)</sup>がえていて、同一の母核および7位側鎖を有し、3位側鎖の構造を異にする3種誘導体の抗 PCG 抗体に対する交差性が同程度であることと似ている。また、ABPC と PCG 間の交差性は著しい差が認められ、ABPC 抗体に対する PCG また PCG 抗体に対する ABPC は、それぞれかなり交差性が弱かったが、これらの成績は NISHIDA<sup>19)</sup>らの結果とよく一致し、phenyl acetyl 基に導入されたアミノ基が免疫学的交差性に強く影響を与えるものと推察される。

### 総 括

1. Pivampicillin のウサギおよびマウスに対する免疫原性は Ampicillin に比し弱く、同様の結果が Benzylpenicillin とその pivaloyloxymethyl ester 誘導体についても認められ、3 位側鎖の存在によって免疫原性が弱められることが確認された。

2. 抗 Ampicillin に対して Pivampicillin は Ampicillin と同程度に強い交差性を示し、一方、抗 benzylpenicillin に対して Pivampicillin は Ampicillin と同程度の弱い交差性を示した。従って、Pivampicillin の3位側鎖は *in vitro* での抗原抗体反応において影響を与えない。

3. *in vitro* での蛋白との結合物生成に関して、Pivampicillin は Ampicillin に比して、その生成量が少なかった。同一条件で Pivampicillin, Ampicillin, Benzylpenicillin それぞれの蛋白結合物を調製し、これをモルモットに免疫した結果、Pivampicillin 結合物には penicilloyl group に対する免疫原性が認められなかった。

### 参 考 文 献

- 1) DAEHNE, W. V.: Acyloxymethyl ester of ampicillin: J. Med. Chem. 13: 607, 1970
- 2) 進藤英世, 河合賢治, 福田邦昭, 松村雅子, 田中和代, 田中実, 横田多美子: Pivampicillin の吸収と代謝: 第5回薬物代謝と薬効, 毒性シンポジウム, 1973年, 静岡
- 3) JOSEPHSON, A.S.: The development of antibodies to penicillin in rabbits, J. Exp. Med. 111, 611, 1960
- 4) LEVINE, B.B. & OVARY, Z.: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen, III. The N-

(D- $\alpha$ -Benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875, 1961

- 5) LEVINE, B.B., FELLER, M.J. & VERA LEVYTSKA: Benzylpenicilloyl specific serum antibodies to penicillin in man. I. Development of a sensitive hemagglutination assay method and haptenic specificities of antibodies. J. Immunol. 96: 707, 1966
- 6) AVRAMEAS, S., B. TAUDO, & S. CHUILON: Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetrazotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test: Immunochem. 6: 67, 1969
- 7) KABAT, E.A. & M.M. MAYER, : Experimental immunochemistry 2nd Edition Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A. 1961
- 8) 成内秀雄, 白井美津子, 松橋直, 藤本吉秀: 抗形質細胞腫血清による抗体産生の抑制に関する研究: 移植 5: 120, 1970
- 9) LEVINE, B.B.: N( $\alpha$ -D-penicilloyl) amines as univalent hapten inhibitors of antibody-dependent allergic reactions to penicillin. J. Med. Pharm. Chem. 5: 1025, 1962
- 10) STEWART, G.T.: Macromolecular residues contributing to the allergenicity of penicillins and cephalosporins: Antimicrob. Agents Chemother. 7: 543, 1968
- 11) SCHWARTZ, M. A.: Chemical aspects of penicillin allergy J.P.S. 58: 643, 1969
- 12) PARKER, C.W., SHAPIRO, J., KERN, M. & EISEN, H.N.: Hypersensitivity to penicillenic acid derivatives in human beings with penicillin allergy. J. Exp. Med. 115: 821, 1962
- 13) FEINBERG, J.G.: Allergy to antibiotics. II. Comparative immunogenicity of some penicillins. Arch. Allergy 33: 444, 1968
- 14) LEVINE, B.B.: Studies on the formation of the penicillin antigen. II. Some reactions of D-benzylpenicillenic acid in aqueous solution at pH7.5. Arch. Biochem. Biophysics. 93: 50, 1961
- 15) DEWECK, A. L.: Chemical and biological basis of penicillin antigenicity. Proc. Europ. Soc. Stud. Drug. Tox. 4: 206, 1964
- 16) SCHNEIDER, C.H. & A.L. DEWECK, : Chemisch aspekte der penicillin-allergie. : Die direkte penicilloylisierung von  $\epsilon$ -amino gruppen durch penicillin ebei pH 7.4. Helv. Chim. Acta 49: 1695, 1966
- 17) BATCHELOR, F.R.; J.M. DEWDNEY & GAZZARD, D.:

- Penicillin allergie. The formation of the penicilloyl determinant. *Nature* 206 : 362, 1965
- 18) 峯 靖弘 : セファロsporin C 抗生物質の免疫学的研究。アレルギー 20 : 798 1971
- 19) NISHIDA, K. T. KINOSHITA, T. ATSUMI, K. SHIBATA, & Y. HORIUCHI, The analysis of combining sites of rabbit anti-benzylpenicilloyl antibodies. *Immunochem.* 9 : 1195, 1972

## IMMUNOLOGICAL STUDIES ON PIVAMPICILLIN

MASAYUKI IWATA and JUN SERIZAWA

Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

Immunological properties of pivampicillin were compared with those of ampicillin and benzylpenicillin, and the following results were obtained.

1. Antigenicity of pivampicillin to rabbits and mice was weaker than that of ampicillin, and the similar results were observed in benzylpenicillin and its pivaloylmethyl ester derivative. It was concluded that esterification of carboxylic group on position 3 of penicillin ring decreases antigenicity of the original compounds.
2. Cross reactivity of pivampicillin to anti-ampicillin and anti-benzylpenicillin was nearly at the same degree as that of ampicillin.
3. Ratio of covalent binding of pivampicillin to carrier protein was much less than that of ampicillin. Anaphylactic tests demonstrated in guinea pigs that pivampicillin-carrier conjugate did not develop antigenicity to penicilloyl group while ampicillin or benzylpenicillin carrier conjugate did.