

## T-1220 に関する免疫学的研究

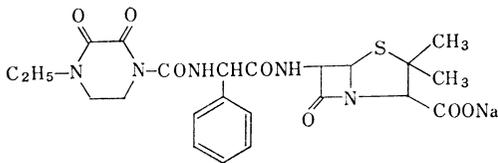
高井 明・米田豊昭・柴田哲夫

富山化学工業株式会社総合研究所

真 下 啓 明

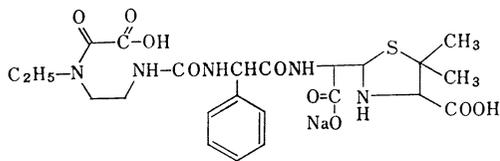
東京大学医科学研究所内科

Sodium 6-[D(-)- $\alpha$ -(4-ethyl-2, 3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)- $\alpha$ -phenylacetamido] penicillanate (T-1220) は新しい半合成 penicillin 系抗生物質で、下記化学構造を有する Aminobenzylpenicillin (ABPC) の誘導体である。



抗菌活性はグラム陽性および陰性菌にわたり幅広い抗菌スペクトルを有し、特に、緑膿菌および肺炎桿菌に対し従来の penicillin 系抗生物質より優れた抗菌力を示すことが明らかにされている<sup>1)</sup>。

Penicillin 系薬剤によるアレルギー性副作用の発生頻度は他の薬剤によるものに比し、比較的高いことが知られているので、本報では T-1220 の免疫学的挙動として T-1220 の抗原性、Penicillin G (PCG), ABPC との免疫学的交叉性およびクームス反応性について検討したので、その結果について報告する。なお、T-1220 は蛋白結合物を調製する際の弱アルカリ条件 (pH 8.5) では一部分解し、dioxopiperazine 環の開いた  $\alpha$ -{3-[ $\beta$ -(N-ethyl-N-oxaloamino) ethyl] ureido} benzylpenicillin (T-1220 A) を経て最終的に  $\alpha$ -{3-[ $\beta$ -(N-ethyl-N-oxaloamino) ethyl] ureido} benzylpenicilloic acid (T-1220 C) を生成することが知られているので<sup>2)</sup>、交叉反応のハプテンとして下記構造式を有する T-1220 C も使用した。



## I. 実験材料および実験方法

## 1. 材料

## 1) 抗生物質

T-1220, T-1220 C (Na 塩) (富山化学)  
 Aminobenzylpenicillin (ABPC) (富山化学)  
 Potassium benzylpenicillin (PCG) (明治製薬)  
 Carbenicillin (CBPC) (藤沢薬品)  
 Sulbenicillin (SBPC) (武田薬品)  
 Cephalothin (CET) (塩野義製薬)

## 2) Carrier protein および adjuvant

Bovine  $\gamma$ -globulin (BGG) fraction II (Nutritional Biochemical)

Rabbit serum albumin (RSA) crystalline (Nutritional Biochemical)

Freund's complete adjuvant (FCA) (Iatron Co.)

## 3) クームス血清

クームス試薬、液状 (国際試薬)

## 4) 使用血液

輸血用ヒトO型血液

## 5) 使用動物

正常ウサギ (雄, 日本白色在来種 2~3 kg)

モルモット (雄, ハートレー系 250~300 g)

## 2. 各種 penicillin の蛋白結合物の調製

T-1220, ABPC および PCG 各 200mg と RSA または BGG 50mg とを 5ml の veronal buffer (pH 8.5) 中で 37°C 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蛋白結合物とした。

## 3. 免疫方法

## 1) 各種 penicillin 蛋白結合物でのウサギ免疫

各種 penicillin の RSA 結合物に同量の FCA を加え、emulsion にしたものを 1 群 3 羽のウサギ背部皮下約 10 カ所に 0.1~0.2ml ずつ週 1 回 8 週間感作した。最終免疫から 7 日後に採血し、抗血清を得た。

## 2) T-1220 投与による免疫

ビーグル犬に T-1220 を 500, 1000, 2000mg/kg の投与量で 6 カ月間連続静脈内投与およびウサギに 500mg/kg の投与量で 15 日間筋肉内投与を行ない、投与終了後の血清を使用し赤血球凝集反応により抗体価の測定を行った。

Table 1 Hemagglutination titers of rabbit antisera for penicillin-coated RBCs

Antigen	ABPC		T-1220		PCG		T-1220 C		Normal cells	
Anti-serum	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C	ABPC	T-1220
ABPC	32	2	2	0	0	0	0	0	0	0
T-1220	32	32	16	0	0	0	0	0	0	0
PCG	32	8	32	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Hapten concentrations required for 100% inhibition on passive hemagglutination reactions

Hapten	ABPC		T-1220		PCG		T-1220 C	
Ag-Ab system	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C
ABPC	1.56	200	100	—	—	—	—	—
T-1220	25	12.5	100	1.56	—	—	—	—
PCG	100	200	6.25	—	—	—	—	—

(mM)

Table 3 Hapten concentrations required for 50% inhibition on quantitative precipitin reactions

Hapten	ABPC		T-1220		PCG		T-1220 C	
Ag-Ab system	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C	ABPC	T-1220	PCG	T-1220 C
ABPC	7.4	84	29	—	—	—	—	—
T-1220	0.46	1.4	0.9	0.09	—	—	—	—
PCG	9.0	100	4.8	—	—	—	—	—

(mM)

4. 赤血球凝集反応

1/15M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) でウサギ赤血球をよく洗浄後、16%血球浮遊液とした。この浮遊液 2~3 容に抗生物質 (ハプテン) の 40mg/ml 液10 容を加え、37°Cで2時間反応後遠心分離した。沈渣の感作血球を PBS で3回洗浄し、PBS で2%血球浮遊液としたものを抗原とした。赤血球凝集反応はマイクロタイタープレートを用い行った。すなわち、マイクロタイタープレート上で各抗血清を PBS により 0.025ml の2倍希釈系列を作り、そのおのにおに感作血球をドロッパーで1滴加え、混和後37°Cで2時間、4°Cで一夜放置して管底像から凝集を観察した。凝集を示す抗血清の最大希釈倍数で抗体価を求めた。

5. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

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た。いっぽう、マイク

Fig. 1 Quantitative precipitation curves

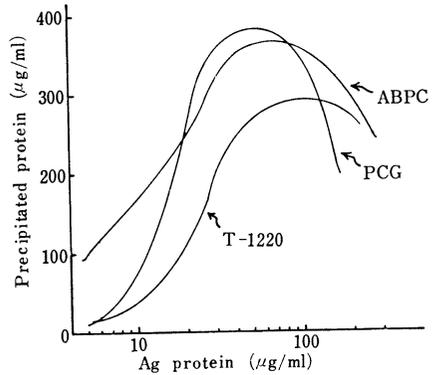
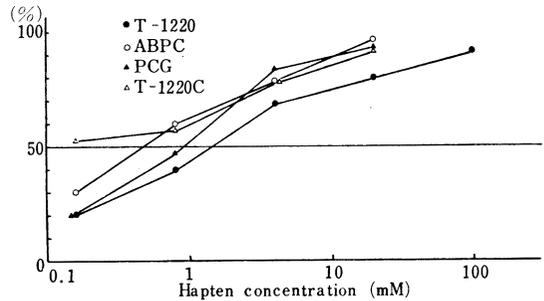


Fig. 2-a Hapten inhibition of precipitation T-1220 system



ロタイタープレート上でハプテンの2倍希釈系列を作製しておき、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、室温に1時間放置してから感作血球液を滴下し、再度混和し一夜放置して反応を判定した。

6. 定量沈降ハプテン阻止反応

通常の方法で抗血清とそれぞれ対応する完全抗原 (ハプテン-BGG 結合物) との当量域となる抗原量、抗体量を求めた。

ハプテンが200mMになるように1/15M-PBS (pH 7.4) に溶解し、0.4ml ずつの段階希釈系列を作った。そのおのにおに当量域を求めた抗血清 0.5ml を加え、37°Cで1時間反応させたのち、あらかじめ決定しておいた抗原量を加え、さらに、37°Cで1時間、4°Cで48時間静置した。これを3000rpm 20分4°Cで遠心し、沈降蛋白を冷PBSで3回洗浄後、沈降蛋白量をLowry法<sup>3)</sup>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%阻止するハプテン量 (mM 数) で表わした。

7. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応

OVARYの方法<sup>4)</sup>に従った。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 0.05ml を感作し、

Fig. 2-b Hapten inhibition of precipitation ABPC system

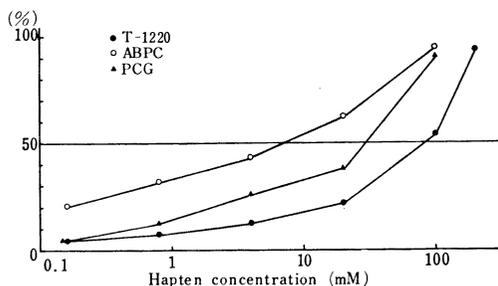


Fig. 2-c Hapten inhibition of precipitation PCG system

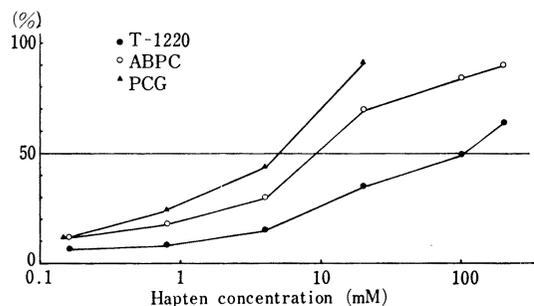


Table 4 Passive cutaneous anaphylaxis of hapten-BGG with anti-hapten serum.

Antibody \ Antigen	PCA titer (Anti-serum dilution)		
	ABPC	T-1220	PCG
ABPC	2048	256	512
T-1220	256	1024	256
PCG	128	64	1024

5時間後抗原（ハプテン-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をもってPCA 力価を表わした。

8. 直接クームス試験

1) GRALNICKの方法<sup>5)</sup>

ヒトO型血球をPBSで3回洗浄した後2%血球浮遊液とし、抗生物質の2倍連続希釈液1mlに2%血球浮遊液1mlを加える。37°Cで2時間反応後遠心PBS洗浄を繰り返し、2%血球浮遊液とする。小試験管にその2滴をとり、ヒト血清2滴を加え再度37°Cで2時間反応する。遠心洗浄を行ない沈渣にクームス試薬を2滴加え振り混ぜたのち、直ちに1000rpmで1分間遠心し、沈

Table 5 Direct Coombs test by using washed cells

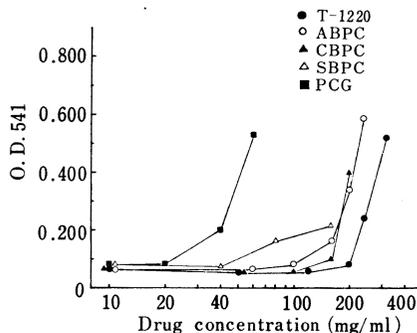
Antibiotics	Drug concentration (mg/ml)						
	40	20	10	5	2.5	1.25	0
T-1220	-	-	-	-	-	-	-
ABPC	-	-	-	-	-	-	-
SBPC	-	-	-	-	-	-	-
CBPC	-	-	-	-	-	-	-
PCG	HL	-	-	-	-	-	-
CET	+	+	+	-	-	-	-

HL: hemolysis

Direct Coombs test by using whole blood

Antibiotics	Drug concentration (mg/ml)						
	40	20	10	5	2.5	1.25	0
T-1220	-	-	-	-	-	-	-
ABPC	-	-	-	-	-	-	-
SBPC	-	-	-	-	-	-	-
CBPC	-	-	-	-	-	-	-
PCG	-	-	-	-	-	-	-
CET	+	+	+	±	-	-	-

Fig. 3 Hemolysis of various penicillins



渣を乱しながら凝集の有無を判定した。

2) MOLTHANの方法<sup>6)</sup>

ヒトO型血液1mlを抗生物質の2倍連続希釈液1mlに加える。37°Cで3時間反応させ遠心洗浄の後、2%血球浮遊液を調製した。小試験管にこの2滴をとり、クームス試薬2滴を加え、振り混ぜたのち直ちに1000rpmで1分間遠心し、沈渣を乱しながら凝集の有無を判定した。

9. 赤血球溶血作用

ヒトO型血液を大量の生理食塩水で3回洗浄し、生理食塩水で20%浮遊液とする。この浮遊液2mlに各抗生物質の2倍連続希釈液を等量加え37°Cで3時間反応させ

た。これを 1500rpm 10分間遠心し、その上清の O.D. 541 nm での吸収を測定し、その溶血度を求めた。

## II. 実験成績

### 1. 赤血球凝集反応

各抗血清のハプテン感作赤血球に対する凝集力価を Table 1 に示した。いずれの抗血清も同等の凝集力価を示した。いっぽう、ビーグル犬に T-1220 を 6 カ月間連続静脈内投与した実験およびウサギに T-1220 を 15 日間筋肉内投与した実験において、投与終了後の血清を使用して赤血球凝集力価の測定を行なった結果、いずれも赤血球凝集抗体の産生は認められなかった。

### 2. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

赤血球凝集抗体に対する交叉性の程度を homologeous な抗原抗体系の赤血球凝集反応を 100% 阻止するのに必要なハプテン量 (mM 数) で表わした。

Table 2 に示すように ABPC 抗原抗体系では ABPC が 1.56mM, T-1220 が 200mM であり、T-1220 の ABPC に対する交叉性は弱かった。

PCG 抗原抗体系では PCG が 6.25mM, T-1220 が 200mM であり、T-1220 の PCG に対する交叉性は弱かった。T-1220 抗原抗体系では T-1220 が 12.5mM, ABPC が 25mM, PCG が 100mM, T-1220 C が 1.56mM であった。T-1220 分解産物の T-1220 C が T-1220 より 8 倍も強い阻止能を示した。

### 3. 定量沈降ハプテン阻止反応

抗ハプテン RSA 血清における各ハプテン BGG 結合物による定量沈降パターンを Fig. 1 に示した。沈降抗体に対する交叉性の程度を homologeous な抗原抗体系の沈降反応を 50% 阻止するのに必要なハプテン量 (mM 数) で表わした。

Table 3 および Fig. 2 に示すように ABPC 抗原抗体系では ABPC が 7.4mM, T-1220 が 84mM であり、T-1220 は ABPC に対して約 1/12 の交叉性を示した。PCG 抗原抗体系では PCG が 4.8mM, T-1220 が 100mM であり、T-1220 は PCG に対して約 1/20 の交叉性を示した。T-1220 抗原抗体系では T-1220 が 1.4mM, ABPC が 0.46mM, PCG が 0.9mM, T-1220 C が 0.09mM と赤血球凝集ハプテン阻止反応と同様に T-1220 C が最も強い阻止能を示した。

### 4. PCA 反応

T-1220, ABPC および PCG の PCA 抗体に対する交叉性の程度をモルモットを用いる PCA 反応力価と比較し、その結果を Table 4 に示した。ABPC 抗体に対して ABPC 抗原は 2048 倍の力価を示すのに対して、T-1220 は 256 倍であり約 1/8 の交叉性を示した。PCG 抗体に対

して PCG 抗原は 1024 倍の力価を示すのに対して T-1220 抗原は 64 倍であり約 1/16 の交叉性を示した。

### 5. 直接クームス試験

GRALNICK の方法と MOLTHAN の方法で各抗生物質の試験管内直接クームス試験を行ない、その結果を Table 5 に示した。T-1220, ABPC, SBPC, CBPC および PCG では両方法とも薬物濃度 40mg/ml までクームス反応陽性化は認められなかった。CET は両方法とも 10mg/ml 以上の濃度でクームス反応陽性を示した。

### 6. 赤血球溶血作用

クームス陽性反応と関連して各抗生物質の赤血球に対する直接的な傷害として溶血作用を調べた結果、Fig. 3 に示すように T-1220 の溶血作用は非常に弱いものであった。

## III. 考 察

Penicillin 誘導体はいずれも  $\beta$ -lactam 環を有し、penicilloyl-protein-conjugate が penicillin アレルギー反応の主な抗原決定基であることが知られている。交叉性に関しては penicillin 抗体は母核に対する抗体、acyl 側鎖に対する抗体および carrier protein を含めた penicillin 全分子に対する抗体に分類される。とくに acyl 側鎖がその特異性決定に重要であることが知られている<sup>7)8)</sup>。T-1220 は ABPC の誘導体であり、化学構造的には acyl 側鎖の amino 基と dioxopiperazine 環を ureido 結合させた化合物であり、その免疫学的挙動に与える影響について調べた。

今回の赤血球凝集ハプテン阻止反応、定量沈降ハプテン阻止反応、PCA 反応の結果より T-1220 の ABPC および PCG との交叉性を比較すると 1/8~1/20 以下と弱いことが認められ、これは acyl 側鎖の dioxopiperazine 環の立体障害による影響とも考えられる。また、その交叉性は PCG より ABPC にやや近いことが示され、これは T-1220 が ABPC の誘導体であることによるものと考えられる。いっぽう、赤血球凝集ハプテン阻止反応および定量沈降ハプテン阻止反応において T-1220 C が T-1220 より 8~15 倍も強い阻止能を示したことは、T-1220 の蛋白結合物調製時の条件を考慮すると T-1220 の安定性よりみて、T-1220 C により近い抗 T-1220-RSA 血清が一部得られたことを示すものと思われる。

Penicillin による免疫学的副作用としてクームス陽性化を伴う溶血性貧血が報告されている<sup>9)10)</sup>。従って、試験管内直接クームス試験は溶血性貧血との関連において意味あるものと考えられ調べた結果、T-1220 は 40mg/ml まで陽性化は認められず弱いものであり、また、赤血球に対する直接溶血作用も弱かった。

## 結 論

1) T-1220 はビーグル犬に6カ月間連続静脈内投与およびウサギに15日間筋肉内投与した血清には抗体の産生が認められなかった。

2) T-1220 の ABPC および PCG との交叉性は赤血球凝集ハプテン阻止反応, 定量沈降ハプテン阻止反応および PCA 反応により作用は認められたが, その程度は弱いものであった。

3) T-1220 の試験管内クームス反応陽性化作用および赤血球溶血作用はともに弱いものであった。

## 文 献

- 1) 才川 勇, 保田 隆, 滝 秀雄, 渡辺泰雄, 加須屋興子, 安川久美子, 金川心子: T-1220 の細菌学的評価。Chemotherapy 25(5): 789~796, 1977
- 2) 才川 勇, 高野俊太郎, 吉田長作, 斉藤英二, 保田隆, 酒井広志, 高下 寛, 山本芳子, 杉本由美子:  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の薬学的研究 (第4報) T-1220 の水溶液中および体液中の安定性。薬学雑誌 投稿中
- 3) LOWRY, O. H.; H. J. ROSEROUGH, A. L. FARR & R. T. RANOALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
- 4) OVARY, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Progr. Allergy 5: 459~508, 1958
- 5) GRALNICK, H. R.; L. D. Gr. WRIGHT & M. H. Me. GINNISS: Coombs positive reactions associated with sodium cephalothin therapy. J. Amer. Med. Assoc. 199: 725~726, 1967
- 6) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct coombs test due to cephalothin. New Engl. J. Med. 277: 123~125, 1967
- 7) 真下啓明, 堀内淑彦, 柴田皓示: 薬物免疫 (ペニシリンをモデルとして)。日本臨床 23: 1578~1587, 1965
- 8) 渥美 剛: ウサギ抗 Benzyl penicilloyl 抗体の結合型の Heterogeneity に関する研究。アレルギー 18: 606~614, 1969
- 9) PETZ, L.D.; H. H. FUDENBERG: Coombs positive hemolytic anemia caused by penicillin administration. New Engl. J. Med. 274: 171~178, 1966
- 10) SWANSON, M. A.; D. CHANMOUGAN & R. S. SCHWARTZ: Immuno-hemolytic anemia due to antipenicillin antibodies. New Engl. J. Med. 274: 178~181, 1966

## IMMUNOLOGICAL STUDIES ON T-1220

AKIRA TAKAI, TOYOAKI YONEDA and TETSUO SHIBATA  
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

KEIMEI MASHIMO

Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, Tokyo University

The antigenicity of T-1220, its cross reactivity with Penicillin G (PCG) and Aminobenzylpenicillin (ABPC) and Coombs test were studied in order to know the immunological characteristics of T-1220.

The results were as follows.

- 1) Antibody production against T-1220 was not shown in beagle dogs injected intravenously for 6 months and in rabbits injected intramuscularly for 15 days.
- 2) Cross reactivity of T-1220 with ABPC and PCG was observed in hapten inhibition of hemagglutination, hapten inhibition of quantitative precipitation and PCA reaction, but the reactivity was slight.
- 3) Ability of T-1220 to give a positive reaction in Coombs test and its direct hemolytic activity were both weak.