

新合成ペニシリンT-1220に関する免疫学的研究

竹内良夫・西村葉子・木村義民

日本医科大学微生物学免疫学教室

(昭和53年1月21日受付)

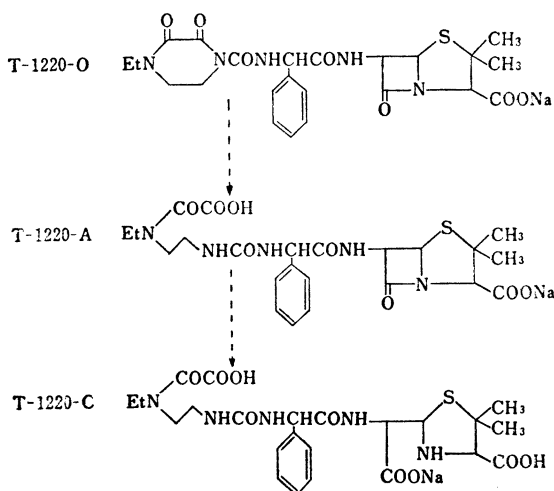
緒 論

Sodium 6[D(-)- α (4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazine carboxamido)- α -phenylacetamido] penicillanate (T-1220) は新しく開発された半合成 penicillin 系抗生物質で、aminobenzylpenicillin (ABPC) の誘導体である¹⁾。

本剤は *in vitro* で蛋白と結合させる際に、下記の化学構造式に示されるように dioxopiperazine 環が開裂した α -{3-[β -(N-ethyl-N-oxaloamino)ethyl ureido] benzylpenicillin (T-1220-A) を経て α -{3-[β -(N-ethyl-N-oxaloamino)ethyl] ureido] benzylpenicilloic acid (T-1220-C) を形成し、蛋白と結合する²⁾と考えられる。

従来、penicillin 系薬物によって惹起されるアレルギーの major antigenic determinant は、benzylpenicilloyl-protein conjugates であるとされている^{3,4)}。これは penicillin の β -Lactam 環が開裂し、蛋白と結合した構造である。しかしながら T-1220 はその分解過程で 4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazine (以後、dioxopiperazine 環と略) と β -Lactam 環の両者が開裂するものと考えら

Degradation products of T-1220 in neutralized aqueous solution (pH 7.2)



Sodium 6-[D(-)- α -(4-ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido)- α -phenylacetamido] penicillanate (T-1220)

れるから、上記製剤の免疫により penicillin G とは様相の異なった抗体が産生される可能性が想定される。

本論文は、実験的に作製したウサギ抗 T-1220-BSA 血清を使用して benzylpenicillin (PCG), および ampicillin (ABPC) との交叉反応性を検討するとともに、その抗原特異性について考察を加えることを目的とした。

材料および方法

I. 材料

1) 動物：免疫には体重 2.5 kg の日本在来白色ウサギを、PCA には体重 250g 前後の Hartley 系雄性モルドットを使用した。

2) 薬品：供試抗生物質としての T-1220-O, T-1220-A, T-1220-C, ABPC は富山化学研究所で合成されたものを、また PCG は明治製菓社製のものを使用した。

II. 方法

1) 赤外線分析：回析格子赤外分光々度計, IPA 2 型, KBr 錠剤作製用器具 (以上, 日本分光工業社製), プレッシャー, 真空ポンプ (以上, Millipore 社 U.S.A.) を使用した。薬剤 1mg と KBr 粉末 100 mg をメノウ製乳鉢でよく磨碎混合した後に 100 kg/cm² の圧力を加えて吸収用錠剤とした。400~4000cm⁻¹ の赤外領域における特性吸収を測定した。

2) 免疫抗原の作製：bovine serum albumin (BSA, 生化学工業社製) 100 mg と薬剤 400 mg を pH7.2 の phosphate buffer (PB) 20 ml に溶解し、37°C, 24 時間 pH を 7.2 に維持し incubate した。遊離の薬剤を透析により除去した後の凍結乾燥物を BSA coupling 抗原とした。反応用抗原には rabbit serum albumin (RSA, Miles, Lab. Inc. 社製) を同様の方法で incubate し、RSA coupling 抗原を作製した。

3) 免疫方法：BSA coupling 抗原 (T-1220-BSA, ABPC-BSA, PCG-BSA) 各 20 mg/0.5 ml と Freund's complete adjuvant (FCA) 0.5 ml を混合して emulsion とし、1 ml をウサギの foot pad に注射した。週 1 回の割で計 4 回感作し、免疫開始後 40~43 日目に全採血し抗血清をえた。

4) タンニン酸処理感作血球凝集反応：高橋の方法⁵⁾

に準じて行なった。T-1220-O, T-1220-A, ABPC, PCGの各 RSA coupling 抗原 2 mg/ml で常法どおり感作血球を作製し、マイクロタイター法により抗体価を測定した。

5) モルモットにおける 3 hr passive cutaneous anaphylaxis (PCA) : OVARY の方法⁶⁾に準じて行なった。モルモット背部皮内に抗血清稀釈液 0.1 ml を皮内注射し、PCA sites を作製した。3 時間後に反作用抗原 1 mg/ml を evans blue (EB, 和光純薬社製) と共に静注し、PCA を惹起させた。PCA inhibition test は抗原 challenge 20 分前に inhibitor を静注し、PCA を行ない、青色斑 6 mm 以上を陽性とした。実験は 3 回行ない、その平均を抗体価として示した。

6) 蛋白結合率の測定 : BSA 2 mg/PB (pH 7.2) と薬剤 4 mg/PB (pH 7.2) を等量混合し、37°C, 1 時間 incubate した後に、透析器 (Biamed Instrument Inc. USA) を使用して遊離の薬剤を除去した⁷⁾。透析外液の試料濃度を Hitachi Electrophotometer 101 型 (日立製作所製) で比吸光度⁸⁾ を測定し、結合率を換算した。結合値は、3 回の実験の平均値を示した。測定誤差は ± 2.3% であった。

結果

1. T-1220 誘導体の赤外線分析による解析

T-1220-O および T-1220-C の分解過程を赤外線分析により確認した。薬剤 1 mg の赤外線吸収チャートは Fig.1 に示すようにペニシリンに特有な吸収帯が 3 μ , 6 μ , および 6.6 μ に認められた。T-1220-C は、Fig.2 に示すように β -Lactam 環の吸収 (5.6 μ), および dioxipiperazine 環の吸収 (7.6 μ) が消失しており、構造変化が確認された。

2. ウサギ抗 T-1220-O 血清の感作血球凝集価

T-1220-O を BSA と coupling させたものを免疫抗原とし、ウサギを感作した。対照として PCG-BSA, ABPC-BSA を同様にウサギを感作した。その結果 (Table 1), 反作用抗原として RSA coupling 抗原を使用したタンニン酸処理感作血球凝集価は homologous な抗原では、4 倍, 64 倍, 32 倍であった。また、各抗原

Table 1 Antigenic cross reactivity among T-1220-O, ABPC and PCG (Passive hemagglutination test)

Antibody	Antibody titer		
	1220-O-RSA	Antigen ABPC-RSA	PCG-RSA
anti-1220-O-BSA	4	1	1
anti-ABPC-BSA	8	64	16
anti-PCG-BSA	4	16	32

Fig.1 Infrared absorption spectra (T-1220-O)

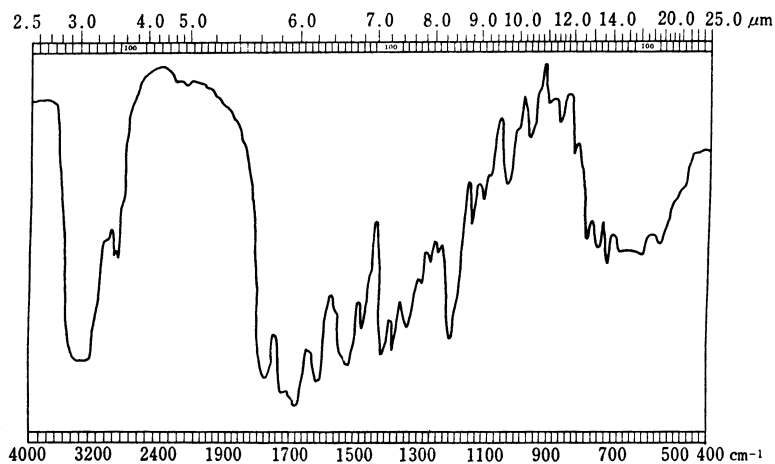


Fig.2 Infrared absorption spectra(T-1220-C)

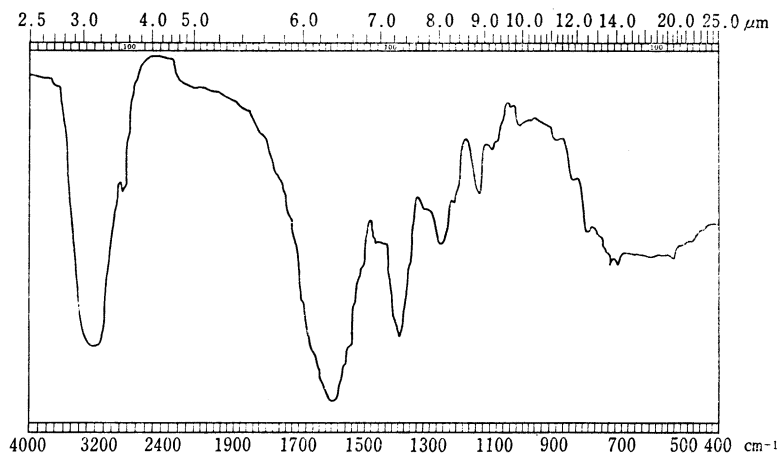


Table 2 Antigenic cross reactivity among T-1220, ABPC and PCG (3 hr. Passive cutaneous anaphylaxis)

Antibody	Antibody titer		
	1220-O-RSA	Antigen ARPC-RSA	PCG-RSA
anti-1220-O-BSA	4000	500	250
anti-ABPC-BSA	500	1000	500
anti-PCG-BSA	250	500	1000

間の交叉反応性も認められるが抗体価としては低値を示した。

3. ウサギ抗 T-1220-O 血清の PCA titer と PCA inhibition test

さらにモルモットの 3 hr PCA で抗体の交叉反応性をみると (Table 2), homologous な抗原抗体系では 4,000 倍, 1,000 倍, 1,000 倍で血球凝集価に比べ著しく高力価であった。この抗体は 56°C, 1 時間の incubate で失活しない IgG type の抗体であった。次いで交叉反応性を PCA inhibition test (Table 3) で再検討した。抗原 challenge 20 分前に inhibitor として T-1220-O, T-1220-A, T-1220-C, ABPC, PCG の各々 8 mM を静注後, T-1220-O-RSA 1 mg を E. B. と共に静注した。

Table 3 Antigenic cross reactivity among T-1220, ABPC and PCG (3 hr, Passive cutaneous anaphylaxis inhibition test)

challenging ag	antiserum	inhibitor (8 mM/kg)	antibody titer
1220-O-RSA	anti-1220-O-BSA	1220-O	1000
		1220-A	100
		1220-C	100
		ABPC	1000
		PCG	2000
		0	4000

4,000 倍抗体価を示した PCA titer は, T-1220-O の前処理で 1,000 倍に低下したが, これは ABPC, PCG の前処置の場合と同程度の抑制度であった。しかしながら T-1220-A, および T-1220-C の前処置では 100 倍に低下した。このことから, 抗 T-1220-O 血清には, A および C の構造に由来する特異抗体が強く産生されていることが推測された。この構造特異性を以下の実験により検討した。

4. T-1220-O および dioxopiperazine 環の蛋白結合率の検討

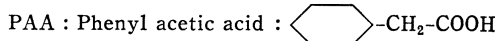
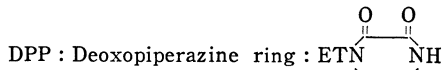
T-1220-O およびその側鎖部分である 4-ethyl-2, 3-

Table 4 Protein binding of antibiotics

antibiotics	BSA	E 1% values		binding %
		starting drug	dialyzed drug	
Dioxopiperazine ring 4 mg/ml	2 mg	205	148	26
T-1220-O 4 mg/ml	2 mg	225	146	30

Table 5 Antigenic cross reactivity between T-1220 and PCG (3hr. PCA inhibition test)

challenging ag	antiserum	inhibitor	antibody
1220-O-RSA	1220-O-RSA	DPP 50 mM	0
		25	0
		10	20
		5	100
		0	1000
PCG-RSA	PCG-RSA	PAA 50 mM	100
		25	100
		10	100
		5	500
		0	1000



dioxo-1-piperazine 環の蛋白結合を連続向流透析法で測定した。すなわち薬剤 4 mg と BSA 2 mg を 37°C, 1 時間 incubate した後に pH 7.2 の phosphate buffer で透析した。透析外液中の遊離の薬剤量から換算した結合率 (Table 4) は, T-1220-O では 30%, dioxopiperazine 環では 26% であった。

5. dioxopiperazine 環の抗原特異性に関する検討

さらにモルモット 3 hr PCA inhibition test により dioxopiperazine 環の抗原特異性を検討した (Table 5)。PCG (側鎖, phenyl acetic acid) を対照とした結果は, PCA 価 1,000 倍を示す抗体に対して, 各側鎖 0 mM ~ 50 mM を inhibitor とすると dioxopiperazine 環は T-1220-O に対して 25 mM 以上の前処置で完全に阻止したが, phenyl acetic acid は 10 mM 以上でも完全に阻止されなかった。

考 察

Penicillin 系薬物と蛋白の結合は, その acyl 側鎖が重要な役割をなしていることはよく知られた事実である^{9,10}。T-1220 は他の penicillin に比較すると蛋白との結合率が低い¹¹。

このことは, penicilloyl-protein conjugates が形成

されにくいことに一致する。ペニシリン治療の副作用として生じるペニシリン・アレルギーの major antigenic determinant は, benzylpenicilloyl-protein conjugates^{3,4} であり, T-1220 が実験動物において免疫原性がない¹²) という報告も結合能の低下によるのかも知れない。

しかしながら EISEN¹³) は, dinitrophenyl 系化合物についてアルブミンとの結合性と hapten としての免疫原性の強さを比較し, 両者に相関がないと報告した。事実, 今回の実験でえた抗 T-1220-O 血清は同様の感作方法でえた抗 PCG, 抗 ABPC 血清に比較して高力価であった。

T-1220 で免疫された血清抗体は dioxopiperazine 環に特異的であった。一方, T-1220-O と側鎖の蛋白結合率の比較は, 30% と 26% で T-1220 の結合能の大部分を側鎖部分が包括していた。この結果から, T-1220 の側鎖と蛋白が結合し, 側鎖に対する特異的抗体が産生されたものと考えた。この推論を基にして T-1220-BSA で感作された抗体の抗原特異性をモルモットの 3hr PCA で検討した。Inhibitor として original の T-1220-O は完全には阻止されないにもかかわらず, T-1220-A および T-1220-C によって PCA が特異的に阻止された。この結果, T-1220-O の構造変化部位である dioxopiperazine 環の開裂部位に主な抗原決定基があることが証明された。さらに側鎖を inhibitor とした PCA は完全に阻止された。以上のことから T-1220 によって産生される抗体の主な抗原決定基 dioxopiperazine-protein 結合物であることが推測された。しかしながらこの結合物の形成が T-1220-A 構造によるものか, または T-1220-C 構造に由来したものであるかは不明である。

抗 T-1220 血清は, 他の薬剤に弱い交叉反応性を示した。penicillin 抗体は, 母核部分, 側鎖部分, および蛋白結合基を含めた全分子に対する抗体に分類される¹⁴) が, 共通構造に由来する抗体の存在も証明された。しかしながら抗 T-1220 血清の交叉反応性は, 抗 PCG および抗 ABPC 血清に比較して弱い。

薬剤アレルギーの抗体産生に関する抗原決定基についての報告は, benzylpenicilloyl-protein conjugates を中心に種々の抗原型が推測されている^{3,4,15,16})。側鎖特異抗体は, minor antigenic determinant として薬剤の特異性決定に重要であるが¹⁷)、major antigenic determinant として作用するという報告はない。T-1220 のもつ特異性が事実であるとするならば, ペニシリン・アレルギー患者の 50% 以上¹⁸) が benzylpenicilloyl-protein conjugates に対するものと考えられている現在, 抗原特異性の異なった本薬剤の免疫学的意義は興味あるものと考えられる。

結 論

T-1220-BSA を FCA と共にウサギに感作し、えられた抗血清の免疫反応を検討し、以下の結論をえた。

1. 1,000 倍 PCA titer の抗血清の抗原特異性は、T-1220-A および T-1220-C の構造に由来した反応を示した。

2. 抗 T-1220 血清は PCA inhibition test において側鎖で完全に阻止される性状を示した。

3. T-1220 の蛋白結合率は 30% であり、そのうち 26% は側鎖である dioxopiperazine 環によるものであった。

4. 上記の実験の対照として PCG, ABPC を使用した結果は β -Lactam 環構造に由来する免疫応答を示し、T-1220 血清が dioxopiperazine 環に由来する反応とは異なっていた。

本論文の要旨は第 38 回日本細菌学会関東支部総会において発表した。

文 献

- 1) 上田 泰：広域ペニシリン剤 T-1220 の基礎的、臨床的研究のまとめ。Chemotherapy 25(5) : 683~699, 1977
- 2) 清水喜八郎：T-1220 の吸収、排泄、分布、代謝。第 23 回日本化学療法学会東日本支部総会，新薬シンポジウム(I) p. 75, 1977
- 3) LEVINE, B. B. : Studies on the mechanism of formation of the penicillin antigen. The N (D- α -benzylpenicilloyl) group as antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114 : 875~903, 1961
- 4) BATCHELOR, F. R. & J. M. DEWDNEY : Some aspects of penicillin allergy. Proc. R. Soc. Med. 61 : 897~899, 1968
- 5) 高橋昌巳：感作血球凝集反応の簡易化とその応用に関する基礎的研究。アレルギー 13 (7) : 516~523, 1964
- 6) OVARY, Z. : Cutaneous anaphylaxis in the albino rat. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 3 : 293~294, 1952
- 7) ZEINH, R. A. ; V. K. G. PILLAY, E. C. SMITH., E. MBAWA & B. I. FLORELLA : Thin-layer microtubar continuous flow countercurrent dialysis. J. Lab. Clin. Med. 76 : 648~655, 1972
- 8) 坂口武一：薬品分析化学。(南山堂，東京) p. 311~312, 1976
- 9) ULLMAN, U. : The protein binding of ticarcillin and tobramycin. J. Antimicrob. Chem. 2 : 213~221, 1976
- 10) 檜井透夫：抗生物質と血清蛋白に関する基礎的研究。広島大学医学雑誌 13 (11, 12) : 601~636, 1965
- 11) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 山本恵美子：T-1220 の血清蛋白結合性に関する研究。Chemotherapy 25 (5) : 810~814, 1977
- 12) 高井 明, 米田豊昭, 柴田哲夫, 真下啓明：T-1220 に関する免疫学的研究。Chemotherapy 25 (5) : 941~946, 1977
- 13) EISEN, H. N. ; M. E. CARSTEN & S. BELMAN : Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. J. Immunol. 73 : 296~302, 1954
- 14) ATSUMI, T. ; K. NISHIDA, Y. KINOSHITA, K. SHIBATA & Y. HORIUCHI : The heterogeneity of combining sites of anti-benzylpenicilloyl antibodies obtained from individual rabbit. J. Immunol. 99 : 1286~1293, 1967
- 15) STEWART, G. T. : Allergenic residues in penicillin. Lancet 1 : 1177~1183, 1967
- 16) 竹内良夫, 西村葉子, 山地幸雄, 木村義民：Penicillin アレルギーに関する基礎的研究。アレルギー 26 : 10~16, 1977
- 17) DASH, C. H. : Penicillin allergy and the cephalosporins. J. Antimicrob. Chem. 1 : 107~118, 1975
- 18) JUHLIN, L. ; S. AHLSTEDT, L. ANDAL, P. EKSIRON, P. O. SVÄRD & L. WIDE : Antibody reactivity in penicillin-sensitive patients determinants with different penicillin derivatives. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 54 : 19~28, 1977

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON A NEW SEMISYNTHETIC PENICILLIN T-1220

YOSHIO TAKEUCHI, YOKO NISHIMURA and YOSHITAMI KIMURA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

The immunological studies on the rabbits immunized with emulsion of T-1220-BSA and FCA were carried out and following results were obtained.

- 1) The antigenic specificity against rabbit anti T-1220-BSA serum seemed to depend on the acyl side chain or beta-lactam ring of T-1220-A and T-1220-C.
- 2) The protein-binding ratio of T-1220 was 30% and that of dioxopiperazine ring was 26%.
- 3) PCA using rabbit-T-1220 serum was inhibited completely by the pretreatment of the dioxopiperazine ring.
- 4) Rabbit anti-PCG or anti-ABPC serum reacted only to beta-lactam ring.