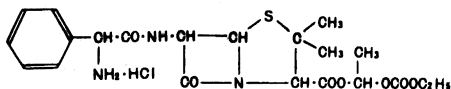


Bacampicillin hydrochloride の免疫原性 および交叉性試験

寺澤道夫・今村 博

吉富製薬株式会社生物研究所

スウェーデンのアストラ社で開発された Bacampicillin hydrochloride (BAPC) はつぎの化学構造をもつ新しい Ampicillin (ABPC) 誘導体である。BAPCはABPCと比較して、経口投与によって速やかに吸収され¹⁾、吸収される間に加水分解されてABPCとして薬効を示す²⁾。薬物により臨床的にアレルギーが誘発されることがあるが、penicillin類ではその頻度は比較的高いといわれているので、BAPCの免疫原性ならびに他のpenicillin系抗生物質との免疫学的交叉性について検討した。



実験材料および実験方法

1. 材料

1) 抗生物質

BAPC(吉富製薬), ABPC(明治製薬), potassium benzyl penicillin (PCG, 明治製薬)。

2) その他の材料

Bovine gamma globulin (BGG, Frac. II, NBC), rabbit serum albumin (RSA, ICN Pharmaceuticals inc.), keyhole limpet hemocyanin (KLH, Calbiochem), bovine serum albumin (BSA, Frac. V, Sigma), Freund's complete adjuvant (FCA, Difco), rabbit red blood cell (RRBC)。

3) 使用動物

雄性ウサギ(体重 2.5~3kg, 九州実験動物センター供給), 雌性 ICR マウス(体重 25~30g, 日本クレア供給), 雄性 Wistar ラット(体重 180~200g, 静岡県実験動物農業協同組合供給)。

4) 抗生物質—蛋白結合物の調製

BGG, RSA または KLH 500mg を 50ml の 0.07 M Veronal buffer (pH 8.6) に溶解し、被検抗生物質 2g を加えた。この溶液を 1N NaOH で pH 11 前後に保ちながら 37°C で 24 時間保持した。この液を 4°C, 3 日間 pH 8 に調整した 0.15 M NaCl 液に対して透析した。外液は 10ℓ とし、1 日 2~3 回交換した。透析終了後、内液を凍結乾燥して実験に使用するまでデシケータ中で保存した。

2. 感作方法

1) BAPC, ABPC によるウサギ免疫

ABPC 100mg/ml および BAPC 135mg/ml (ABPC と等モル) の水溶液を調製し、各液 1 容と FCA 1.5 容を混じ、W/O のエマルジョンを調製した。初回感作はウサギの四肢足蹠に各 0.5ml 宛、計 2ml を皮内に注射し、さらに 1 週間後から週 1 回背部皮内に 2ml を分割注射し、3 回追加感作を行った。最終感作から 1 週間後に血清を分離して、実験に使用するまで -20°C に保存した。

2) 抗生物質—BGG 結合物によるウサギ免疫

抗生物質—BGG 結合物(蛋白量 10mg/ml)と等容の FCA を混じ、W/O のエマルジョンを調製した。初回感作はウサギの四肢足蹠に各 0.5ml 宛、計 2ml を皮内に注射した。1 週間後、2ml を胃部筋肉内に注射し、以後 1 週間 1 回の割合で 2~4 回 2ml を背部皮内に分割注射した。さらに 1 週間後、被検抗生物質、120mg の水溶液を筋肉内に注射し、最終感作から 1 週間後に血清を分離した。抗体価は定量沈降反応を用いて測定した。血清を 0.25ml を用いた時、沈降蛋白量が 100μg 前後得られる抗血清をブールして実験に使用するまで -20°C に保存した。

3) Reagin 様マウス血清の作製

LEVINE ら³⁾の方法に従って調製した。1mg の Al(OH)₃ゲルを含む 0.01 M tris buffer saline 0.5ml へ、1μg の PCG-KLH または ABPC-KLH を溶解して抗原液と

し、マウス腹腔内へ投与した。30日後に初回と等容の抗原液を腹腔内に投与し、追加感作を行った。最終感作から10日後に採血し、その血清を分離して実験に使用するまで -20°C に凍結保存した。

3. 赤血球凝集反応

LEYら⁴⁾の方法の変法⁵⁾に従った。被検抗生物質120mgを含む Alserver 溶液 4ml に等容のウサギ血液を加え、 37°C で1時間保持した後、その液を1,000rpmで10分間遠心した。沈渣の赤血球を0.15 M NaCl液で3回洗滌し、この感作血球(0.15 M NaCl, 2%浮遊液)を抗原とした。

前項1), 2)で作成した各抗血清を、0.15 M NaCl液で2倍系列希釈し、その0.5mlに感作血球を1滴加え、 37°C 2時間保持した後、 4°C で20時間静置した。これを鏡検して凝集の有無を観察し、凝集を示す抗血清の最大稀釈倍数で血球凝集抗体価を求めた。

4. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

被検抗生物質(ハプテン)を100mMになるように0.15 M NaCl液に溶解し、0.25ml宛の2倍系列希釈液を作った。そのおのおのに4単位の抗血清0.25mlを加え、 37°C で2時間保持後、その反応液に感作血球液を1滴宛加えた。以後の操作は赤血球凝集反応と同様に行ない、血球凝集反応を100%阻止するのに必要な最小ハプテン量(mM)で交叉性を示した。

5. 定量沈降ハプテン阻止反応

本反応に用いる当量域の抗原量を定量沈降反応によって求めた。抗血清0.25mlと0.05 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.8)に溶解した抗原の稀釈系列液の各0.25mlとを混和し、 37°C で1時間保持し、さらに 4°C で24時間静置した。これを3,000rpmで20分間遠心した。さらに沈降物を氷冷したPBSで2回遠心して洗滌し、沈降蛋白量をFolin-Ciocalteu法⁶⁾で測定し、抗原量を求めた。

定量沈降ハプテン阻止反応では被検抗生物質を100mMになるようにPBSに溶解し、0.25mlずつの3倍稀釈系列をつくり等容の抗血清を加え、 37°C で1時間保持した。先に求めた抗原量を加えて 37°C で1時間保持し、さらに 4°C で24時間静置した後、上述した操作で沈降蛋白量を測定した。各抗体に対するハプテン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)を求めた。

6. 72時間ラット reagin passive cutaneous anaphylaxis (PCA) および PCA ハプテン阻止反応

MOTA⁷⁾の方法に従い、72時間ラット reagin PCAを行った。ラットを1群5匹とし、2倍系列希釈したマウスの抗ABPC-KLH reagin血清または抗PCG-KLH reagin血清を、剪毛したラットの背部に0.1ml宛皮内注射して感作した。72時間後、PCG-BGGあるいはABPC-BGGの2mg/mlとEvans blue 2mg/mlの混合液を0.5ml/100g静脈内へ投与し、PCAを惹起させた。PCA力価は反応直径10mmを示す抗血清稀釈倍数で示した。

PCAハプテン阻止反応は誘発抗原液注射直前に、0.15 M NaCl液に溶解した被検抗生物質(ハプテン)の各用量(10, 30および100mg/kg, BAPCはABPCと等モル)を静脈内に投与し、30分後に反応青染円の直径を皮膚を剥離してその裏側から観察し、測定した。平均直径10mmを示す抗血清稀釈倍数をグラフ上から求め抗体力価とし、力価を1/2に減弱させるに要するハプテン投与量(mg/kg i.v.)をID 1/2とした。

7. BAPC, ABPCと蛋白の結合力

BAPC, ABPC (13.5mM)とBSA (0.01mM)をcitrate buffer (pH 5.0)およびVeronal buffer (pH 8.5)に溶解し、それぞれpH 5.0および8.5に調整下に 37°C 72時間保持した。その後 4°C の精製水に対して

Table 1 Cross reaction between BAPC and related penicillin derivatives measured by passive hemagglutination

Antibody	Antigen reaction system	Hapten(mM) required for inhibition ^{a)}		
Antiserum	Penicillin-coated RRBC	BAPC	ABPC	PCG
Anti-BAPC	ABPC-RRBC	0.20	0.20	1.25
Anti-BAPC	PCG-RRBC	0.02	0.04	0.08
Anti-ABPC	ABPC-RRBC	0.39	0.1	1.56
Anti-ABPC	PCG-RRBC	0.39	0.20	0.10
Anti-PCG	ABPC-RRBC	0.01	0.01	0.02
Anti-PCG	PCG-RRBC	6.25	12.5	0.20

a) 100% inhibition of passive hemagglutination

1週間透析し、内液を凍結乾燥して LEVINE⁸⁾ による、penamaldate 法により測定し、結合モル数を算出した。

実験結果

1. 赤血球凝集反応

BAPC は血液との混合で、凝血および溶血が起こり、BAPC 感作血球の調製が不能であった。そこで後述のように、赤血球凝集ハプテン阻止反応で強い交叉性を示す

ABPC 感作血球を用いて BAPC の血球凝集抗体価を間接的に測定した。BAPC および ABPC の血球凝集抗体価はそれぞれ 6.3 ± 1.7 , $N=8$ および 108.0 ± 34.9 , $N=6$ を示し、BAPC 自体のウサギに対する免疫原性は ABPC と比べて約 1/20 であった。

2. 赤血球凝集ハプテン阻止反応

抗 BAPC 血清に対する ABPC または PCG 感作血球との反応系で、BAPC および ABPC が低濃度で阻止反

Fig. 1 Hapten inhibition on precipitation with penicillin derivatives
× BAPC, ○ ABPC, ● PCG

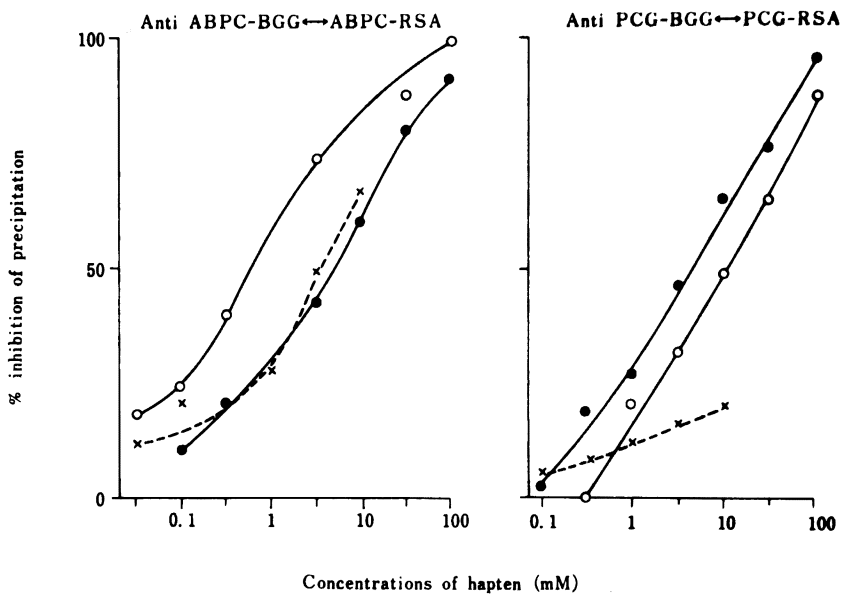


Table 2 Hapten concentration required for 50% inhibition on quantitative precipitin reactions

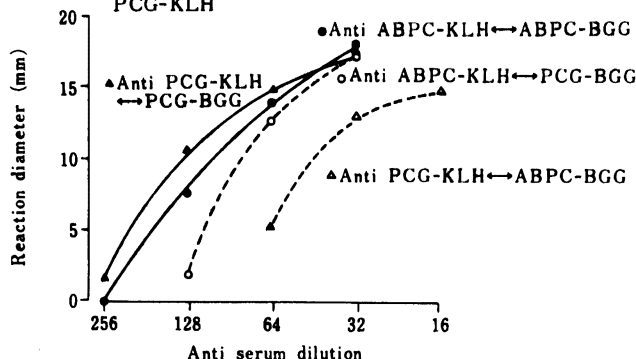
Ag-Ab system	Hapten (mM)		
	BAPC	ABPC	PCG
Anti ABPC-BGG ABPC-RSA	3.6	0.5	3.5
Anti PCG-BGG PCG-RSA	>10	10	3.4

応を示し、両者の阻止活性はほぼ同等であった (Table 1)。抗 ABPC 血清と ABPC または PCG 感作血球との反応系では、BAPC は ABPC のそれぞれ 1/4, 1/2 で、ABPC と類似した挙動を示し、PCG とは異った作用態度を示した。また、抗 PCG 血清と ABPC 感作血球との反応系では、BAPC および ABPC はほぼ等しい阻止活性を示した。抗 PCG 血清と PCG 感作血球とでは、PCG が 0.2mM と最も強く、それに対して BAPC および ABPC の阻止活性は弱かった。

3. 定量沈降ハプテン阻止反応

ABPC 抗原抗体系で沈降反応を 50% 阻止する濃度は BAPC と PCG は等しく、いずれも ABPC と比べ 1/7 の交叉性がみられた (Fig. 1, Table 2)。PCG 抗原抗体

Fig. 2 Cross reaction of rat passive cutaneous anaphylaxis induced by mouse anti reagin serum against ABPC-KLH and PCG-KLH



系では BAPC の阻止活性は非常に弱かった。なお、BAPC は 30mM 以上で沈澱物を生じるため、10mM までの結果を示した。

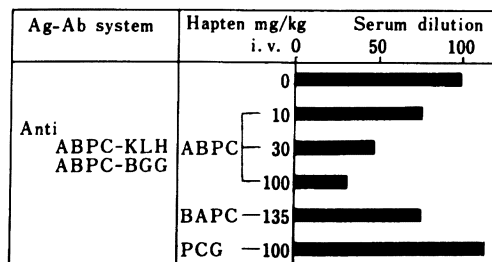
4. 72時間ラット reagin PCA

PCG reagin 抗体による PCA で、PCG 抗原が 128 倍の PCA 力価を示すのに対して、ABPC 抗原は 45 倍の力価を示し、ABPC は PCG の 1/3 の交差性を示した。また、ABPC reagin 抗体による PCA では ABPC と PCG はほぼ完全な交差性を示した (Fig. 2)。

5. 72時間ラット reagin PCA でのハプテン阻止効果

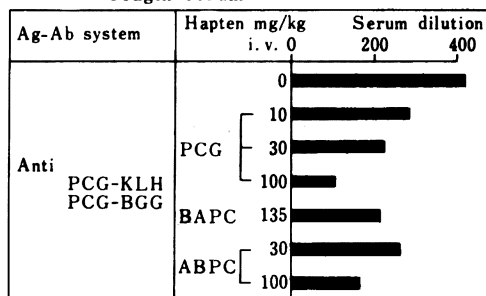
抗 ABPC-KLH reagin 血清と ABPC-BGG での PCA で、ABPC は 10, 30 および 100mg/kg i.v. の前処置で用量に依存して PCA を抑制し、その ID 1/2 は約 30mg/kg i.v. であった。BAPC 135mg/kg i.v. も ABPC の 10mg/kg i.v. 投与群と同程度の阻止効果を示したが、PCG 100mg/kg i.v. では全く阻止効果は認められなかった (Fig. 3)。

Fig. 3 Hapten inhibition on rat passive cutaneous anaphylaxis induced by mouse anti ABPC-KLH mouse reagin serum



抗 PCG-KLH reagin 血清と PCG-BGG での PCA に対して、PCG が最も強い阻止効果を示し、その ID 1/2 は 28mg/kg i.v. であった。この系では ABPC も ID 1/2 が 60mg/kg i.v. と PCG の 1/2 の交差性を示した。また、BAPC も PCG に対して約 1/3 の交差性を示した (Fig. 4)。

Fig. 4 Hapten inhibition on rat passive cutaneous anaphylaxis induced by mouse anti PCG-KLH mouse reagin serum



6. BAPC, ABPC と蛋白の結合能

pH 5.0 における BSA 1M に対する BAPC および ABPC の結合モル数はそれぞれ 0.30, 6.13 で、この条件下では BAPC 自体の結合能は ABPC の 1/20 と弱かった。中性および pH 8.5 における条件では BAPC は BSA との incubation で沈澱物を生じ、また BAPC がアルカリ条件で不安定なため (phosphate buffer pH 8.0, 30°C で 72 時間後には BAPC の約 80% が分解)、BAPC の中性およびアルカリ条件での蛋白結合能の測定は不能であった。

考 察

BAPC を FCA と共にウサギに皮内注射して感作すると、ABPC と同様に特異抗体の産生が認められ、BAPC 自体の血球凝集抗体価は ABPC の約 1/20 と低値を示した。BAPC のウサギ血漿中での水解速度 ($T_{1/2}$) は 1.6 分で、速やかに ABPC に変換する⁹⁾。そこで、ウサギに全身性に投与された BAPC の抗原性は ABPC に類似すると考えられる。BAPC の抗原性が ABPC より低いのは感作法に皮内注射を採用したことによることが考えられる。中性およびアルカリ性の条件では BAPC は不溶のために、注射部位で、エマルジョン内の BAPC が、ABPC へ水解される速度は極めて遅いことが推察される。また、生成した ABPC と蛋白との結合物の生成量も、ABPC 自体で感作した場合よりも少ないことが考えられる。さらに水解されずに注射部位に残存している未変化 BAPC の蛋白結合能が、BAPC の溶解条件下 (pH 5.0) では非常に弱いことも、ABPC に比べて BAPC の免疫原性が低値を示す原因と考えられる。

赤血球凝集反応および定量沈降反応でのハプテン阻止活性からみて、BAPC は ABPC とは比較的反応性が強く、PCG に対しては ABPC よりも反応性が弱い。同様の結果はラット reagin PCA に対するハプテン阻止反応でも得られた。

BAPC は生体内で ABPC に変化して抗菌活性を発揮するものと考えられている。本実験から BAPC としての免疫原性は ABPC に比べて弱いことが示された。従って、仮に生体内で未変化 BAPC が存在した場合にも、感作面からみて安全性に問題は少ないものと推定される。

要 約

1. ウサギに皮内注射により感作した場合、BAPC 自体の免疫原性は ABPC に比べて弱かった。

2. 赤血球凝集ハプテン阻止反応で、BAPC と ABPC とに強い反応性がみられた。

3. 定量沈降および 72 時間ラット reagin PCA のハプテン阻止反応で、BAPC は ABPC および PCG と弱い反応性を示した。

4. BAPC の蛋白結合能は pH 5.0 で ABPC より弱かった。

(本研究は吉富製薬株式会社、台糖ファイザー株式会社共同企画に基づいて実施されたものである。)

文 献

- 1) BODIN, N.O.; B. EKSTRÖM, U. FORSGREN, L.P. JALAR, L. MAGNI, C.H. RAMSAY & B. SJÖBERG: *Bacampicillin: a new orally well-absorbed derivative of ampicillin*. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 8: 518~525, 1975
- 2) SWAHN, Å.: *Gastrointestinal absorption and metabolism of two ³⁵S-labelled ampicillin esters*. *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 9: 299~306, 1976
- 3) LEVINE, B.B. & N.M. VAZ: *Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse*. *Int. Arch. Allergy* 39: 156~171, 1970
- 4) LEY, A.B.; J.P. HARRIS, M. BRINKLEY, B. LILES & J.A. JACK: *Circulating antibody directed against penicillin*. *Science* 127: 1118~1119, 1958
- 5) 峯靖弘: セファロスポリン C 抗生物質の免疫学的研究。アレルギー, 20: 798~808, 1971
- 6) FOLIN, O. & V. CIOCALTEA: *Tyrosine and tryptophan determination in proteins*. *J. Biol. Chem.* 73: 627~650, 1927
- 7) MOTA, I. & D. WONG: *Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization*. *Life Sciences* 8: 813~820, 1969
- 8) LEVINE, B.B.: *N (α-D-penicilloyl) amines as univalent hapten inhibitors of antibody-dependent allergic reactions to penicillin*. *J. Med. Pharm. Chem.* 5: 1025~1034, 1962
- 9) 加藤安之, 高松陸男, 秋山洋一, 飯盛勝義, 本庄勝彦, 栗山経渡: *Bacampicillin hydrochloride の生体内変化について*. *Chemotherapy* 27 (S-4): 59~63, 1979

ANTIGENICITY OF BACAMPICILLIN AND ITS CROSS-REACTION

MICHIO TERASAWA and HIROSHI IMAMURA

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd.

1. Antigenicity of bacampicillin in rabbits was weaker than that of ampicillin.
2. Potent cross-reaction was found in passive hemagglutination between bacampicillin and ampicillin.
3. Bacampicillin showed a weak cross-reactivity with ampicillin and benzylpenicillin in hapten inhibition tests of quantitative precipitin reactions and 72 hr rat reagin passive cutaneous anaphylaxis.
4. Binding activity of bacampicillin with bovine serum albumin was much weaker than that of ampicillin.