

## PCG polymer と血清蛋白との結合性について

(とくに連続向流透析法での解析)

竹内良夫・西村葉子・林 宜之・木村義民

日本医科大学微生物学免疫学教室

(昭和 54 年 7 月 27 日受付)

Benzylpenicillin 水溶液から形成される PCG polymer を分離し、その蛋白結合性を 2 種類の透析法で比較検討した。連続向流透析と seamless cellulose tubing を使用した透析方法の比較から、前者は遊離の薬剤を 30 分以内に除去し、非特異的吸着も認められなかった。後者は 30 分間で薬剤の 10% が除去されたにすぎなかった。この結果から、連続向流透析法により PCG polymer の BSA に対する結合能を測定した。procaine PCG suspension から分離した PCG polymer (2 mg) は BSA (1 mg) に対して 40% の結合能を示した。この数値は BSA を増量した同様の実験でも変化がなく、BSA に対する結合性から 2 種類の PCG polymer が存在することが判明した。以上の研究は透析操作の短縮化により薬剤・蛋白結合物作製中に薬剤が重合する危険性を排除でき、連続向流透析法の有用性が認められた。また蛋白非結合性 PCG polymer の存在は PCG polymer-protein 結合物に対する抗体とは別に、その構造に特有の抗体が産生される可能性を示唆した。

## 緒 言

抗生物質と血清蛋白との結合性に基ずく副作用としては、薬剤が生体内の protein と結合して conjugates を形成することに帰因するアレルギーの発来性が問題となる。

LANDSTEINER<sup>1)</sup> は hapten に対する液性抗体の産生には、hapten が生体内蛋白と結合し、完全抗原となることが必要であると報告した。さらに LEVINE<sup>2)</sup> はペニシリンアレルギーの主な抗原決定基が benzylpenicilloyl protein conjugates であることを証明した。しかしながら薬剤アレルギー患者の生体内から hapten protein conjugates を証明した報告は少なく<sup>3-5)</sup>、これ以外の抗原型によるアレルギー発症の機構も考えられている<sup>6-8)</sup>。

著者ら<sup>9)</sup>は市販の procaine PCG suspension をラットに感作した結果、製剤中に形成された benzylpenicillin 重合体 (PCG polymer) に対する抗体が産生されたことを報告した。えられた抗体は benzylpenicilloyl protein conjugates と PCG polymer に特異的に反応した。しかしながらこの免疫反応が PCG polymer と生体内蛋白との結合物によって抗原性を発揮したのか、または結合を介さない単独の型で生じたのかは明らかにしえなかった。

本論文は以上の点を考察する目的で PCG polymer と生体内蛋白、とくに albumin との結合性について検討すると共に、連続向流透析法の透析効果について検討することを目的とした。

## 材料および方法

1) PCG polymer の検出と分離：竹内の方法<sup>10)</sup>に準じて試料を分離した。procaine PCG suspension (3,000,000 単位/vial, 万有製薬社製 Lot. SW 397) を 10,000 r. p. m. 20 分間遠心した。その上清試料 20 mg を 1 ml の methyl alcohol (和光純薬社製) に溶解し製剤添加物を除去した。次いで gel filtration (Sephadex G-25 fine Pharmacia 社製) により、PCG polymer, dimer, penicillic acid を分離し、その凍結乾燥物を結合率測定用試料とした。対照には、結晶プロカイン PCG カリウム (明治製薬社製 20 万単位 Lot. GLD 51) を使用した。

2) 結合率の測定：Bovine serum albumin (BSA, Sigma 社 U. S. A.) 100 mg と試料 300 mg に pH 8.0 phosphate buffered saline (PBS) 20 ml に溶解し、37°C 1 時間 incubate した。遊離の試料は透析器 (D-T type, Biamed Instrument inc., U. S. A.) を使用して連続向流透析法<sup>11)</sup>で除去した。透析外液の試料濃度は Electrophotometer (Hitachi 101 型, 日立製作所製) を使用して、比吸光度 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )<sup>12)</sup> を各々の最大吸収 (254 nm, 280 nm, 320 nm<sup>13)</sup>) で測定し結合率を換算した。

3) 透析効果の比較：連続向流透析法<sup>11)</sup>と seamless cellulose tubing (18/32 type Visking Company) を使用した透析法を比較した。PCG 1 mg/ml を連続向流透析器および cellulose tube 内に入れ、前者は pH 7.2 P. B. を 2 ml/min. の速度で流出させ、後者は 1,000

Fig. 1 Schematic representation of a countercurrent dialyzer

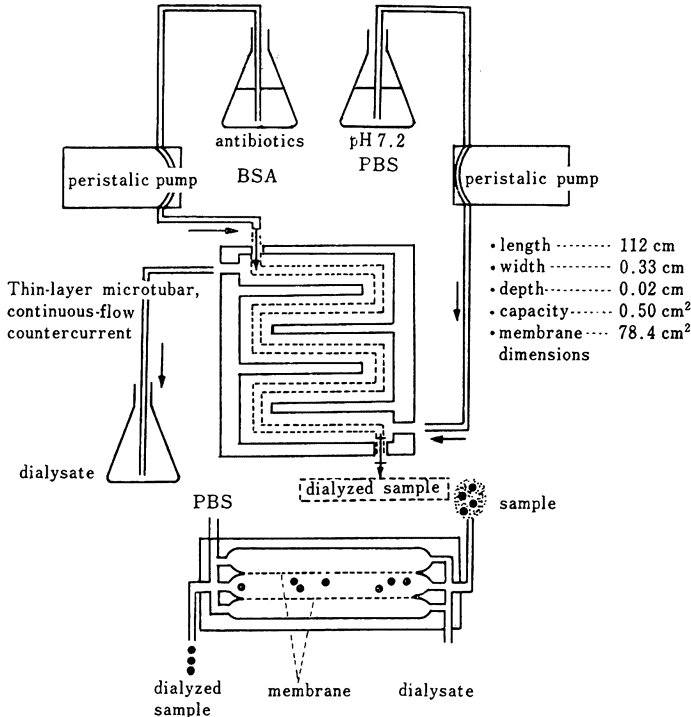
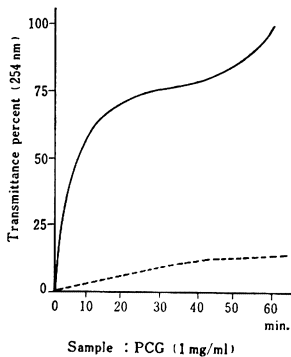


Fig. 2 Effect of sample flow on dialysis



Free PCG in the dialysates was measured at 254 nm by the spectrophotometer and was compared by two dialysis methods. (—) continuous flow countercurrent dialysis. (.....) cellulose tubing dialysis)

倍量の透析外液中で透析した。経済的に透析内液の吸光度を測定し効果を判定した。

結果

透析に使用した連続向流透析装置 (Fig. 1) はプレキシガラス製のブロックの間にシート状の透析膜をはさみ、管状にしたもので、管の長さ 112 cm、容積 0.5 cm<sup>3</sup>、透析面積 78.4 cm<sup>2</sup> である。容積に対して表面積が極端

に大きい。この透析効果は Fig. 2 に示すように PCG (1 mg/ml) を試料とした場合には、透析液を 60 ml (30 分) 流出すると透析内液の transmittance % は 100% となり PCG が完全に外液に移行した。seamless cellulose tubing の場合には (点線)、30 分間で約 10% が減少する程度で、透析効果に著しい差が認められた。そこで連続向流透析法を使用して結合率を測定した。方法に示した操作で、あらかじめ薬剤の比吸光度を測定した (starting antibiotics) 後に BSA と incubate した後の透析外液中の遊離の薬剤 (dialyzed antibiotics) の比吸光度を減じ、starting antibiotics で除し、結合 % とした。

$$\frac{\text{starting antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%} - \text{dialyzed antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%}}{\text{starting antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times 100 = \text{結合 \%}$$

上記の計算により、PCG polymer, dimer, penillenic acid の結合率を計算した (Table 1)。penicillenic acid が最高で 95%、PCG polymer が最低で 40% であった。さらに polymer の結合能について BSA を 4 mg ~ 20 mg に増量した同様の方法で検討した (Table 2)。その結果、PCG polymer の結合率は 44 ~ 49% でほとんど一定であり、蛋白非結合性 polymer の存在が示唆された。

Table 1 Protein binding of antibiotics

Antibiotics	Wavelength of maximum absorption (nm)	E 1% values		binding %
		starting antibiotics	dialyzed antibiotics	
PCG polymer	280	190	114	40
PCG dimer	280	780	347	56
Penicillenic acid	320	240	11	95
PCG	254	87	24	72

Antibiotics : 1 mg/ml

BSA : 2 mg/ml

Protein binding % was calculated as follows.

$$\frac{\text{starting antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%} - \text{dialyzed antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%}}{\text{starting antibiotics } E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times 100 = \text{binding \%}$$

Table 2 Protein binding of PCG polymer

PCG Polymer	BSA	E 1% values		binding %
		starting polymer	dialyzed polymer	
2mg/ml	4 mg/ml	205	113	44
	10 mg/ml	205	106	48
	20 mg/ml	205	103	49

PCG (1 mg) was incubated with BSA (4~20 mg) and binding % was calculated as Table 1.

### 考 察

Penicillin と血清蛋白の結合能は acyl 基の種類によって異なるのは一般によく知られた事実である。

著者らが使用した薬剤は、PCG の重合体、分解物であり acyl 基は全く同じと考えられる。これらの蛋白結合能は penicillenic acid, PCG, PCG dimer, PCG polymer の順に低下した。さらに PCG polymer は蛋白濃度を過剰に加えて反応させても遊離の分子が透析外液中に検出された。この現象は種々の緩衝液で上記の実験を行っても同様の結果であった。このことは PCG 製剤水溶液の放置によって生じる重合体<sup>14)</sup>の化学的性状の1つとして蛋白との結合性の有無により2種類の polymer に分けうる事が示唆された。

BATCHELOR<sup>15)</sup>, SARKANY<sup>16)</sup> は PCG polymer と carrier protein は結合しないと報告した。しかしながら著者らは最近の実験で<sup>17)</sup> PCG polymer を赤外分析した結果、構造の異なる2種類の polymer が検出され、1つは  $1,540\text{ cm}^{-1}$  付近に disulfide 結合<sup>15)</sup>によると考えられる吸収帯が認められた。また、もう1つは beta-Lactam 環が開裂した高分子重合体であった。この結果

から、前者は -S-S- 結合した dimer が別の dimer の beta-Lactam 環の acyl との結合により生じる polymer<sup>18)</sup> であると想定された。また後者は、いわゆる "linear polymer"<sup>19)</sup> であり、polymer 末端の PCG 分子に蛋白との結合基が存在する。すなわち、蛋白非結合性 polymer は前者の構造により、蛋白との結合基が欠除したのか、または linear な高分子内に結合基がまき込まれた<sup>20)</sup> 結果によるかもしれない。この polymer は実験動物に感作原性があり、しかもモルモット PCA 反応を惹起した<sup>9)</sup>。すなわち非結合性 polymer は完全抗原として反応に関与したけれども、低分子であり<sup>10)</sup>、こういう分子の免疫応答には問題が多くさらに詳細に検討すべきであると考えられた。

PCG 水溶液中に形成される polymer は 24 時間で 0.4~1.0%<sup>21)</sup> であり、また五十嵐ら<sup>22)</sup> は放置後 1~2 時間で微量の polymer が検出され、この量はモルモット 8 日間 PCA 反応を惹起するのに充分であると報告した。著者らの予備的な実験でも、PCG 水溶液を 4 時間室温放置することにより、0.1% の PCG polymer が形成されることが確認された。このように薬剤の急速な重合化による抗原性発現についてアレルギー反応 test 抗原を再検討する必要があるかも知れない。

何故ならば薬剤アレルギーに関する実験用抗原は、従来から薬剤蛋白結合物が応用されている。これは一定の条件下で約 24 時間 incubate し、数日間透析した凍結乾燥物である。これらの抗原作製中に antigenic な重合体が形成される可能性は極めて高いと考えられ、その結果、目的とする抗原抗体とは別の反応を観察する危険性が生じるかも知れないからである。

この問題を解決する1つの手段として、今回の実験で使用した連続向流透析法は従来の方法よりも短時間で透析が完了する特徴があった。この結果、実験操作中に形成される polymer の存在を否定できる方法としてその有用性が示唆された。

### 結 論

benzylpenicillin 水溶液から形成される PCG polymer を分離し、その血清アルブミンとの結合性を3種類の透析法で比較検討した。

1) 連続向流透析と seamless cellulose tubing を使用した透析法の比較から、前者では遊離の薬剤を 30 分以内に除去し、非特異的吸着も認められなかった。後者は 30 分間で薬剤の 10% が除去されたにすぎなかった。

2) 次いで連続向流透析法により蛋白結合能を測定した。

procaine PCG suspension から分離した PCG polymer

(2 mg) は BSA (1 mg) に対して 40% の結合能を示した。この結果は BSA を増量した同様の実験でも結合能に変化がなく、蛋白非結合性 PCG polymer の存在が示唆された。

本論文の要旨は第 25 回日本化学療法学会総会において発表した。

### References

- 1) LANDSTEINER, K. & A. A. DISOMMA : Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 72 : 361, 1940
- 2) LEVINE, B. B. & Z. OVERY : Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. *J. Exp. Med.* 114 : 875, 1961
- 3) HAWKINS, D. : Structural change in human serum albumin induced by ingestion of acetylallicic acid. *J. Clin. Invest.* 48 : 536, 1969
- 4) SWANSON, M. A.; D. CHANMSUGAN & R. S. SCHWART : Immuno-haemolytic anemia due to antipenicillin antibodies. *N. Engl. J. Med.* 274 : 178, 1966
- 5) LEVINE, B. B. & A. REDMOND : Immunochemical mechanisms of penicillin induced COOMS' positive and haemolytic anemia in man. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 31 : 594, 1967
- 6) STEWART, G. T. : Allergic residues in penicillin. *Lancet* I : 1178, 1967
- 7) LEVINE, B. B. & A. P. REDMOND : Minor haptenic determinant, specific reagins of PC hypersensitivity in man. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 35 : 445, 1968
- 8) DÜRSH, F. : Search for protein contaminants in benzylpenicillin. *Lancet* II : 1005, 1968
- 9) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (3) Procaine PCG suspension 感作ラットにおける免疫応答。アレルギー - 27 : 459, 1977
- 10) 竹内良夫 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (2) Procaine PCG suspension PCG polymer 中に存在する PCG polymer. アレルギー 26 : 504, 1977
- 11) ZEINE, R. A.; L. K. G. PILLAY, E. C. SMITH, E. MBAWA & B. I. FLORELLA : Thin layer micro-tuber continuous flow countercurrent dialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 79 : 648, 1972
- 12) 日本抗生物質医薬品基準 (厚生省) 287, 1969
- 13) STOCK, F. G. : The spectrophotometric estimation of total penicillins by conversion to penicillanic acid and the importance of copper in controlling the reaction. *Analyst* 79 : 662, 1954
- 14) DEWDNEY, J. M.; U. SMITH & A. W. WHEELER : The formation of antigenic polymers in aqueous solution of betalactam antibiotics. *Immunology* 21 : 517, 1971
- 15) BATCHELOR, F. R.; R. D. DEWDNEY & A. W. WHEELER : The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross reaction with penicillin. *Immunology* 10 : 21, 1970
- 16) SARKANY, I. : Drug allergy. Clinical and laboratory aspects of drug allergy. *Proc. R. Soc. Med.* 61 : 891, 1968
- 17) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (10) PCG polymer の蛋白結合性と免疫応答。日本細菌学会雑誌 33 : 221, (抄録) 1970
- 18) STEWART, G. T.; B. T. BUTCHELER & J. P. MCGOVERN : The nature of the problem; Penicillin Allergy. Ed. J. P. MCGOVERN, 176, C. C. Thomas Publisher. Illinois. 1970
- 19) GRANT, N. H.; D. E. CIARCK & H. E. ALUBURN : Poli 6 (aminoacyl-amino) penicillanic acid and methods of preparation. U. S. Pat. Office. 3351586, 1967
- 20) PATTERSON, R.; M. SUSZKO, C. R. ZEISS, J. J. PRUZANSKY & E. BACAL : Comparison of immune reactivity to polyvalent monomeric and polymeric ragweed antigen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61 : 213, 1978
- 21) STEWART, G. T. : Macromolecular residues contributing to the allergy of penicillin G and cephalosporins. In "Antimicrobial Agents and Chemotherapy" Ann Arbor American Society for Microbiology, Washington 543, 1969
- 22) IGARASHI, H.; K. KOIZUMI & M. MURANAKA : Eliciting antigenicities of benzylpenicillin preparation examined with the reaginic mediated passive cutaneous anaphylaxis system. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 57 : 341, 1978

ON THE BINDING CAPACITY OF PCG POLYMERS  
TO SERUM PROTEIN (ESPECIALLY ON THE  
ANALYSIS BY CONTINUOUS FLOW  
COUNTERCURRENT DIALYSIS)

YOSHIO TAKEUCHI, YOKO NISHIMURA, NOBUYUKI HAYASHI  
and YOSHITAMI KIMURA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, Tokyo

Benzylpenicillin polymers were isolated from stored PCG aqueous solution, and its binding capacity to BSA was comparatively studied by two dialyzing methods.

(1) By centriflow continuous dialyzer, free PCG was filtrated out completely within 30 minutes, showing no non-specific adsorption.

(2) By dialyzing method employing seamless cellulose tube, only 10% of free PCG was filtrated out for 30 minutes.

From these results, centriflow continuous dialyzing method was used for the test of protein binding capacity of PCG polymers. The result showed that 40% of PCG polymers (2 mg) was bound to BSA (1 mg), but the binding capacity did not change by increasing BSA.

These results suggested the existence of PCG polymers which did not bind with albumin.