

Benzylpenicilloyl-Carboxymethyl Cellulose sodium salt の抗原性

林 宣 之

日本医科大学微生物学免疫学教室

(昭和 54 年 8 月 27 日受付)

Carboxymethyl cellulose Na(CMC) は、分散安定剤または粘性剤として、市販 benzylpenicillin 製剤の水性懸濁液に配合されている。この CMC が PCG と結合し、benzylpenicilloyl-CMC となり benzylpenicilloyl(BPO) specific antibody を形成した。えられた抗体は BPO-CMC の抗原性によるものとは別に BPO-CMC 作製中に形成される PCG polymer の関与による抗体産生の可能性が考えられた。本論文は、実験的に作成した BPO-CMC のモルモットに対する感作原性の有無を PCG polymer を対照として検討した。

PCG または PCG polymer と CMC を 37°C, 2 時間、incubate した PCG polymer が混入していない BPO-CMC および PCG polymer-CMC を Hertley 系モルモットに感作した。BPO-CMC 免疫群は 9/10 例に抗体が検出され、感作血球凝集抗体値は平均 64 倍であった。この抗体は PCG に特異的であることが阻止反応で証明された。

対照とした PCG polymer-CMC 免疫群は全例に抗体産生は認められなかった。この抗原の物理化学的測定で PCG polymer は CMC とほとんど結合しないことが判明した。すなわち PCG polymer-CMC 作製操作中、得られた CMC 分画中には PCG polymer が含まれておらず、したがって感作原性がなかったと考えられた。以上の結果はペニシリンアレルギーの発症に関与する抗原の 1 つとして BPO-CMC の存在について再検討の要があることを示唆した。

緒 論

ペニシリンアレルギー発症に関与する多くの抗原型のうち PCG 水溶液中に形成される benzyl penicillin 重合体 (PCG polymer) について種々の検討がなされている¹⁾。竹内ら²⁾は市販 procaine PCG suspension 上清中 (300 万単位/1 vial) から 75 mg の PCG polymer を検出し、こういう PCG polymer 含有製剤はラットに対して感作原性があり、benzylpenicilloyl (BPO) specific antibody が産生されることを報告した。またこの抗体は PCG polymer とも強く反応し、製剤のもつ感作原性の主な抗原決定基が PCG polymer であることを推測した。

一方、上記の PCG polymer とは別に、製剤中に存在可能な抗原性物質として、薬品添加剤である Carboxymethyl cellulose Na(CMC) と PCG の結合物が報告されている。C. H. SCHNEIDER³⁾は、この結合物は penamaldate assay により benzylpenicilloyl-CMC(BPO-CMC) 結合物であるとし、これをウサギに感作した。その結果、BPO-specific antibody の産生を認めた。さらに B. B. SIEGEL⁴⁾はペニシリンアレルギー患者血清を passive transfer し、BPO-CMC を誘発抗原とする皮膚反応を行い、陽性の結果をえた。このことから、BPO-

CMC のアレルギー原性を報告した。

しかしながら、CMC は免疫反応において carrier として作用するとの報告はなく、以上の報告に使用された BPO-CMC 結合物はその作製過程で immunogenic な PCG polymer の混入により、種々のアレルギー反応を惹起したのではないかという疑問が生じた。

この論文は、薬剤アレルギー発症に関与すると報告された CMC と PCG の結合物 (以下 C. H. SCHNEIDER らの報告に従い、BPO-CMC とした) による抗原性発現の有無を、PCG polymer を対照として、再検討することを目的とした。

材料および方法

I. 材 料

1) 薬品 Carboxymethyl cellulose sodium salt (和光純薬工業社製) を使用した。

市販 crystalline benzylpenicillin potassium. Lot No. AP-170 (明治製薬社製) を CMC coupling 抗原および PCG polymer^{5,6)} の材料とした。

2) 動物 免疫には体重 200g の雌性 Hertley 系モルモットを、PCA には雌性同系モルモットを使用した。

II. BPO-CMC または PCG polymer-CMC の作製 PCG または PCG polymer 100 mg と CMC 10 mg/

pH 7.2 phosphate buffered saline (PBS) 5 mg 37°C 2時間 incubate した。遊離の薬剤は、Amicon centriflo membrane CF 25(アミコン、ファーイースト、リミテッド社 U.S.A.) を用いて遠心限外済過(1000 rpm) した。

涙液を紫外外部吸収波長 254 m μ ⁷ で測定し、透析内液から遊離した PCG が完全に除去されるまで、retentates の洗浄を行った。retentates の凍結乾燥物を C. H. SCHNEIDER らの報告⁸に従い、BPO-CMC または便宜上 PCG polymer-CMC とした。

III. 免疫方法：上記 BPO-CMC, PCG polymer-CMC 各 5 mg/0.25 ml Saline を Hertley 系モルモットの足蹠に皮内注射 した。週 1 回の割合で 2 カ月継続し、開始 80~85 日後に全採血した。抗体価の測定は BPO-RSA⁹ を反応用抗原としたタンニン酸処理感作血球凝集反応によった。

IV. タンニン酸処理感作血球凝集反応：高橋の方法⁹に準じて行った。RSA coupling 抗原 2 mg/ml で常法どおり感作血球を作製し、マイクロタイマー法により抗体価を測定した。

V. 薄層クロマトグラフィー：MONNI(1973)¹⁰, POKORNÝ(1973)¹¹らが報告した方法に準じて行った。試料 1 mg を 1 ml の展開液(n-butanol : acetic acid : water = 60 : 15 : 25) に溶解し、その 0.02 ml を TLC aluminium sheet 上に直径約 2 mm のスポットを作製し、風乾する。上記展開液が飽和された密閉槽内で常法どおりに上昇法により試料の展開を行った。物質の移動は TLC aluminium sheet に chloroplatinic reagent を spray し 10 分後に薄赤色中に白色のスポットの出現により確認した。相対移動率 (R_f) は試料の移動距離/溶媒移動距離として計算した。

VI. ヨウ素滴定法：日本抗生物質薬品基準¹²に準じて行った。試料 1 mg/ml に N-NaOH 1 ml を加え 15 分間放置したのち、N-HCl 1 ml, 0.01 N ヨウ素液 10 ml を加え 15 分間放置する。次に 0.01 N チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。試料中の PCG 含有量は、対照の消費した 0.01 N ヨウ素液の量から試験の消費量を減じた数を 2.52 で除し total PCG mg 数とした。

結果

各種抗原感作モルモットにおける immune response は PCG または PCG polymer と CMC の 2 時間 incubate によってえた結合物、すなわち、BPO-CMC, PCG polymer-CMC 各 5 mg を 1 群 10 匹の Hertley 系モルモットに感作した。免疫開始後 2 週目毎に試験採血し抗血清をえた。抗体価は BPO-RSA(2 mg/ml) を抗原としたタンニン酸処理感作血球凝集反応により測定し

Fig. 1 Formation of antibody to immunogens in guinea pigs

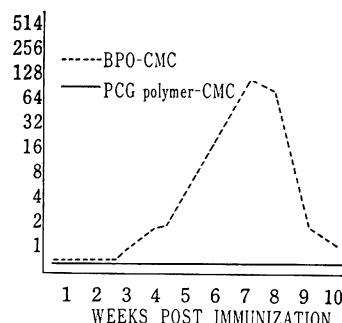
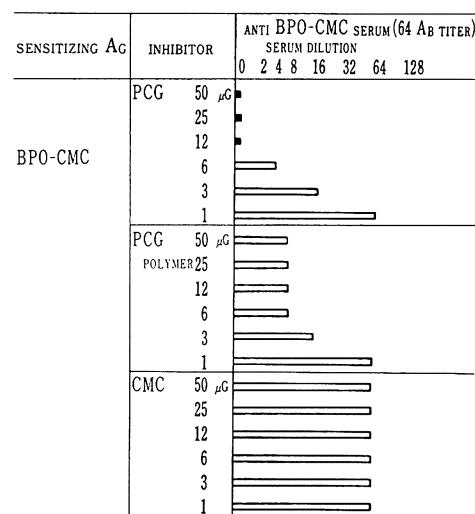


Table 1 Formation of antibody to immunogens in guinea pigs

Immunogen	Positive total animals	PHA titer
BPO-CMC	9/10	64
PCG polymer-CMC	0/10	0
CMC	0/10	0

PHA titers are the means of triplicate determination.

Fig. 2 Antigenic cross reactivity among PCG, PCG polymer and CMC



Values shown are the means of triplicate determination by PHA inhibition test.

た。免疫開始後 2, 4, 6, 8, 10 週目に試験採血した血清の抗体価は Fig. 1 に示されるように BPO-CMC 免疫群は 7~8 週を peak とする抗体が検出され、その抗体産生陽性例は 9/10 であった。しかしながら PCG polymer-CMC 免疫群では全例に検出されなかった (Table 1)。

次いで抗 BPO-CMC 血清の抗原特異性を解析する目

的で感作血球凝集阻止反応を行った(Fig. 2)。64倍抗体値の抗血清希釈液 0.025 ml に対して各濃度の inhibitor (0.025 ml) を加え 2 時間 incubate したものを test 血清とした。血球感作抗原は BPO-RSA(2 mg/ml) を使用した。抗 BPO-CMC 血清は PCG 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で完全に阻止されるが、PCG polymer は 6 mg 以上では 8 倍で一定、CMC では阻止されなかった。以上の結果から、抗 BPO-CMC 血清は PCG polymer とわずかに反応するが PCG に特異的な抗体であり、しかも CMC には反応性がないことが確認された。

以上の実験から感作原性が証明されたが immunogenic な PCG polymer を含有する PCG polymer-CMC の抗体産生が認められなかった。この矛盾を解析する目的で抗原の物理化学的性状を検討した。

試料 1 mg 中の total PCG 量を iodometric assay で測定した (Table 2)。benzylpenicillin potassium 0.98 mg, PCG polymer 0.04 mg, BPO-CMC 0.13 mg で CMC, PCG polymer は 0 であった。さらに同試料 1 mg を n-butanol : acetic acid : water で測定した (Fig. 3)。この条件では PCG の main R_f 値は 0.65 であった。BPO-CMC は R_f 0.39 の相対移動率を示したが PCG polymer-CMC, CMC は検出されなかった。

以上の結果から、PCG と CMC の incubate により遠心限外済過で解離しない BPO-CMC 結合物が形成され、しかも PCG polymer は存在しないことが証明され

た。一方、PCG polymer と CMC は incubate しても結合しないか、または上記測定による検出限界以下の結合しか生じないことが判明した。すなわち、CMC と PCG polymer の incubate 後の遠心限外済過過程で PCG polymer は除去され、CMC だけの抗原である可能性が示唆された。

考 察

Carboxymethyl cellulose Na(CMC) は分散安定剤、または粘性剤として医薬品、化粧品等に広く利用されている水溶性セルロース誘導体である。この CMC は benzyl penicillin 製剤の水性懸濁液に配合されている。

今回の実験で使用した BPO-CMC は PCG と CMC を 2 時間以内の incubate により操作中に形成される可能性のある immunogenic PCG polymer¹⁴⁾ を除外した。この抗原をモルモットに感作することにより BPO specific antibody が産生され、PCG polymer が関与しない CMC と PCG の結合による抗原化が証明された。しかしながら、セルロース誘導体の抗原性または carrier 効果に関する報告は少なく¹⁵⁾、PCG-cellulose 結合物の抗体産生態度は免疫学的にも興味深いと考えられた。一方、結合物による免疫反応とは別に CMC の特性である粘性剤としての作用により、PCG 分子が CMC 中に長時間とり込まれた結果、持続的な抗原放出により抗 PCG 抗体が産生される可能性も考えられた。そこで著者らはモルモットの food pad に皮内注射された 5% CMC に溶解した PCG の血中移行時間を測定したが対照とした saline に溶解した PCG と同程度であり、CMC の吸着作用による抗原刺激な証明されなかった。

対照とした PCG polymer はその構造¹⁾から CMC との結合基が mask されている結果、CMC と incubate しても結合せず遠心限外済過で外液に移行し PCG polymer-CMC は CMC だけが残留した抗原であることが確認された。CMC に抗原がないことからこの免疫群で抗体産生が認められないのは当然であろう。

C. H. SCHNEIDER は CMC 100 glucose 当りの BPO 結合数は 3~4 であると報告した。もし PCG と CMC が化学結合するならば BPO 結合数はもっと多いはずである。Carboxymethyl cellulose はセルロースそのものが anhydroglucose unit からなるポリマーを形成している。各 anhydroglucose unit は 3 個の水酸基を有する anionic cellulosic polymer である¹⁶⁾。実験に使用した CMC のカルボキシメチル基の置換度が 0.7 であるので BPO-CMC は置換されていないアルコール性水酸基と BPO が弱い結合を生じた結果によるものと考えられた。

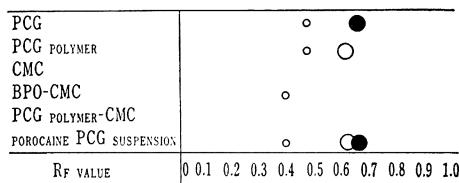
PCG 製剤中の BPO-CMC 結合物の存在を示唆する報

Table 2 Iodometric assay

Sample 1 mg/ml	Total PCG
PCG	0.98 mg
PCG polymer	0.04 mg
CMC	0
BPO-CMC	0.13 mg
PCG polymer-CMC	0

Minimal detective dose : 10.0 μg

Fig. 3 R_f values of immunogens



Development solution : n-butyl alcohol-acetic acid-water 60 : 15 : 25 (PH 2.5)

Spraying reagent : Platinium chloride solution

Minimal detective dose : 19 μg

告はない。薄層クロマトグラフィーで procaine PCG suspension は *Rf* 0.39 の相対移動率を示す物質が検出され、それは BPO-CMC と一致した。この詳細については検討しなかったが製剤中の BPO-CMC の存在は否定しないと考えられ、PCG polymer の非存在下で薬剤アレルギーに関する新しい抗原型として充分な注意が必要であると推測された。

結 語

医薬品添加物として使用されている Carboxymethyl cellulose が PCG と結合することによる感作原性の発現を PCG polymer を対照として再検討し、以下の結果を得た。

1) PCG または PCG polymer と CMC を 2 時間 incubate してえた benzylpenicilloyl-CMC と PCG polymer-CMC 各 5 mg をモルモットに感作した。

前者は 9/10 例に抗体産生が認められ、えられた抗体は PCG polymer とわずかに反応するが PCG に特異的な抗体であった。この結果は BPO-CMC の感作原性に PCG polymer の関与は認められないことを示唆した。

2) PCG polymer-CMC 免疫群は全例に抗体は検出されなかった。抗原の物理化学的検討から PCG polymer と CMC は結合せず、この抗原の非感作原性は抗原作製中に PCG polymer が除去されたことによるものであることが証明された。

文 献

- 1) DE WECK, A. L. ; C. H. SCHNEIDER & J. GUTER-SOHN : The role of penicilloylated protein impurity, penicillin polymer and dimer in penicillin allergy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 33 : 535~567, 1968
- 2) 竹内良夫 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (2). Procaine PCG suspension 中に存在する PCG polymer の検出。アレルギー 26 : 1~8, 1977
- 3) SCHNEIDER, C. H. ; A. L. DE WECK & E. STAUBLE : Carboxymethyl cellulose additives in penicillin and elicitation of anaphylactic reactions. *Experientia* 27(2) : 167~168, 1971
- 4) SIEGEL, B. B. : Study in penicillin hypersensitivity. V. Further studies on the antigenic properties of altered penicillin. *J. Allergy* 33(4) : 349~355, 1962
- 5) 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 (1). PCG polymer に対するムットの免疫応答。アレルギー 26 : 1977
- 6) GRANT, N. H. ; D. E. CLARK & H. E. ALUBURN : Poli-6 (aminocyamino) Penicillanic acid and methods of preparation. U. S. Pat. Office 3351586, 1967
- 7) BUNDGAARD, H. & K. ILVER : A new spectrophotometric method for the determination of penicillins. *J. Pharm. Pharmacol.* 24 : 790~794, 1972
- 8) LEVINE, B. B. : Studies on the mechanism of the formation penicillin antigen. 1. Delay allergic cross-reaction among penicillin G and its degradation products. *J. Exp. Med.* 121 : 1131~1154, 1960
- 9) 高橋昌己 : 感作血球凝集反応の簡易化とその反応に関する基礎的研究。アレルギー 13(7) : 516~523, 1964
- 10) MONNI, P. E. ; R. A. LIPPER, J. M. BLAKA & S. L. HEM : Analysis of potassium penicillin G and its degradation products by TLC. *J. Chromatogr.* 76 : 512~515, 1973
- 11) POKORNÝ, M. ; N. VITEXIC & M. JAPELI : Detection of penicillins with chloroplatinic acid on thin layer chromatoplates. *J. Chromatogr.* 77 : 459~460, 1973
- 12) 日本抗生物質医薬品基準 (厚生省) p. 287~290, 1969
- 13) 日本薬局法基準 (厚生省) p. 443~448
- 14) DEWDNEY, J. M. ; H. SMITH & A. W. WHEELER : The formation of antigenic polymers in aqueous solutions of beta-lactam antibiotics. *Immunology* 21 : 517~525, 1971
- 15) 浜田稔夫, 堀口俊一 : Sodium Carboxymethyl Cellulose によるアレルギー性接触皮膚炎の 1 例。産業医学 20 : 207~211, 1978
- 16) RAHWAY, N. T. : The Merk Index, 9th ed., 8344, Merk & Co., Inc., U. S. A., 1976

ANTIGENICITY OF BENZYL PENICILLIN-CARBOXYMETHYL CELLULOSE

NOBUYUKI HAYASHI

Department of Microbiology and Immunology,
Nippon Medical School, Tokyo

Antigenicity of penicillin analogues converted from carboxymethyl cellulose (CMC), additives in penicillin suspension, was investigated, and the results obtained were as follows:

1) Antibodies in the guinea pigs immunized with either 5 mg of benzylpenicilloyl(BPO)-CMC or PCG polymer-CMC were studied with passive haemagglutination technique.

In the former, specific antibody was detected from 9 out of 10 animals and was reacted to PCG but slightly to PCG polymer. It was suggested that immunogenicity of BPO-CMC was not influenced by PCG polymer.

2) PCG polymer-CMC was not detected at all. From physicochemical studies of antigen, it was found that PCG polymer was not bound CMC, and PCG polymer-CMC did not contain PCG polymer.

For that reason, it had no immunogenicity.