

補液中で形成される PCG polymer について

竹内良夫・西村葉子・木村義民・石井洋二・林 宣之

日本医科大学微生物学免疫学教室

(昭和 54 年 11 月 29 日受付)

Benzylpenicillin 重合体 (PCG polymer) は PCG 水溶液を長時間放置することにより形成され、抗原性を発現する。この PCG polymer は多様な影響により重合化が促進することが知られている。著者らは臨床で at random に使用されている補液に PCG を溶解し、短時間で生じる重合化について測定した。さらに PCG 溶液の PCG の分解は phosphate buffered saline (pH 5) で高まり、その変化は 322 nm の測定で顕著であった。各種補液中の PCG は 5% ブドウ糖液, 10% マルトース液中で変化が著しかった。上記溶液を試料として PCG polymer の形式を gel filtration で検討した。その結果, 4 時間放置した 1% PCG 水溶液の 0.1% が重合化していることが判明した。次に抗 BPO-BSA 感作モルモットを使用して, 1% PCG 水溶液を challenge 抗原とする 3 時間 PCA 反応を行った。2 時間以上放置後の溶液は PCA 反応を惹起し, PCG polymer 形成による反応であることが証明された。

以上の測定により, PCG 水溶液は酸性条件下で短時間に penicillenic acid を介して polymer を形成することが推測された。この反応は薬理的にもブニシリンアレルギーの研究にも, 重要な意味をもつと考えられ, 再考の要あることを示唆した。

緒 言

Benzylpenicillin 重合体 (PCG polymer) は PCG 水溶液を長時間放置することにより形成され, 抗原性を発現することが知られている¹⁻⁴⁾。

PCG は beta-lactam nitrogen と sulfur atom の両方に electron attack を受けやすく, 水溶液中での重合化も nucleophiles により影響を受けやすい⁵⁾。上記反応により PCG を特殊な溶媒に溶解した場合には短時間に感作原性のある PCG polymer を形成する⁶⁾可能性が生じるかもしれない。本論文はこの推論をもとにして, 臨床で一般的に用いられている各種の補液を溶媒として, 溶解した PCG の重合化を測定し, あわせてその PCG 水溶液のモルモットに対する PCA 惹起能を検討することにより, 形成された PCG polymer について若干の考察を加えることを目的とした。

材料および方法

1. 材料

1) 動物: 免疫には 180g の雌性 Hertley 系モルモットを, PCA には 200g の雌性同系モルモットを使用した。

2) 薬品: 実験で使用したペニシリンは結晶ペニシリン G カリウム (明治製薬社製 Lot. GLD51) を使用した。PCG の溶媒として, 輸液は KN 補液 3B, ラクテック G 注射液, マルトス 10, 5 W/V % ブドウ糖注射液 (以

上大塚製薬社製), ヘスパンダー (杏林製薬社製) を無作為に選び使用した。

2. 各種溶媒中の PCG の変化: pH 5, 7, 9 に調整した生理食塩水, 水, リン酸 buffer 0.1% (W/V) PCG で水溶液を作製した。溶解直後から 4 時間までの PCG の変化は日立分光光度計 101 型 (日立製作所製) で 254 nm⁷⁾, 280 nm⁸⁾, 320 nm⁹⁾ の透過率の測定によった。また 5 種類の補液中の PCG の変化も上記方法を使用した。

3. column chromatography の条件: 膨潤した Sepha-dex G-25 を 83×1.5 cm column に充填した。溶出速度は 1 ml/min. とした。このカラムの total bed volume は 145.0 ml で void volume は blue dextran 2,000 (2 mg/ml) を溶出させてその main peak から計算すると 55 ml であった。void volume Kav. 0, total bed volume を Kav 1.0 とした。

4. 免疫方法: benzylpenicilloyl protein 結合物¹⁰⁾ (BPO-BSA) 5 mg を 0.5 ml の saline に溶解し, FREUND's complete adjuvant (FCA, Difco Lab. USA) 0.5 ml に加えて emulsion としモルモットの foot pad に皮内注射した。

5. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test: モルモットの背部に抗血清 0.1 ml を皮内注射し, 3 時間後に抗原 1 mg/ml を Evans blue 0.6 ml と共に

Fig. 1 Degradation of PCG solution at different pH

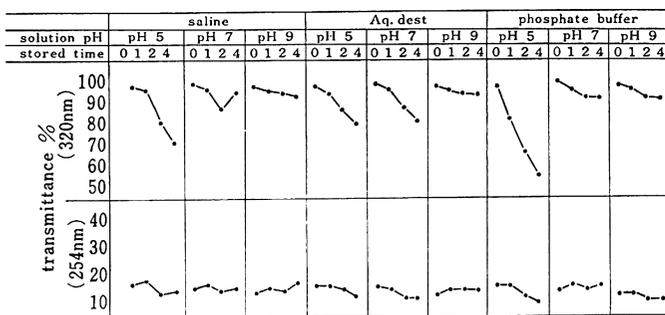


Fig. 2 Degradation of PCG in infusion solution

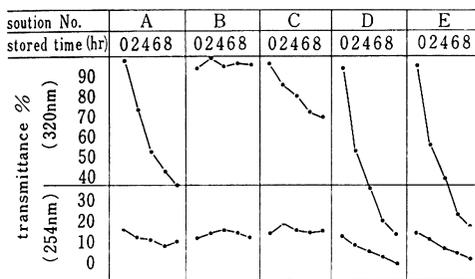


Fig. 3 Gel filtration pattern of PCG solution stored for 4 hr

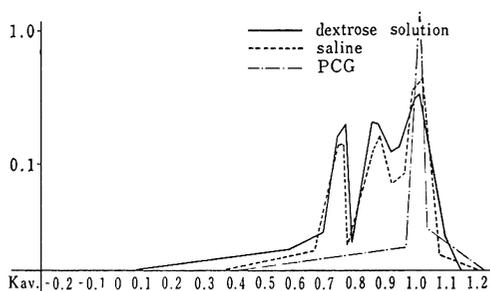
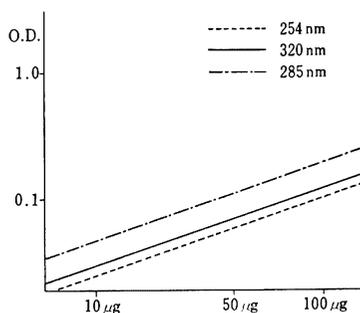


Fig. 4 Dose response curve of pellicon filtrated pure polymer



Sephadex G-25 充填 column の void volume 55 ml, total bed volume 145 ml をそれぞれ, Kav 0, Kav 1 とし, 試料の溶出速度は1分間に 1ml とした。試料の対照として溶解直後の PCG 溶液を同様に溶出した。試料の溶出は2時間で終了した。2つの PCG 水溶液は分子量の異なる3つの peak に分離され Kav 0.75, 0.85, 1.0 に溶出した。溶解直後の PCG(fresh PCG)は Kav. 1.0 であった (Fig. 3)。この結果から Kav 0.75, 0.85 付近に溶出する物質は high molecular weight materials であった。次いで gel filtration 溶出 peak から

静注した。静注 30 分後に青色斑を測定し, 直径 5 mm 以上を PCA 陽性とした。

結 果

PCG を pH の異なる溶媒に溶解し, その変化について検討した。pH 5, 7, 9 に調整した生理食塩水, 水, リン酸 buffer に PCG を 1 mg/ml の割合で溶解し, 溶解直後から4時間までの PCG の変化を透過率で測定した (Fig. 1)。紫外外部吸収波長 254 nm の測定で4時間以内は pH による影響はほとんど認められないが, 320 nm の測定では pH の差による影響が認められ, とくに酸性条件下 (pH 5) ではその変化が著しいことが観察された。次に, 市販の輸液を at random に5種類を選び PCG を 1 mg/ml の割合で溶解し, その溶媒中での変化を同じく透過率で測定した (Fig. 2)。A と B は電解質剤 (pH 6.5~7.2), C は代用血漿 (pH 5.9), D, E は糖類剤 (pH 3.5~6.5) である。その結果 320 nm での測定では sample D, sample E 中の PCG は透過率が 90 T% から 10 T% に減少し物質の変化が急激に生じた。sample D は 5% ブドウ糖液, sample E は 10% マルトース液であった。

Fig. 1, 2 で測定された PCG 変化と PCG polymer の形成態度の関連を知る目的で以下の実験を行った。生理食塩水と 5% ブドウ糖液を溶媒として4時間放置した 1% PCG 水溶液を gel filtration により検討した。

Table 1 Elicitegenicity of PCG polymer, BPO-RSA and PCG in PCA reaction

Antigen	Concentration	PCA(blued diameter) anti BPO-BSA serum	
		site 1	site 2
PCG polymer/ 1% PCG sol.	1,000 μ g	13	12
	100	9	8
	10	4	0
	1	0	0
BPO-RSA	1,000 μ g	30	23
	100	20	18
	10	8	7
	1	5	4
PCG	1,000 μ g	0	0
	100	0	0
	10	0	0

Table 2 Elicitegenicity of PCG solution stored for 0~4 hr

Antigen	Stored time	PCA(blued diameter) anti BPO-BSA serum	
		site 1	site 2
1% PCG/ saline	0 hr	0	0
	2 hr	5	3
	4 hr	12	9
1% PCG/ 5% dextrose	0 hr	0	0
	2 hr	7	6
	4 hr	14	12

PCG polymer の含有量を推測した。実験的に作製した PCG polymer を限外ろ過し、精製した polymer の検量曲線 (Fig. 4) は 100 μ g で O.D. が 0.3 であった。この数値を 1% PCG/5% ブドウ糖液の gel filtration 溶出 peak (Kav 0.75) に比較概算すると試料の約 0.1% 以上が PCG polymer であった。

そこで 4 時間放置した PCG 水溶液の PCA 誘発原性を検討する目的で以下の実験を行った。あらかじめ benzylpenicilloyl protein 結合物 (BPO-BSA) をモルモットに感作してえた抗 BPO-BSA 血清を PCA test 用血清とした。モルモット背腹部皮内に PCA sites を作製し、PCG polymer の PCA 反応最少誘発量を測定した (Table 1)。

PCG polymer は PCG 水溶液中に存在することから、本実験使用濃度である 1% PCG solution に PCG polymer を 1 μ g から 1,000 μ g, また BPO-PSA 1 μ g から 1,000 μ g, PCG 10 μ g から 1,000 μ g を溶解し challenge Ag とした。PCG polymer 溶液の最小誘発

量は 10 μ g 程度 BPO-RSA 1 μ g 以下であったが、PCG は誘発しなかった。同様に生理食塩水または 5% ブドウ糖液に 1% の割合で PCG を溶解し、0 時間から 4 時間放置した試料を challenge Ag とした (Table 2)。2 時間放置した溶液について blue のスポットが出現し、PCA 陽性と判定した。5% ブドウ糖液で溶解した試料のほうが誘発能が高い傾向が示された。

考 察

Benzylpenicillin が水溶液中で変化する過程は種々の報告がある¹¹⁾。STEWART ら¹²⁾は penicillenic acid が disulfide bridging した dimer から形成される disulfide bridge complex polymer を推定した。今回の実験から酸性条件下で PCG の分解が著しく、penicillenic acid の形成^{13,14)}が Fig. 1 で推測された。この penicillenic acid から dimer を生じ、polymer が生じる可能性は gel filtration 溶出 pattern で検討された。著者ら⁹⁾は同一条件の gel chromatography で Kav 0.75 以下を PCG polymer, 0.85 を PCG dimer であると報告し、PCG/5% ブドウ糖溶液もこれに一致した。しかしながら PCG polymer は一般的にはアルカリ条件下で重合化が高まる^{3,4)}と報告されており、えられた結果とは異なっていた。

PCG 重合化に関する報告の中で重合化速度に関する報告は少ない¹⁵⁾。今回えられた 0.1% 重合化/4 時間 (Fig. 3) が適正であるかどうかはさらに多くの薬剤について検討すべき数値であると考えられた。

しかしながら 4 時間放置後の PCG 水溶液は PCG polymer を形成し benzylpenicilloyl specific antibody を PCA 反応で誘発した。この結果は臨床上、補液に PCG を加えて点滴する場合、一般的な点滴時間 (1~4 時間) 内に immunogenic PCG polymer が過剰に形成され、アレルギー発症の原因となる可能性も考えられた。さらに補液中の PCG の変化について薬理学的にも再考すべき問題であることが示唆された。

文 献

- 1) KUCHINSKAS, E. J. & G. N. LEVY: Comparative stabilities of ampicillin and hetacillin in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 61: 727~729, 1972
- 2) SMITH, H. & A. C. MARSHALL: Polymers formed by some beta-lactam antibiotics. *Nature* 232: 45~46, 1971
- 3) DEWDNEY, J. M.; H. SMITH & A. W. WHEELER: The formation of antigenic polymers in aqueous solution of beta-lactam antibiotics. *Immunology* 31: 517~525, 1971
- 4) SMITH, H.; J. M. DEWDNEY & A. W. WHEELER: A comparison of the amounts and the anti-

- genicity of polymeric materials formed in aqueous solution by some beta-lactam antibiotics. *Immunology* 21 : 527~533, 1971
- 5) HOU, J. P. & J. W. POOLE : Beta-lactam antibiotics—Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J. Pharm. Sci.* 60 : 503~532, 1971
- 6) 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 に対するラットの免疫応答。アレルギー 26 : 10~16, 1977
- 7) GARLOCK, E. A. & D. C. GROVE : The quantitative determination of benzylpenicillin by ultraviolet adsorption. *J. Am. Pharm. Assoc.* 39:398~400, 1950
- 8) 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 : 1~7, 1977
- 9) BUNDGARD, H. & K. ILVER : A new spectrophotometric method for the determination of penicillins. *J. Pharm. Pharmacol.* 24 : 790~794, 1972
- 10) LEVINE, B. B. : Studies on the dimensions of the rabbit antibenzylpenicilloyl antibody combining sites. *J. Exp. Med.* 117 : 161~183, 1963
- 11) GRANT, N. H. ; D. E. CLARCK & H. E. ALUBURN : Poli-6(aminoacyl-amino) penicillanic acid and methods of preparation. U. S. Pat. Office, 3351586, 1967
- 12) STEWART, G. T. ; B. T. BUTCHER & J. P. MC GOVERN : The nature of the problem. Penicillin allergy. Ed. J. P. MC GOVERN, pp. 176~191, C. C. Tomas Publisher, Illinois, 1970
- 13) LEVINE, B. B. : Studies on the formation of penicillin antigen : 2. Some reactions of D-benzylpenicillanic acid in aqueous solution at pH 7.5. *Arch. Biochem. Biophys.* 93 : 50~55, 1961
- 14) 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 : 662~671, 1954
- 15) KUCHINSKAS, E. J. & G. N. LEVY : Comparative stabilities of ampicillin and hetacillin in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 61 : 727~729, 1972

PCG POLYMER PRODUCTION IN INFUSION SOLUTIONS

YOSHIO TAKEUCHI, YOKO NISHIMURA, YOSHITAMI KIMURA,

YOZI ISHII and NOBUYUKI HAYASHI

Department of Microbiology and Immunology,

Nippon Medical School

Benzylpenicillin in several infusions produced PCG polymer for 4 hours and these were measured by UV absorption and gel chromatography.

The results were obtained as follows.

1. Degradation of PCG in phosphate buffered saline (pH 5) was higher than other pH solutions, especially at 322 nm.
2. In each infusion solutions, the degradation of PCG in 5% saccharose and 10% maltose solution was higher than others. It was measured by gel filtration that 0.1% of PCG volume was detected as PCG polymer at these solutions.
3. One ml of these solution was elicited to PCA reaction sensitized by anti BPO-BSA serum. From the results of PCA, it was clarified that 4 hours stored PCG infusion solution had elicitenicity.