

## AM-715 の抗原性試験

入 倉 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

神田 和実・野本 恭之・杉本 勉

杏林製薬株式会社開発技術センター

合成抗菌剤 AM-715 の抗原性をモルモットおよびウサギを用いて検討し、以下の結果を得た。

1. アセトン・オリーブ油を基剤とし、0.8% AM-715 の 0.25 ml (AM-715 として 2 mg) および 0.5 ml (4 mg), 1% DNCB の 0.2 ml, 基剤のみ 0.5 ml の計 4 群について、モルモットの左背部皮膚に毎日 1 回、連続 7 日間滴下接触し、9 日間の休薬の後、右背部皮膚に更に滴下して発赤発生の有無から遅延型アレルギー反応の有無を判定した。DNCB 群は全例で発赤を認めたが、AM-715 の 2 群と基剤のみの群では 1 例も発赤を認めなかった。

2. AM-715 水溶液を 5 mg/kg および 50 mg/kg ずつ 7 日間隔で 3 回、FREUND's complete adjuvant (FCA) と共にモルモットの皮内に感作後 10 日、また AM-715 単独で 50 mg/kg ずつ 3 週間に 6 回、皮内、筋肉内、静脈内と投与経路を変えて感作後 7 日に、1% AM-715 水溶液 1 ml を静脈内投与してもアナフィラキシー様反応は出現しなかった。これら感作を行なったモルモットの血清を用い、PCA 反応を調べたが、全例とも陰性であった。

3. ウサギの皮内に AM-715-BGG を FCA と共に 2 週間隔で 2 回投与したが、得られた血清中に AM-715-HSA と特異的に反応する抗体は認められなかった。同様に PCG-BGG と FCA を投与したウサギでは、PCG-HSA と反応する抗体の産生が全例に認められた。

以上の成績から、AM-715 は抗原性および免疫原性を有しないものと考えられた。

## 緒 言

AM-715 は杏林製薬株式会社に抗菌剤として開発中の quinolinecarboxylic acid 誘導体で、Fig. 1 に示す構造を有する。構造類似の抗菌剤には nalidixic acid (NA), pipemidic acid (PPA), miloxacin (MLX), cinoxacin (CINX) ほかがある。これら抗菌剤の臨床報告において、副作用の内アレルギーに関連するものは皮疹、痒疹、蕁麻疹などの皮膚症状が主であって<sup>1-4)</sup>、ショックなどの報告はみられていない。

今回、AM-715 の安全性確認試験の一環として、モルモットおよびウサギを用いて抗原性の検討を行ない、以下の知見を得たので報告する。

## I. 実験材料および方法

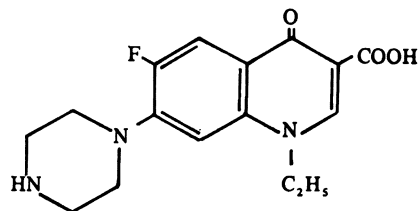
## 1. 実験動物

雄モルモット (Hartley 系) および雄ウサギ (日本白色種) を日本医科学資材から購入し、予備飼育後に実験に供した。使用時の体重はモルモットが 260~310 g, ウサギが 2.2~2.8 kg であった。

## 2. 試薬

AM-715 は自社合成し、純度試験などで品質を確認し

Fig. 1 Chemical structure of AM-715



1-Ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid

て用いた。2, 4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) は東京化成の製品を、ペニシリン G カリウム (PCG) は明治製薬の市販品を用いた。また、ウシ血清  $\gamma$ -グロブリン (BGG) は Sigma 社、ヒト血清アルブミン (HSA) は Miles Labs. 社、卵白アルブミン (OVA) は生化学工業、FREUND's complete adjuvant (FCA) は Difco 社の製品をそれぞれ使用した。

## 3. 実験方法

1) モルモットを用いた遅延型アレルギー (接触皮膚炎) 誘発試験

AM-715 をアセトンに溶解した後、その 1/4 容量のオリーブ油を加え、アセトン・オリーブ油 (4:1) 混液 (以

下、基剤という)にAM-715を0.8%および0.4%含有する溶液をそれぞれ調製した。同様に基剤中DNCB1%および0.2%含有する溶液を調製した。

モルモットは1群10匹、4群を用いた。感作は、実験開始前日に毛を刈った左背部皮膚に1日1回連続7日間、メスピペットで薬液を滴下接触させて行なった。AM-715は0.8%溶液を感作用とし、1回1個体当りの滴下量を1群は0.25 ml (AM-715として2 mg)、他の1群は0.5 ml (AM-715として4 mg)とした。DNCBは1%溶液を感作用とし、0.2 ml (DNCBとして2 mg)を滴下した。残りの1群は対照群とし、基剤のみを0.5 ml滴下した。

誘発試験は、感作終了後8日目に毛を刈った右背部皮膚に、9日目に薬液0.1 mlを滴下接触させて行なった。誘発用としてAM-715は0.4%溶液、DNCBは0.2%溶液を用いた。右背部皮膚に滴下後、24時間目に観察し遅延型アレルギーの程度を(-)変化がない、(±)皮膚の肥厚が認められる、(+)皮膚の発赤が認められる、(++)強度の皮膚発赤が認められるの4段階で判定した。

その後、同一個体を用い、第1回目と同条件で感作および誘発を行ない、第2回試験を実施した。

#### 2) モルモットを用いたアナフィラキシー誘発試験

AM-715は1N塩酸に溶解後、1N苛性ソーダを加えてpH5.5とする方法で0.5%~5%の溶液を調製した。また、OVAは生理食塩水に溶解し、0.5%および1%の溶液を調製した。

モルモットは1群10匹、5群を用いた。1群はAM-715単独による感作群とし、残りの4群は薬液とFCAの等容量混液による感作群とした。

AM-715単独感作群は、初回に皮下、3日後に筋肉内、7日後と10日後に足趾皮内、14日後に静脈内、17日後に皮下と投与経路を変えて合計6回、1回にAM-715として50 mg/kgを投与した。最終投与7日後にAM-715の1%溶液1 mlを耳静脈内に注射し、アナフィラキシー症状の発生の有無を観察した。

薬液とFCAの等容量混液による感作群はAM-715の5 mg/kg群および50 mg/kg群、OVAの5 mg/kg群、対照群(生理食塩水とFCA)の4群とし7日間間隔で3回、足趾皮内および腹部側皮内に混液(2 ml/kg/回)を分割投与した。最終投与10日後にAM-715の2群はAM-715の1%溶液を、OVA群はOVAの1%溶液を、対照群は生理食塩水をそれぞれ1 mlずつ耳静脈内に注射し、アナフィラキシー症状の発生の有無を観察した。

また、OVA群中3匹は誘発試験を行わずに残し、誘発試験終了したAM-715の3群全例および対照群全例と共に以下の試験に供した。すなわち、これらモルモ

ットをdonorとし、全血から得た血清を10倍~1,000倍まで希釈して、OVARY<sup>9)</sup>の方法に準じてPCA反応を調べた。血清の希釈はpH7.4のM/15 phosphate buffer saline (PBS)を用いて行ない、希釈血清0.1 mlを別のモルモット(recipient)の背部皮内に注射した。誘発用としてAM-715の1%溶液、OVAの1%溶液、生理食塩水を用い、その0.5 mlと1% Evans blue 0.5 mlの混液を希釈血清投与後3時間に静脈内注射した。30分後に希釈血清投与部位における色素出現を観察し、青斑の大きさ5 mm以上をPCA反応陽性とした。なお、反応陽性を示す最大希釈倍数によって抗体産生の程度を判定した。

#### 3) ウサギにおける薬物-蛋白質結合体による抗体産生試験

##### (1) 薬物-蛋白質結合体の調製

薬物AM-715およびPCGと蛋白質BGGとHSAのそれぞれ結合体、すなわちAM-715-BGG、PCG-BGG、AM-715-HSA、PCG-HSAを調製した。すなわち、濃度30 mg/mlの薬物水溶液(pH11.0)に蛋白質を10 mg/mlの濃度になるよう加え、pH11.0に保ちながら37°Cで48時間incubateした。その後、Visking tubeに入れ、外層を4°Cに保ちつつ多量の生理食塩水(pH8.0)を満たし、頻回外液を交換し、外液中に薬物を認めなくなるまで5日間透析した。透析後、tube内溶液の蛋白濃度が10 mg/mlであることをLowry<sup>6)</sup>法で確認し、このものを薬物蛋白質結合体として使用した。

AM-715と蛋白質の結合は、上述の透析後の内液についてAM-715含量を吸光度法(330 nmの吸収)で測定すると300 μg/mlであったこと、内液を12%硫酸アンモニウム溶液および20%硫酸アンモニウム溶液でそれぞれ沈殿せしめ、その沈殿を採取し、再度溶解してもAM-715の含量に変化がないことによって確認した。AM-715と蛋白質との結合比はBGG(M.W. 140,000)1分子に対し13.6モル、HSA(M.W. 67,000)1分子に対して6.5モルと算定された。

##### (2) ウサギの感作

AM-715-BGG、PCG-BGGおよび対照としてBGGのそれぞれ1 ml(蛋白質濃度10 mg/ml)を等容量のFCAと混合し、感作に用いた。ウサギは対照群4匹とし、AM-715-BGG群とPCG-BGG群は6匹ずつ使用した。感作は、FCAとの混液2 mlを足趾および腹部側皮内に分割注入して行なった。さらに2週間後に第2回目の感作を行なった。第2回目の感作から10日後に採血し、血清を分離し、使用時まで-20°Cに保存した。抗体産生の検査は以下の4方法によった。

##### i) 定量沈降反応

KABAT<sup>7)</sup>の方法に準じて行なった。ウサギ血清は

群ごとにプールして用いた。AM-715-HSA および PCG-HSA を PBS で 9 段階に倍数希釈し、抗体検出用試薬とした。血清と抗体検出用試薬のそれぞれ 0.5 ml を混合し、37°C で 2 時間 incubate 後、4°C に 48 時間保った。遠心分離によって沈殿を採取し、沈査を PBS で 3 回洗った後、LOWRY<sup>6)</sup> 法で蛋白質量を測定した。

#### ii) 沈降反応阻止試験

PAULING ら<sup>8)</sup> の方法に準じて行なった。PCG-BGG 群のウサギ血清を PBS で 2 倍希釈したものを用いた。AM-715 溶液 (40mM/ml) および PCG 溶液 (40mM/ml) を PBS で 9 段階の倍数希釈し、この希釈液 0.5 ml を 2 倍希釈した血清に加え、37°C で 2 時間 incubate した。これに PCG-HSA 液 0.5 ml を加え、37°C で 1 時間 incubate し、生じた沈降物を i) の方法と同様に測定した。

#### iii) 寒天内沈降反応

OUCHTERLONY<sup>9)</sup> の方法に準じて行なった。和光純薬製のスペシャル寒天末 B 0.8%，塩化ナトリウム 0.85%，アジ化ナトリウム 0.01% を含む寒天ゲル板を用い、中心に直径 1 cm の well を作り、その中に AM-715-HSA 液または PCG-HSA 液を入れた。この外周から間隙を 8 mm とって、同一径の well を作り、ウサギ血清を入れた。37°C で 48 時間 incubate し、沈降線を観察した。

#### iv) PCA 反応

モルモットを recipient として用い、前述と同様に OVARY<sup>5)</sup> の方法に準じて PCA 反応を調べた。

## II. 実験成績

### 1. モルモットを用いた遅延型アレルギー（接触皮膚炎）誘発試験

Table 1 に示したように、AM-715 はアセトン・オリーブ油 (4:1) 混液に溶かし、7 日間毎日モルモットの皮膚に滴下接触させても遅延型アレルギーを起さなかった。再度繰返しても同じ結果であった。DNCB は第 1 回目の試験で 10 匹全例に +~++ の障害が認められ、第 2 回目の繰返し前に 1 匹死亡し、第 2 回の試験でも 9 匹全例に +~++ の障害が認められた。

### 2. モルモットを用いたアナフィラキシー誘発試験

Table 2 に結果をまとめて示した。AM-715 は単独で感作しても、また FCA との混合液で感作しても誘発注射によってアナフィラキシー様反応を認めなかった。OVA と FCA との混合液で感作した群は、誘発注射した 7 匹の全例が 2~3 分以内にショックを起して死亡した。

血清中の抗体の有無を PCA 反応で調べた結果、AM-715 の 3 群いずれにおいても青斑が全く見られず、PCA

反応陰性であった。OVA 群の 3 匹より得た血清は、1,000 倍希釈しても PCA 反応陽性であり、抗体産生が著明であった。

### 3. ウサギにおける薬物-蛋白質結合体による抗体産生試験

#### i) 定量沈降反応

結果は Table 3 および Fig. 2 に示した。PCG-HSA による感作を行なったウサギから得た血清は、PCG-HSA と反応させると沈降反応が認められ、16 倍希釈の PCG-HSA を反応させたときが至適で、最高 8.94 mg/ml の沈降物が得られた。AM-715-BGG による感作では、血清を AM-715-HSA と反応させても沈降反応を起さなかった。

#### ii) 沈降反応阻止試験

Table 4 および Fig. 3 に示したように、PCG-BGG による感作を行なったウサギから得た血清と PCG-HSA との反応系に対し、PCG は沈降反応を阻止したが、この系に対し AM-715 は阻止作用を示さなかった。また、PCG がこの反応を 50% 抑制する濃度は、Fig. 3 にみられるように、ほぼ 1 mM であった。

#### iii) 寒天内沈降反応

結果は Table 5 に示した。PCG-BGG による感作を行なったウサギから得た血清は、中心 well 内に PCG-HSA を入れた場合、いずれも沈降線を形成した。しかし中心 well 内に AM-715-HSA を入れた場合、沈降線は認められなかった。AM-715-BGG による感作を行なったウサギから得た血清は、中心 well 内に AM-715-HSA, PCG-HSA のいずれを入れても沈降線を形成しなかった。

#### iv) PCA 反応

Table 6 に示したように、AM-715-BGG 感作ウサギの血清の 10 倍希釈液をモルモット皮内に投与し、誘発用として AM-715-HSA を用いても、アナフィラキシーは発生しなかった。PCG-BGG 感作ウサギの血清は、1,000 倍希釈しても PCG-HSA による誘発で明らかな PCA 反応陽性を示した。なお、AM-715-BGG 感作血清と PCG-HSA, PCG-BGG 感作血清と AM-715-HSA の組み合わせでは PCA 反応陰性であった。

## III. 考 察

AM-715 と構造類似的な抗菌剤において臨床でみられるアレルギー症状は、皮膚症状が主であるため、最初に遅延型アレルギー (Type IV 型) の接触皮膚炎を惹起するか否か検討した。陽性対照として DNCB を用い、アセトン・オリーブ油混液を基剤にして 7 日間毎日、モルモット背部皮膚に滴下接触させ、9 日間休薬後に再度滴下

**Table 1** Antigenicity test of AM-715 (by method of skin test, delayed hypersensitivity type IV)

Compounds	Dose (mg/day)	No. of animals	Allergy response*									
			After first challenge				After second challenge					
			-	±	+	++	-	±	+	++		
Solvent	0	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
DNCB	2	10 <sup>a)</sup>	0	0	4	6	0	0	2	7		
AM-715	2	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
AM-715	4	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

\*: Scores were judged from the allergy response 24 hr after challenges.

-: negative, ±: thickening, +: pale pink,

++: pink usually very slightly elevated

a): One of them was dead before second challenge.

**Table 2** Type I immune responses in guinea pigs against AM-715 and egg albumin

Immunized solution	Active anaphylaxis (Anaphylactoid reactions)	Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)	Serum dilution rate
	Positives/tested animals	Positives/tested animals	
Saline + FCA	0/10	0/10	×10
AM-715 5mg/kg + FCA	0/10	0/10	×10
AM-715 50mg/kg + FCA	0/10	0/10	×10
Egg albumin 5mg/kg + FCA	7/7 (Dead)	3/3	×1000
AM-715 50mg/kg	0/10	0/10	×10

FCA: Freund's Complete Adjuvant

Challenge solutions were 1% of AM-715 and 1% egg albumin in saline.

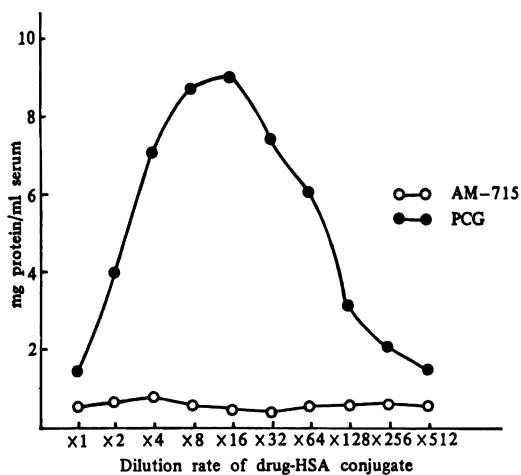
**Table 3** Quantitative precipitation of AM-715-HSA with anti-AM-715-BGG serum or PCG-HSA with anti-PCG-BGG serum

HSA conjugate dilution rate	Anti-PCG-BGG serum	Anti-AM-715-BGG serum
×1*	1.44**	0.52
×2	3.97	0.68
×4	7.03	0.76
×8	8.66	0.53
×16	8.94	0.43
×32	7.34	0.33
×64	6.03	0.52
×128	3.12	0.54
×256	2.08	0.62
×512	1.51	0.57

\*: ×1=0.4% drug-HSA conjugate

\*\* : Total precipitate (mg protein/ml serum)

**Fig. 2** Quantitative precipitation of AM-715-HSA with anti-AM-715-BGG or PCG-HSA conjugate with anti-PCG-BGG sera



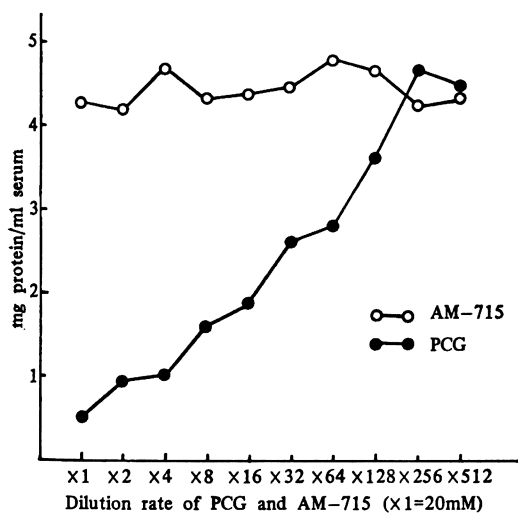
**Table 4** Inhibition of precipitation by PCG or AM-715 on PCG-HSA with anti-PCG-BGG system

PCG or AM-715 dilution	anti-PCG-BGG : PCG-HSA system	
	PCG	AM-715
x1*	0.52**	4.26**
x2	0.96	4.21
x4	1.06	4.68
x8	1.61	4.31
x16	1.89	4.37
x32	2.60	4.47
x64	2.80	4.78
x128	3.64	4.68
x256	4.68	4.26
x512	4.49	4.39

\*: x1=20mM

\*\* : Total precipitate (mg protein/ml serum)

**Fig. 3** Inhibition of precipitation by PCG or AM-715 on PCG-HSA with anti-PCG-BGG system



**Table 5** Agar precipitation of drug-HSA conjugate with anti-serum of rabbits

Immunization	Rabbit No.	Precipitation reaction	
		AM-715-HSA	PCG-HSA
BGG	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
AM-715-BGG	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
PCG-BGG	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
	5	-	+
	6	-	+

**Table 6** Passive cutaneous anaphylaxis of AM-715-HSA or PCG-HSA to anti-AM-715-BGG or PCG-BGG rabbit serum

Immunization	Rabbit No.	Challenge solution			
		AM-715-HSA dilution range	Reaction	PCG-HSA dilution range	Reaction
BGG only	1	× 10	-	× 10	-
	2	× 10	-	× 10	-
	3	× 10	-	× 10	-
	4	× 10	-	× 10	-
AM-715-BGG	1	× 10	-	× 10	-
	2	× 10	-	× 10	-
	3	× 10	-	× 10	-
	4	× 10	-	× 10	-
	5	× 10	-	× 10	-
	6	× 10	-	× 10	-
PCG-BGG	1	× 50	-	× 1000	+
	2	× 50	-	× 1000	+
	3	× 50	-	× 1000	+
	4	× 50	-	× 1000	+
	5	× 50	-	× 1000	+
	6	× 50	-	× 1000	+

接触させたが、AM-715 群はアレルギー症状を示さなかった。この型のアレルギーは感作リンパ球が関与する細胞性免疫とされているが、AM-715 はこの型のアレルギーを惹起するような免疫原性を有さないと考えられた。

AM-715 そのものは、卵白やその他の蛋白質、あるいは多糖類の一部が起しやすい即時型アレルギー (Type I型) は起しにくいと考えられた。また、構造類似の NA ほか抗菌剤についてもショック発生の報告はみられない。しかし、体組織蛋白との結合物が生じる可能性、その結合物による抗体産生の可能性を全く否定することはできなかった。モルモットを用いたアナフィラキシー誘発試験を行なった。その結果、AM-715 は単独で感作しても、また FCA と混合して感作してもアナフィラキシー様反応を惹起せず、抗体産生のみみられないことも PCA 反応によって確認された。従って、AM-715 は、そのもの自身が抗原性を有さないとともに、体組織蛋白との結合物が生じると仮定しても抗体産生を惹起するような性質を持たないと考えられた。

AM-715 は、上述のように hapten 活性を持たないことが示唆されたが、確認のため AM-715-蛋白質結合物による抗体産生試験をウサギを用いて行なった。AM-715 およびその構造類似化合物には、それぞれ HSA との結合性に差があり、AM-715 においては 6.4% という結果が得られており<sup>10)</sup>、NA は約 80%、CINX は約 66%<sup>11)</sup> とされている。しかし、比較的高い結合性を示す NA においても hapten となって抗体産生を起すという報告はみられない。NA と HSA、CINX と HSA の結合は、長谷川ら<sup>12)</sup> によると Sephadex 75 ゲル濾過で NA は約 71%、CINX は約 93% が遊離する程度の弱いものであり、hapten 活性を持たないと考えられる。そこで本研究では、典型的な hapten として知られている PCG を陽性対照薬に選び、AM-715-BGG および PCG-BGG による感作をそれぞれ行なった。感作したウサギの血清について抗体産生の有無を定量沈降反応、沈降反応阻止試験、寒天内沈降反応、PCA 反応で検討したが、AM-715-BGG による感作では AM-715-HSA と特異的に反応する抗体の産生を認めなかった。一方、PCG-BGG による感作では PCG-BGG と特異的に反応する抗体の産生が認められた。

本研究に使用した AM-715-BGG および AM-715-HSA において、AM-715 の結合比は BGG 1 分子に対して 13.6 モル、HSA 1 分子に対して 6.5 モルと算定された。PCG の結合比は、岩田ら<sup>12)</sup> によると HSA 1 分子に対して約 10 モルであり、AM-715 の結合比に近い。しかしながら、PCG は蛋白結合が強固であるゆえ抗体産生に至るものであろう<sup>13)</sup>。AM-715 は、NA や CINX

と同様に、蛋白との結合が弱く、hapten としての活性を持たないと考えられる。

## 文 献

- 1) Physician's Desk Reference. 32nd Ed., Medical Economic Company, pp. 1794, 1978
- 2) 斎藤 篤: 第23回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム。Pipemidic acid, 神戸, 1975
- 3) 三田俊彦: 第24回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム。AB-206, 札幌, 1977
- 4) 熊沢浄一: Cinoxacin の副作用—各種尿路感染症 906例の検討。Chemotherapy 28 (S-4): 368~375, 1980
- 5) OVARY, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. *In* Immunological Methods, Blackwell Scientific Publications, pp. 259~283, 1964
- 6) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 7) KABAT, E. A. & M. M. MAYER: *Experimental Immunology*. 2nd Ed., Charles C. Thomas Publisher, pp. 22~96, 1971
- 8) PAULING, L.; D. PRESSMAN & A. L. GROSSBERG: The serological properties of simple substances. VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polyhaptenic simple substances and for azoproteins. *J. Amer. Chem. Soc.* 66: 784~792, 1944
- 9) OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel method for immunological analysis. *Progr. Allergy* 5: 1~78, 1958
- 10) 嶋田甚五郎: 第28回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウムIII。AM-715, 東京, 1980
- 11) 長谷川隆司, 常盤知宣, 仲吉 洋, 原田 稔: Cinoxacin の免疫学的研究。Chemotherapy 28 (S-4): 516~522, 1980
- 12) 岩田正之, 勝田光夫: Cephadrine に関する免疫学的研究。Chemotherapy 23: 67~76, 1975
- 13) CRIEPL, H.: *Clinical Immunology and Allergy*. 2nd Ed., Grune and Stratton, pp. 148~178, 1969

## THE ANTIGENICITY TESTS OF AM-715

TSUTOMU IRIKURA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

KAZUMI KANDA, YASUYUKI NOMOTO and TSUTOMU SUGIMOTO

Technical Center of Development, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Antigenicity of AM-715, a new synthetic antibacterial agent structurally related to nalidixic acid, was examined.

1. AM-715 elicited no allergy of the delayed hypersensitive type (type IV allergy) on the skin of guinea pigs under the same experimental conditions as 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) clearly elicited this type of allergy.

2. Anaphylactoid reaction to AM-715 was not induced in guinea pigs sensitized with AM-715 alone or with the emulsion of AM-715 and Freund's complete adjuvant (FCA). Any serum of guinea pigs sensitized with AM-715 induced no positive PCA reaction to this drug in recipient guinea pigs.

3. Specific antibody against AM-715 was not detected in the rabbit serum hyperimmunized with AM-715-BGG conjugate and FCA by PCA test, agar-gel and other precipitation tests.

From these results, it was suggested that AM-715 lacks antigenicity and immunogenicity.