

カルバペネム系抗生物質 Imipenem (MK-0787) と Dehydropeptidase-I の特異的阻害剤 Cilastatin sodium (MK-0791) の免疫原性に関する研究

牧 栄二・工藤雅子・吉田 彪

日本メルク萬有株式会社 研究所

Cilastatin sodium (MK-0791) を complete Freund's adjuvant (CFA) とともにモルモットに投与し、免疫動物における能動的全身性アナフィラキシー反応、即時型および遅延型アレルギー皮内反応および同種受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応により cilastatin sodium 単独投与時の免疫原性を検討したが、本剤に免疫原性は認められなかった。

Imipenem (MK-0787) の免疫原性を検討するため、imipenem および各種 β -ラクタム系抗生物質の BGG 結合物を水酸化アルミニウムゲルとともに用いてマウスを免疫した。一次免疫後には penicillin を始め各種 β -ラクタム系抗生物質に対する IgE 型抗体が検出されたが、imipenem に対する抗体は検出されず、二次免疫後に至って比較的低い抗体価の抗 imipenem IgE 型抗体が確認された。更に、imipenem および各種 β -ラクタム系抗生物質の BSA 結合物と CFA の emulsion でウサギを免疫し、重層法による沈降反応、PCA 反応、定量沈降反応、定量沈降ハプテン阻止反応によって検討した。その結果、対照抗生物質に対する抗体の産生は弱い、imipenem に対する沈降抗体ならびに PCA 抗体の産生が確認された。定量沈降ハプテン阻止反応でみると、imipenem は他の抗生物質の抗原抗体系に対しては極めて低い交叉反応性しか示さないことが判明した。

また、imipenem、cilastatin sodium および両薬物の併用で試験管内直接クームス反応を陽性化することはなかった。

以上の所見より総合的に考えると、imipenem の免疫原性は他の β -ラクタム系抗生物質の免疫原性に比し弱いと考えられる。

Imipenem (MK-0787) は新規のカルバペネム系抗生物質で、グラム陰性、グラム陽性両菌に対して強い抗菌力を示すと同時に、広い抗菌スペクトルを有し、 β -lactamase に対して強い抵抗性を示すことが知られている。Cilastatin sodium (MK-0791) は dehydropeptidase-I の特異的な競合的阻害剤で、併用投与すると imipenem のウサギにおける腎障害を阻止し、imipenem の腎における代謝を阻害して尿中濃度を上昇させることが認められている。また、imipenem と cilastatin sodium は臨床使用時には 1:1 の用量比で投与される。

セファロsporin系抗生物質の免疫学的特異性は、その7位のアシル側鎖に強く支配されていることが報告されている^{1),2)}。Imipenem はセファロsporin系抗生物質とは異なり、その免疫学的挙動は未だ明らかでない。加えて、一部の抗生物質ではその免疫学的挙動、特に penicillin との交叉反応性³⁾はその薬剤の安全性評価の上で重要と考えられている。

そこで今回著者らは、cilastatin sodium の免疫原性および imipenem のハプテン性ならびに他の抗生物質との免疫学的交叉反応性、更に両薬物併用時の試験管内ク

ームス反応性を検討したのでその成績について報告する。

I. 実験材料

実験に用いた imipenem および cilastatin sodium は米国 Merck 社で開発され、同社から供与されたものであり、それぞれ Fig. 1 に示す化学構造を有する。比較実験のために用いた抗生物質、担体蛋白、アジュバント、クームス血清、ヒト血液、動物はそれぞれ下記のものを使用した。

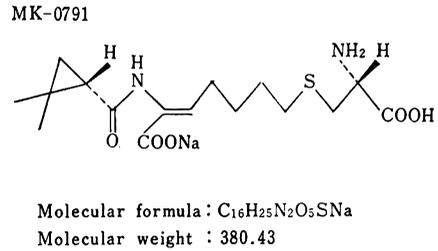
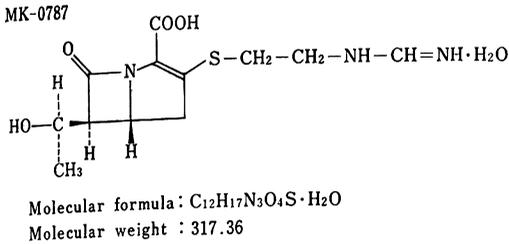
1. 抗生物質

Cephalothin sodium (CET, ケフリン, 塩野義製薬), Cefoxitin sodium (CFX, マーキシソ, 日本メルク萬有), Benzylpenicillin potassium (PcG, 結晶ペニシリン G カリウム「萬有」, 萬有製薬), Ceftizoxime sodium (CZX, エボセリン, 藤沢薬品), Piperacillin sodium (PIPC, ベントシリン, 富山化学), Latamoxef sodium (LMOX, シオマリン, 塩野義製薬), Cefoperazone sodium (CPZ, セフォペラジン, 富山化学)。

2. 担体蛋白およびアジュバント

Bovine γ -globulin (BGG, Miles Laboratories), Bovine serum albumin (BSA, Miles Laboratories), Com-

Fig.1 Chemical structure of imipenem and cilastatin sodium



plete Freund's adjuvant (CFA, ヤトロン), 水酸化アルミニウムゲル (alum, LEVINE らの方法⁷⁾に従って作製)。

3. クームス血清および陽性対照血清

抗ヒトγグロブリン血清 (オルソー社, 東京標準血清社, 国際試薬社の3抗血清を使用), 抗D血清 (オルソー社)。

4. ヒト血液

4名の健常ヒトO型血液(血液凝固阻止剤:ヘパリン)。

5. 動物

マウス (C3H/HeNCrj 系, 雄, 6週齢, 体重 23.4~27.0g, 日本チャールス・リバー), ラット (Sprague Dawley 系, 雄, 5~7週齢, 体重 201~254g, 日本クレア), モルモット (Hartley 系, 雄, 3~5週齢, 体重 296~388g, 静動協), ウサギ (日本白色種, 雄, 24週齢, 体重 2.86~3.42kg, 北山ラベス)。

上記動物は購入後一定条件下(温度 $22 \pm 2^\circ C$, 相対湿度 $55 \pm 10\%$, 照明時間:午前7時~午後7時)で一週間以上検疫したのち実験に供した。

II. 実験方法

1. Cilastatin sodium の免疫原性の検討

1) 免疫方法および血清の採取

Cilastatin sodium と BSA を免疫抗原として使用し, 0.9% 生理食塩水に溶解して下記の濃度の溶液を作製した。

Cilastatin sodium	0.2, 2, 20 mg/ml
BSA	0.2 mg/ml

ただし, cilastatin sodium は全試験を通じて遊離塩基に換算して用いた。次いで, それぞれの溶液と等量の CFA で emulsion を作製し, 1群7匹のモルモットに1匹当たり 1ml を足趾皮下および背部皮下に分割投与した。

2週間後に初回免疫と同じ抗原-CFA の emulsion 1ml を皮下および筋肉内に追加投与した。二次免疫の7日後に全てのモルモットから心臓穿刺により採血し, 分離した血清は使用するまで $-30^\circ C$ で凍結保存した。

2) 能動的皮膚反応

二次免疫後9日目の動物について実施した。Cilastatin sodium および BSA を惹起抗原として使用し, 0.9% 生理食塩液で下記の濃度を作製した。

Cilastatin sodium	0.2, 2, 20 mg/ml
BSA	0.02, 0.2, 2 mg/ml

それぞれの免疫動物に 50 μ l の同種抗原溶液ならびに対照として 0.9% 生理食塩水を除毛した背部に皮内投与した。皮膚反応の観察は皮内注射 3, 24 および 48 時間後に肉眼的に行い, 皮膚反応の程度は次のように評価した。

A. 3時間までの皮膚反応

紅斑もしくは出血を伴う浮腫の直径 (D : mm)

- : $D=0$
- + : $0 < D \leq 5$
- ++ : $5 < D \leq 10$
- +++ : $10 < D$

B. 24 および 48 時間での皮膚反応

発赤の強さ

- : 無反応
- + : 弱い発赤
- ++ : 硬結を伴う明らかな発赤
- +++ : 浮腫, 硬結もしくは壊死を伴う発赤

3) 能動的全身性アナフィラキシー反応

二次免疫後 14 日目の動物について実施した。Cilastatin sodium および BSA を惹起抗原として使用し, それぞれ 1 mg/ml および 0.1 mg/ml の濃度で 0.9% 生理食塩水に溶解した。それぞれの免疫動物に同種抗原溶液の 1 ml を心臓内に注射し, 注射後 15 分間下記のアナフィラキシー症状を観察するために隔離した。

アナフィラキシー症状: 掻鼻, 立毛, 脱力, 呼吸困難, くしゃみ, 吐き気, 痙攣, 虚脱および死亡

それぞれの動物で観察されたこれらの症状の総合評価は次のように行った。

- 0 : 無症状
- I : 1~3 症状 (軽症)

II : 4~6 症状 (中等症)

III : 7 症状以上もしくは死亡 (重症)

4) 3 時間 同種受動的皮膚 アナフィラキシー (PCA) 反応

Cilastatin sodium および BSA を惹起抗原として使用し、それぞれ 4 mg/ml と 2 mg/ml の濃度で 0.9% 生理食塩水に溶解した。それぞれの免疫動物から得た血清 50 μ l を正常モルモットの除毛した背部に皮内注射した。皮内注射 3 時間後、10 mg の Evans blue 色素を含む惹起抗原溶液の 0.5 ml を大腿静脈内に注射した。動物を惹起注射後 30 分で放血致死せしめ、背部皮膚を色素の漏出によって生じた青色斑の大きさを測定するために剝離した。青色斑の長短径の平均値が 5 mm 以上を示すものを陽性とした。皮膚反応が陽性であった場合は、更に 2 倍稀釈系列の稀釈血清を作製し、上述の PCA 試験を行った。明確な陽性反応を示す稀釈血清の最高稀釈倍数をその血清の PCA 価とした。それぞれの血清の PCA 反応は少なくとも 2 匹の正常モルモットを使用して行った。

2. Imipenem-蛋白結合物投与時におけるハプテン性と免疫学的交叉反応性の検討

1) 抗生物質 (ハプテン)-蛋白結合物の調製

LEVINE らの方法⁷⁾に準じて BSA または BGG 100 mg を imipenem, CET, PcG, CFX のそれぞれとモル比 1 : 1,000 で 0.9% 生理食塩水 10 ml に溶解し、1 N NaOH で pH 10.5~11.5 に維持しながら、室温にて 90 分間反応させた。この反応液を初め大量の精製水を外液として、1 晩 4°C にて透析し、以後大量の M/15 リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.0) を用いて、3 日間以上 4°C で透析を行い、未反応の抗生物質を除去した。作製した抗生物質-蛋白結合物は溶液もしくは凍結乾燥標品として 4°C にて使用時まで保存した。全ての抗生物質-蛋白結合物はそれぞれの蛋白含量を micro-Kjeldahl 法にて測定した。作製した抗生物質-蛋白結合物のうち PcG-蛋白結合物について蛋白 1 分子当りの benzylpenicilloyl (BPO) 残基の結合数を penamaldate 法⁸⁾により確認したところ、BSA および BGG 1 分子につきそれぞれ 36 個と 39 個の BPO 残基が結合していた。

2) ハプテン特異的 IgE 型抗体産生について

(1) 免疫方法および血清の採取

免疫は各群それぞれ 10 匹のマウスについて行った。免疫抗原として imipenem-BGG 結合物, CET-BGG 結合物, PcG-BGG 結合物および CFX-BGG 結合物を用い、それぞれ蛋白量として 40 μ g/ml 濃度になるように M/15 PBS に溶解した。これら抗生物質-BGG 結合物溶液を LEVINE らの方法⁷⁾に準じて調製した 16 mg/ml

濃度の alum と 1 : 1(v/v) の割合で混和し、これを抗原溶液として 0.5 ml/animal 宛腹腔内に投与し、免疫を施した。二次免疫は一次免疫の 30 日後にそれぞれ同一抗原の同一用量を同一経路で投与することにより行った。血液は一次免疫後 9, 20, 28 および 37 日目に全群眼窩静脈叢より毛細管にて約 200 μ l ずつ採取し、11,000 rpm, 5 分間遠心して血清を分離した。各群ごとに採取した血清を 50 μ l ずつプールし、実験に使用するまで -30°C にて保存した。

(2) 48 時間 PCA 反応

免疫マウスから得たプール血清を 0.9% 生理食塩水で 2 倍稀釈 プール血清 とし、この稀釈血清について 0.9% 生理食塩水で 2 倍稀釈系列を作り、その 50 μ l を除毛したラット背部の皮内に注射した。48 時間後、10 mg の Evans blue 色素を含む惹起抗原溶液の 0.5 ml を尾静脈内に注射した。惹起抗原溶液は免疫抗原として用いた抗生物質-蛋白結合物の担体蛋白のみが異なる抗生物質 BSA 結合物 2 mg 蛋白/ml の PBS 溶液を用いた。動物を惹起注射後 30 分で放血致死せしめ、背部皮膚を色素の漏出によって生じた青色斑の大きさを測定するために剝離した。青色斑の長短径の平均値が 5 mm 以上を示すものを陽性とし、明確な陽性反応を示す稀釈血清の最高稀釈倍数をそのプール血清の PCA 価 (IgE 型抗体価) とした。それぞれの PCA 反応は少なくとも 2 匹のラットを使用して検討した。

3) ハプテン特異的 IgG 型抗体産生と他の抗生物質との免疫学的交叉反応性について

(1) 免疫方法および抗血清の作製

免疫は各群それぞれ 4 匹のウサギについて行った。免疫抗原として imipenem-BSA 結合物, CET-BSA 結合物, PcG-BSA 結合物および CFX-BSA 結合物を用い、それぞれ蛋白量として 10 mg/ml 濃度となるように 0.9% 生理食塩水に溶解した。これらの抗生物質-BSA 結合物溶液と等量の CFA で emulsion を作製し、これら emulsion を 2 ml/animal 宛週 1 回 6 週間、皮下および筋肉内に分割投与した。血液は初回免疫後 -1, 6, 20, 34 および 49 日目に耳介静脈より採取し、遠心分離後抗血清を得た。分離した抗血清は使用するまで -30°C にて凍結保存した。

(2) 沈降反応 (重層法)

初回免疫の -1, 6, 20, 34 および 49 日目に採取した抗血清について検討した。それぞれの抗血清の 2 倍稀釈液を 4% アラビアゴム溶液で作り、その稀釈抗血清約 100 μ l を十数本の小試験管 (内径 3 mm, 長さ 58 mm) に注入した。次いで、1 mg 蛋白/ml の惹起抗原溶液 (免疫抗原と担体蛋白のみが異なる抗生物質-BGG 結合

Table 1 Active skin reaction in guinea pigs immunized with cilastatin sodium

Immunizing dose (mg/animal, s.c.)	No. of animals	Challenge dose (μ g/site, i.d.)	Active skin reaction after challenge injection											
			3 hr ^{a)}				24 hr ^{b)}				48 hr ^{b)}			
			-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	3	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		10	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		100	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		1000	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
0.1	7	0	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		10	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		100	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		1000	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
1	7	0	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		10	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		100	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		1000	7	0	0	0	4	3	0	0	6	1	0	0
10	7	0	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		10	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		100	7	0	0	0	2	5	0	0	7	0	0	0
		1000	7	0	0	0	0	2	5	0	0	6	1	0

a) In skin reaction at 3 hours :

Diameter of edema with erythema or hemorrhage (D : mm)

- : D = 0

+ : 0 < D \leq 5++ : 5 < D \leq 10

+++ : 10 < D

b) In skin reaction at 24 and 48 hours :

Severity of redness

- : No reaction

+ : Faint redness

++ : Clear redness with induration

+++ : Redness with edema, induration or necrosis

Table 2 Active skin reaction in guinea pigs immunized with BSA

Immunizing dose (μ g/animal, s.c.)	No. of animals	Challenge dose (μ g/site, i.d.)	Active skin reaction after challenge injection											
			3 hr ^{a)}				24 hr ^{b)}				48 hr ^{b)}			
			-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
0	3	0	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		1	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		10	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
		100	3	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
100	7	0	7	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0
		1	0	0	2	5	0	5	2	0	1	4	2	0
		10	0	0	0	7	0	0	3	4	0	0	5	2
		100	0	0	0	7	0	0	0	7	0	0	0	7

a) In skin reaction at 3 hours :

Diameter of edema with erythema or hemorrhage (D : mm)

- : D = 0

+ : 0 < D \leq 5++ : 5 < D \leq 10

+++ : 10 < D

b) In skin reaction at 24 and 48 hours :

Severity of redness

- : No reaction

+ : Faint redness

++ : Clear redness with induration

+++ : Redness with edema, induration or necrosis

物)を原液としてその2倍段階稀釈液を 0.16 M PBS (pH 7.4) で作製し、これらの稀釈抗原溶液を約 100 μ l ずつ各試験管の2倍稀釈抗血清上に静かに重畳した。室温に静置後、30分、1時間および2時間目に境界面での

沈降輪の形成を観察し、記録した。沈降輪の記録は30分で形成された場合卍、1時間後卍、2時間後+とし、無形成を-とした。明確な沈降輪を示す稀釈抗原溶液の最高稀釈濃度の逆数をその抗血清の沈降価とした。

(3) 3時間 PCA 反応

除毛したモルモットの背部皮内に 0.9% 生理食塩水にて 3 倍段階稀釈した各抗血清 (49 日目採取抗血清) および対照の正常ウサギ血清各 50 μ l を注射した。皮内注射 3 時間後に 10 mg の Evans blue 色素を含む惹起抗原溶液の 0.5 ml を大腿静脈内に注射した。惹起抗原溶液は免疫抗原として用いた抗生物質-蛋白結合物の担体蛋白のみが異なる抗生物質-BGG 結合物 2 mg 蛋白/ml の PBS 溶液を用いた。動物を惹起注射 30 分後に放血致死せしめ、背部皮膚を剝離し、毛細血管透過性亢進による漏出色素斑の大きさを測定した。PCA 反応の判定および PCA 価の設定は上述の 48 時間 PCA 反応と同様に行った。それぞれの PCA 反応は少なくとも 2 匹のモルモットを使用して検討した。

(4) 定量沈降反応

1 mg 蛋白/ml の惹起抗原 (免疫抗原と担体蛋白のみが異なる抗原物質-BGG 結合物) 溶液を 0.16 M PBS で 2 倍段階稀釈し、その 0.5 ml を 0.9% 生理食塩水で 2 倍稀釈した抗血清 (49 日目採取抗血清) 0.5 ml に加え、37°C、2 時間インキュベートし、更に 4°C で 48 時間静置した。その後、遠心沈澱により得た沈澱を水冷した PBS で 3 回以上洗浄し、沈澱物中の蛋白含量を BGG を標準物質として Lowry 法⁹⁾に従って測定した。

(5) 定量沈降ハプテン阻止反応

上述の定量沈降反応において得られた反応曲線からそれぞれの 2 倍稀釈抗血清に対して沈降蛋白量の吸光度を 0.5 とする惹起抗原 (抗生物質-BGG 結合物) の使用量を決定した。次いで、0.16 M PBS で 200 mM の抗生

物質溶液を作製し、この溶液を原液として 0.25 ml ずつの 2 倍段階稀釈系列を作り、その稀釈系列に抗血清 0.25 ml を加え、37°C、2 時間インキュベートした。インキュベーション後それぞれの抗血清に対する至適抗原量を含む抗原溶液 0.5 ml を加え、以後定量沈降反応と同様の方法で沈降蛋白量を測定した。各抗体に対する抗生物質相互の交叉反応性の程度を比較するために、沈降反応を 50% 阻止するために要する各抗生物質の mM 数を各抗生物質を加えた際に得られた沈降反応曲線から求めた。

4) 試験管内直接クームス試験

本試験は GRALNICK らの方法¹⁰⁾に従って行った。ヘパリン処理ヒト O 型血液を 2,500 rpm にて 15 分間遠心分離した。血球を 0.16 M PBS で 3 回遠心洗浄し、0.16 M PBS で 2% 血球浮遊液とした。その 1 ml に 0.9% 生理食塩水に溶解した種々の濃度の imipenem, cilastatin sodium および両薬物の混合溶液各 1 ml を加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、0.16 M PBS で 3 回遠心洗浄を行い、再度 0.16 M PBS で 2% 血球浮遊液とした。その血球浮遊液 0.5 ml に先に全血より分離した血漿 0.5 ml を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、血球を 0.16 M PBS で 4 回遠心洗浄し、0.16 M PBS で 2% 血球浮遊液とした。この浮遊液 2 滴にクームス血清 2 滴を加え、混和後直ちに 1,000 rpm にて 1 分間遠心し、試験管を軽く振りながら血球凝集の有無を肉眼的に観察した。判定は薬液の代りに 0.9% 生理食塩水を用いて同様の操作を行った陰性対照と比較して明らかに凝集を認めたものをクーム

Table 3 Active systemic anaphylaxis (ASA) reactions in guinea pigs immunized with either cilastatin sodium or BSA

Immunizing antigen		No. of animals	ASA reactions					
Compound	Dose (mg/animal, s.c.)		Challenge antigen		General evaluation of symptoms			
			Compound	Dose (mg/animal, i.cardi.)	0	I	II	III
		3	Saline	1 ml/animal	3	0	0	0
Cilastatin sodium	0.1	7	Cilastatin	1	7	0	0	0
	1	7	sodium	1	7	0	0	0
	10	7		1	7	0	0	0
BSA	0.1	7	BSA	0.1	0	0	1	6

Symptom : A; licking or rubbing nose, B; ruffling fur, C; weakness or diminished tone, D; dyspnea, E; sneezing or coughing, F; retching, G; convulsion, H; prostration, and I; death

General evaluation of symptoms observed in each animal is as follows :

0 : asymptom

I : one to 3 symptoms (a mild case)

II : four to 6 symptoms (a moderate case)

III : more than 7 symptoms or death (a serious case)

Table 4 Detection of specific IgG-type antibodies in sera of guinea pigs immunized with either cilastatin sodium or BSA

Immunizing antigen		Challenge antigen		Mean PCA titers ¹⁾
Compound	Dose (mg/animal, s.c.)	Compound	Dose (mg/animal, i.v.)	
Cilastatin sodium	0.1	Cilastatin sodium	2	< 1
	1	Cilastatin sodium	2	< 1
	10	Cilastatin sodium	2	< 1
BSA	0.1	BSA	1	4.096

1) The figure indicates mean PCA titer of 7 sera.

PCA titer : Reciprocal of the highest serum dilution giving a positive skin reaction in 3 hr-homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA).

Table 5 Forty-eight hour-passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in rats with pooled sera of immunized mice

Immunizing antigen (Conjugate)	Challenge antigen (Conjugate)	PCA titer ^{a)}				
		Day after primary immunization				
		-1	9	20	28	37 ^{b)}
Imipenem-BGG	Imipenem-BSA	<2	<2	<2	<2	4
CET-BGG	CET-BSA	<2	8	16	16	16
PcG-BGG	PcG-BSA	<2	128	64	32	64
CFX-BGG	CFX-BSA	<2	64	64	64	128

a) PCA titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum given positive reaction.

b) Seven days after the secondary immunization

Fifty μ l of serum of each immunized mouse was pooled in each group.

ス反応陽性とした。陽性対照としては抗D血清を用い、その10倍生理食塩水稀釈液を上述の血漿の代りに薬物無処置2%血球浮遊液に加え、以下同様の操作を行いクームス反応を誘発した。

III. 実験成績

1. Cilastatin sodium の免疫原性の検討

1) 能動的皮膚反応

Cilastatin sodium ならびに BSA で免疫したモルモットにおける能動的皮膚反応の成績は Table 1 および 2 に示すごとくである。

Cilastatin sodium の 0.1, 1 および 10 mg/animal で免疫した動物に cilastatin sodium を皮内注射し、皮膚反応を惹起させたが惹起注射3時間後の皮膚反応においては何ら変化を認めなかった。しかし、惹起注射24時間後に発赤と硬結を伴った弱い皮膚反応が cilastatin sodium の 10 mg/animal で免疫した動物の7匹中5匹に認められた。この反応は24時間目の方が48時間目よりも顕著であった。

BSA で免疫したモルモットは全て著明な浮腫、出血および壊死から成る典型的な Arthus 反応を示した。

2) 能動的全身性アナフィラキシー反応 (Table 3)

Cilastatin sodium の3用量で免疫した動物のいずれも cilastatin sodium の心臓内注射によって全身性アナフィラキシー反応を示さなかった。

BSA で免疫した7匹のモルモットは全て BSA の心臓内注射後直ちに著明な全身性アナフィラキシー反応を示した。

3) 3時間同種 PCA 反応 (Table 4)

Cilastatin sodium で免疫したモルモットから採取した血清は惹起抗原としての cilastatin sodium の投与に対して何ら有意な PCA 反応を示さなかった。

BSA で免疫したモルモットから得た血清は BSA で反応惹起を行った際著明な PCA 反応を生じ、その平均 PCA 価は 4,096 であった。

2. Imipenem-蛋白結合物投与時におけるハプテン性と免疫学的交叉反応性の検討

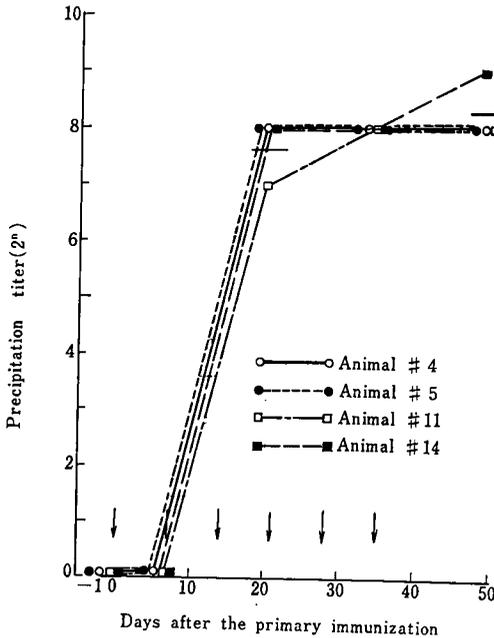
1) ハプテン特異的 IgE 型抗体産生について

(1) 免疫後の各時期における IgE 型抗体価 (PCA 価)

Imipenem-BGG 結合物, CET-BGG 結合物, PcG-BGG 結合物および CFX-BGG 結合物で免疫したマウスから一次免疫後 9, 20, 28 および 37 日目に採血して得

Fig. 2 The time course of imipenem-specific antibody production in rabbits immunized with imipenem-BSA conjugate

Arrows indicate immunization with homologous antigen. Horizontal bars indicate the mean titer. Challenge antigen: Imipenem-BGG conjugate



た血清の抗 imipenem, 抗 CET, 抗 PcG, 抗 CFX IgE 型抗体価 (PCA 価) は Table 5 に示すごとくである。

抗 imipenem 抗体は一次免疫後の各時期において全く検出されなかったが, 二次免疫後 7 日目において検出された。しかし, その PCA 価は 4 という低い値であった。

抗 CET 抗体は一次免疫後 20 日まで低値ではあるが漸次増加し, PCA 価 16 を示した。しかし, 以後 PCA 価の上昇は認められず, また二次免疫刺激に対しても応答せず, PCA 価は変動しなかった。

抗 PcG 抗体は一次免疫後 9 日目に PCA 価 128 を示し, 以後漸次低下した。二次免疫刺激によって PCA 価は上昇し, PCA 価 64 を示した。

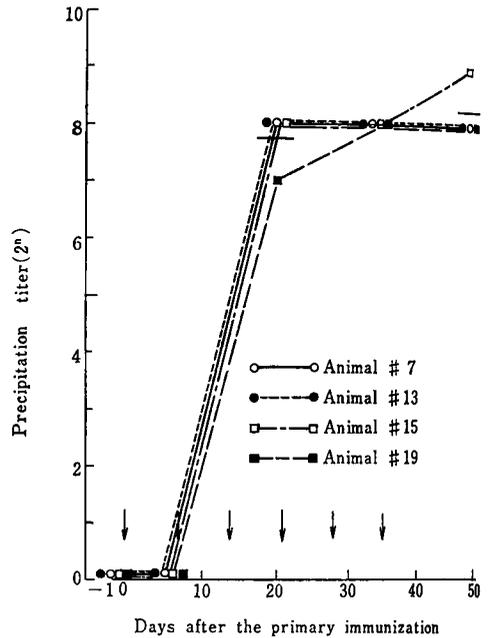
抗 CFX 抗体は一次免疫後 9 日目において既に検出され, 以後 28 日目まで同程度の抗体価を持続した。二次免疫刺激に対して著明な応答を示し, 二次免疫後 7 日目の PCA 価は 128 であった。

2) ハプテン特異的 IgG 型抗体産生と他の抗生物質との免疫学的交叉反応性について

(1) ハプテン特異的 IgG 型抗体産生の推移 (重層法による沈降反応)

Fig. 3 The time course of CET-specific antibody production in rabbits immunized with CET-BSA conjugate

Arrows indicate immunization with homologous antigen. Horizontal bars indicate the mean titer. Challenge antigen: CET-BGG conjugate



Imipenem-BSA 結合物, CET-BSA 結合物, PcG-BSA 結合物および CFX-BSA 結合物で免疫したウサギにおけるそれぞれの免疫抗原に対する特異的 IgG 型抗体産生の経時的推移を同種抗生物質-BGG 結合物に対する沈降反応によって検討した。その成績を Fig. 2~5 に示す。

いずれの動物も一次免疫後 20 日目 (三次免疫後 6 日目) に採血して得た血清にそれぞれの抗生物質に対する特異抗体の存在が認められた。

Imipenem-BSA 結合物と CET-BSA 結合物による抗 imipenem 抗体と抗 CET 抗体の産生は類似した推移を示し, 最終免疫後 14 日目の抗血清の平均沈降価はいずれも 320 であった。

抗 PcG および抗 CFX 抗体の産生はそれぞれ五次および六次免疫でプラトーに達し, 最終免疫後 14 日目の抗血清の平均沈降価はそれぞれ 512 と 768 であった。

(2) 最終免疫後 14 日目の抗血清のハプテン特異的 IgG 型抗体価 (PCA 価)

最終免疫後 14 日目の抗血清を同種抗生物質-BGG 結合物に対する PCA 反応によって検討したところ,

Fig. 4 The time course of PcG-specific antibody production in rabbits immunized with PcG-BSA conjugate

Arrows indicate immunization with homologous antigen. Horizontal bars indicate the mean titer. Challenge antigen: PcG-BGG conjugate

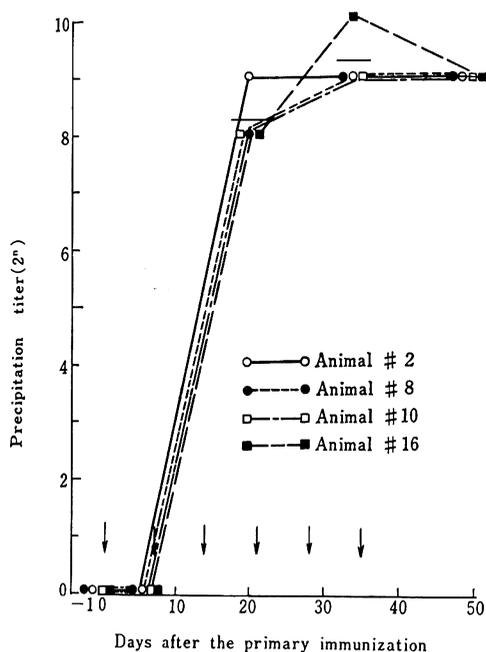


Table 6 に示すごとく、それぞれの抗血清の PCA 価は *in vitro* での沈降価と類似した成績を示し、それぞれの抗血清の平均 PCA 価は CFX > PcG > CET > imipenem の順に高い値を示した。

(3) 他の抗生物質との免疫学的交叉反応性

各抗生物質間の交叉反応性を検討するために求めた最終免疫後 14 日目に採取した各抗抗生物質-BSA 抗血清と同種抗生物質-BGG 結合物の定量沈降反応曲線を

Fig. 5 The time course of CFX-specific antibody production in rabbits immunized with CFX-BSA conjugate

Arrows indicate immunization with homologous antigen. Horizontal bars indicate the mean titer. Challenge antigen: CFX-BGG conjugate

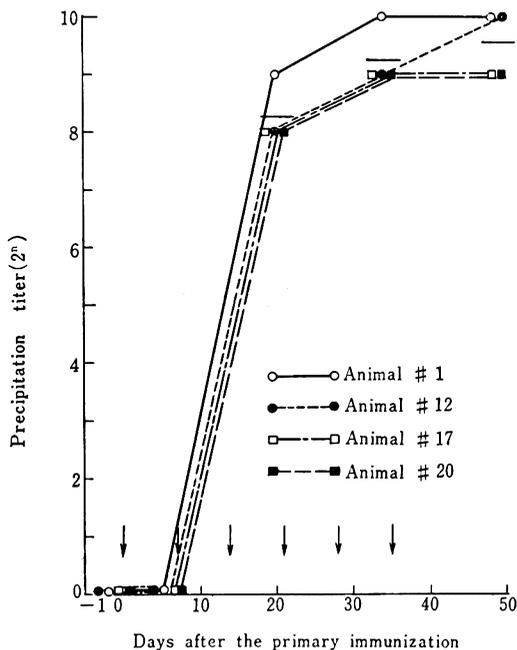


Fig. 6~9 に示す。

いずれの抗血清もそれぞれの homologous な抗原との間に著明な抗原抗体反応を示し、各抗血清とも各群ごとに類似した定量沈降反応曲線を示した。Imipenem に対する抗血清の沈降反応曲線は CET, PcG および CFX に対する抗血清の沈降反応曲線に比べて低く、抗原との弱い反応性が示された。また、各抗血清の沈降蛋白の吸光度を 0.5 とする homologous 抗原の蛋白濃度は im-

Table 6 Three hour-passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs with the sera of immunized rabbits

Immunizing antigen (Conjugate)	Challenge antigen (Conjugate)	No. of sera ^{a)}	PCA titers ^{b)}	Mean PCA titer
Imipenem-BSA	Imipenem-BGG	4	3 ⁷ , 3 ⁷ , 3 ⁷ , 3 ⁷	3 ⁷
CET-BSA	CET-BGG	4	3 ⁷ , 3 ⁸ , 3 ⁸ , 3 ⁸	3 ^{7.75}
PcG-BSA	PcG-BGG	4	3 ⁸ , 3 ⁸ , 3 ⁹ , 3 ⁹	3 ^{8.5}
CFX-BSA	CFX-BGG	4	3 ⁹ , 3 ⁹ , 3 ⁹ , 3 ¹⁰	3 ^{9.25}

a) Sera tested were obtained at 14 days after the last immunization from rabbits immunized 6 times at a 7 day interval.

b) PCA titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of sera given positive reaction.

Fig. 6 Precipitation reaction of imipenem-BGG conjugate to sera of rabbits immunized with imipenem-BSA conjugate

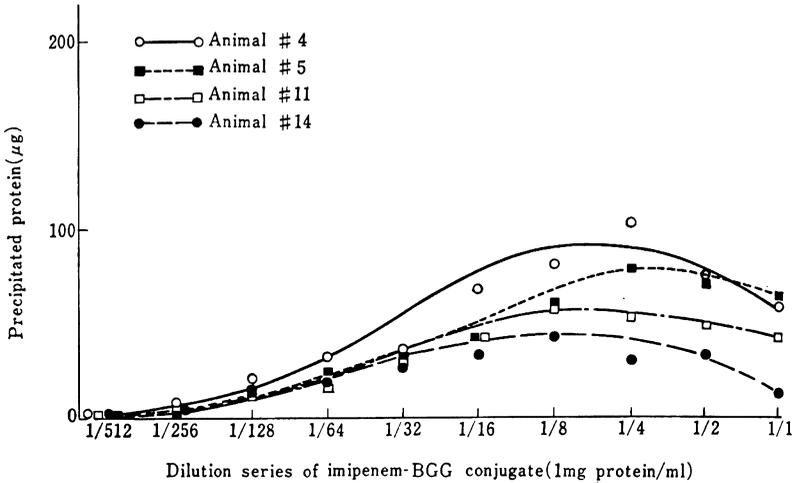
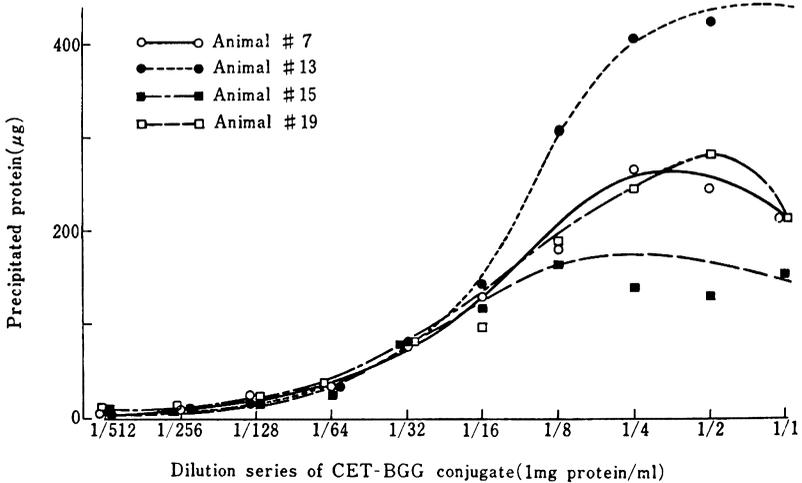


Fig. 7 Precipitation reaction of CET-BGG conjugate to sera of rabbits immunized with CET-BSA conjugate



ipenem-BGG 結合物 125.0~250.0 μg/ml (ただし, 4 抗血清中 3 抗血清は抗原の最大沈降誘発量においても吸光度が 0.5 に達しなかったため最大沈降誘発量を抗原量として使用), CET-BGG 結合物 37.0~40.0 μg/ml, PcG-BGG 結合物 20.0~26.3 μg/ml, CFX-BGG 結合物 20.8~28.6 μg/ml であった。

このような抗抗生物質-BSA 抗血清と抗生物質-BGG 結合物の定量沈降反応を 50% 阻止するために必要なハプテン量は Table 7 に示すごとくである。

抗 imipenem-BSA 抗血清と imipenem-BGG 結合物の沈降反応 (imipenem 抗原抗体系) を 50% 阻止する

ハプテン量は imipenem が 1.1 mM で最も強い阻止能を有し, これに比し CET および CFX はそれぞれ 36.2 倍と 41.5 倍, PcG においては 76 倍の量を要した。

CET 抗原抗体系では CET が強い阻止能 (9.2 mM) を示したが, PcG および CFX もそれぞれ CET の 2.7 倍と 5.0 倍の量にて 50% 阻止を示した。Imipenem は試験に使用した最高濃度の 200 mM においても 50% 阻止量を求めることが出来なかった。

PcG 抗原抗体系における各ハプテンの阻止能は PcG が最も強く, これに比較して CET は 5.0 倍, CFX は 9.0 倍以上で 50% 阻止を示した。Imipenem の 50%

Fig. 8 Precipitation reaction of PcG-BGG conjugate to sera of rabbits immunized with PcG-BSA conjugate

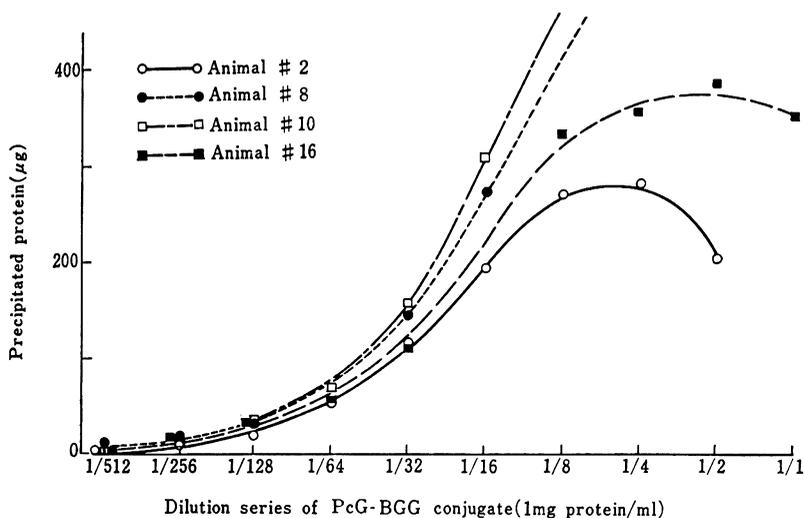
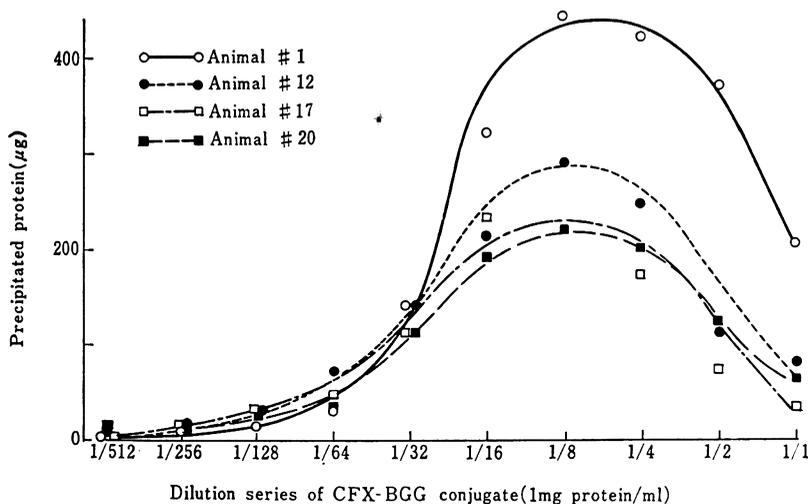


Fig. 9 Precipitation reaction of CFX-BGG conjugate to sera of rabbits immunized with CFX-BSA conjugate



阻止量は 200 mM 以上であった。

CFX 抗原抗体系では CFX が 20.5 mM で 50% 阻止を示し、CET は CFX の 2.7 倍量を要した。Imipenem と PcG はいずれも最高濃度の 200 mM においても 50% 阻止量を求めることが出来なかった。

また、抗 imipenem-BSA 抗血清と抗 CET-BSA 抗血清のそれぞれのプール抗血清について imipenem, CET, CPZ, CZX, LMOX, PIPC をハプテンとして使用し、定量沈降ハプテン阻止反応を行った。これらハプテンの imipenem および CET 抗原抗体系に対する

50% 阻止能は Table 8 に示すごとくである。

Imipenem 抗原抗体系を 50% 阻止するハプテン量は、imipenem が 1.3 mM で最も強い阻止能を有し、これに比較して CET, LMOX, CPZ, PIPC および CZX はそれぞれ 65 倍, 66.9 倍, 72.9 倍, 102.6 倍および 138.5 倍以上の大量を要した。

CET 抗原抗体系における各ハプテンの 50% 阻止能は CET が 11.8 mM と最も強く、他のハプテンは全て最高使用濃度の 200 mM においても 50% 阻止能を示すことが出来なかった。

Table 7 Hapten concentrations required for 50% inhibition of quantitative precipitation reaction of hapten-BGG conjugates with anti-hapten-BSA antisera

Antigen-Antibody System	No. of sera	Hapten(mM)			
		Imipenem	CET	PcG	CFX
Imipenem-BGG, Anti-imipenem-BSA antiserum	4	1.1±0.5 ^{a)}	39.8±9.1	137.4±35.4	45.7±9.9
CET-BGG, Anti-CET-BSA antiserum	4	>200	9.2±3.9	24.8±9.5	46.4±10.6
PcG-BGG, Anti-PcG-BSA antiserum	4	≥200	96.2±25.4	19.1±5.2	>171.3±28.7
CFX-BGG, Anti-CFX-BSA antiserum	4	>200	55.2±9.4	>200	20.5±4.9

a) The mean ± S.E.

Antisera used were obtained at 14 days after the last immunization from rabbits immunized 6 times at a 7 days interval.

Table 8 Hapten concentrations required for 50% inhibition of quantitative precipitation reaction of hapten-BGG conjugates with anti-hapten-BSA antisera

Antigen-Antibody System	Hapten(mM)					
	Imipenem	CET	CPZ	CZX	LMOX	PIPC
Imipenem-BGG, Anti-imipenem-BSA antiserum ¹⁾	1.3	84.5	94.8	>180.0	87.0	133.4
CET-BGG, Anti-CET-BSA antiserum	>200	11.8	>200	>200	>200	>200

a) Pooled anti-hapten-BSA antisera were used.

3) 試験管内直接クームス試験

Imipenem の 10 mg/ml 以下の濃度で処置した血球はクームス血清と陽性反応を示さなかった。20 mg/ml の imipenem で処置した血球の大部分は被験血球の違いに関係なく血漿とのインキュベーション後の洗浄操作中に溶血を生じたため 20 mg/ml 濃度でのクームス反応の成績は得られなかった (Table 9)。Cilastatin sodium および imipenem と cilastatin sodium の併用で処置した血球は本試験に用いた濃度範囲内で陽性反応を示さなかった (Table 10, 11)。

抗D血清で処置した血球は全てのクームス血清と陽性反応を示した。

IV. 考 察

Imipenem の免疫原性に関しては野村総合研究所の長谷川らが imipenem と CFA で免疫したモルモットにおいて、imipenem 単独では能動的全身性アナフィラキシー反応を惹起しえなかったが、imipenem-BGG 結合物では陽性反応を認め、また免疫動物から採血して得た血清の PCA 反応においても同様の成績を得ている (未発表)。

そこで今回われわれは imipenem と cilastatin sodium の免疫学的挙動の一端として、cilastatin sodium の免疫原性および imipenem のハプテン性ならびに他の抗生物質との免疫学的交叉反応性を検討し、更に両薬物併用時の試験管内クームス試験を実施した。

Cilastatin sodium を CFA とともに投与してモルモッ

トを免疫し、cilastatin sodium に対する特異的 IgG 型抗体が産生されるか否かについて検討し、加えて、同じ免疫動物において遅延型皮膚反応が発生するかを検討した。

Cilastatin sodium で免疫したモルモットにおいて cilastatin sodium で反応惹起を行っても全身性アナフィラキシー反応は誘発されなかった。しかし、cilastatin sodium を皮下注射すると惹起注射 24 および 48 時間後に高濃度注射部位に発赤ならびに硬結を伴う弱い皮膚反応が観察された。この反応は 3 時間目で検出されなかったことより、Arthus 型反応よりむしろ遅延型皮膚反応に近いと考えられる。しかしながら、Laboratorium für Pharmakologie und Toxikologie の LEUSCHNER らが高濃度の cilastatin sodium を用いて遅延型アレルギー惹起能を見る maximization test において cilastatin sodium に免疫原性を認めていない (未発表) ことより、今回見られた反応の生物学的意義は明らかではない。臨床において cilastatin sodium は今回用いた CFA のようなアジュバントを用いることなく投与されることから、cilastatin sodium が実際の使用において遅延型アレルギーの免疫原として働くことはほとんどないと考えられる。また、cilastatin sodium で免疫した動物の血清を用いた PCA 反応においても cilastatin sodium に対する IgG 型抗体は検出されなかった。

これらのことより、cilastatin sodium は液性免疫ならびに細胞性免疫の免疫原として働くことはほとんどない

Table 9 Direct Coombs' reactions with human red blood cells treated with imipenem

Drug concentration (mg/ml)	Subject	Anti- γ -globulin serum		
		Ortho Diagnostics Inc.	Tokyo Standard Serum Ltd.	International Reagents Co.
Vehicle (0.9% Saline)	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
0.625	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
1.25	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
2.5	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
5.0	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
10.0	A	—	—	—
	B	—	—	—
	C	—	—	—
	D	—	—	—
20.0	A	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND
Anti-D serum (20X)	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	+	+	+
	D	+	+	+

Subjects : A=T.H., male 32 yr., B=S.I., male 40 yr.,

C=K.S., female 21 yr., and D=T.M., female 18 yr.

Reactions : —=negative, ±=slightly positive, and +=positive.

ND : not determined

と言える。

IgE 型抗体産生については比較的少量のハプテン-蛋白結合物を alum とともにマウス腹腔内に投与することにより、ヒト IgE 型抗体産生に類似したパターンが誘導出来ることが LEVINE ら⁷⁾をはじめ多くの研究者によって報告されており、荻田ら¹¹⁾はこのような動物モデルが薬物の抗原性試験、特に IgE 型抗体産生の検討のために有用であると推奨している。

本研究においては近交系マウスとして BGG に対して

免疫学的感受性の高い C3H/He 系マウスを用い、ハプテン-蛋白結合物はいずれも LEVINE らの方法⁷⁾に準拠して、アルカリ条件下で BGG と結合させたものを免疫抗原として用いた。IgE 型抗体価の測定は、マウスの IgE 型抗体が IgG₁ 型抗体と異なりラットの皮膚に感作能を有し、マウス抗血清の PCA 反応にラットを用いた場合には IgE 型抗体のみが反応に関与しているという MOTA ら¹²⁾の報告に従って、48 時間ラット PCA 反応によりハプテン-BSA 結合物を誘発抗原として行った。

Table 10 Direct Coombs' reactions with human red blood cells treated with cilastatin sodium

Drug concentration (mg/ml)	Subject	Anti- γ -globulin serum		
		Ortho Diagnostics Inc.	Tokyo Standard Serum Ltd.	International Reagents Co.
Vehicle (0.9% Saline)	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
0.625	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
1.25	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
2.5	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
10.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
20.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
Anti-D serum (20X)	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	+	+	+
	D	+	+	+

Subjects : A=T.H., male 32 yr., B=S.I., male 40 yr.,

C=K.S., female 21 yr., and D=T.M., female 18 yr.

Reactions : - =negative, \pm =slightly positive, and + =positive.

蛋白量として 10 μ g の imipenem-BGG 結合物でマウスを免疫したところ、一次免疫においては抗 imipenem IgE 型抗体は全く検出されず、二次免疫後はじめて抗 imipenem IgE 型抗体の産生が認められた。IgE 型抗体産生の程度を対照に用いた CET-BGG 結合物、PcG-BGG 結合物および CFX-BGG 結合物免疫の場合と比較すると、これら対照の抗生物質-BGG 結合物で免疫したマウスは一次免疫において既にそれぞれの抗生物質に対する IgE 型抗体を産生し、二次免疫によって抗 CFX,

抗 PcG 抗体は PCA 価の上昇を示した。

以上のように、imipenem を蛋白と結合した形でアジュバントとともにマウスに投与して免疫した時、抗 imipenem-IgE 型抗体の産生が認められたが、その免疫応答は他の抗生物質の場合に比べて弱いものであった。この弱い免疫応答の原因が imipenem の蛋白との結合性に起因するものなのか、あるいは蛋白に結合した imipenem が抗原として認識される際の強さに起因するものは現在のところ不明である。

Table 11 Direct Coombs' reactions with human red blood cells treated with imipenem/cilastatin sodium in combination

Drug concentration (mg/ml)	Subject	Anti- γ -globulin serum		
		Ortho Diagnostics Inc.	Tokyo Standard Serum Ltd.	International Reagents Co.
Vehicle (0.9% Saline)	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
0.625/0.625	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
1.25/1.25	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
2.5/2.5	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.0/5.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
10.0/10.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
20.0/20.0	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
Anti-D serum (20X)	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	+	+	+
	D	+	+	+

Subjects : A=T.H., male 32 yr., B=S.I., male 40 yr.,

C=K.S., female 21 yr., and D=T.M., female 18 yr.

Reactions : - =negative, \pm =slightly positive, and + =positive.

Imipenem と他の抗生物質との免疫学的交叉反応性の検索において LEVINE らの方法⁷⁾ に準拠して作製したハプテン-BSA 結合物でウサギを免疫し、その血清を用いて重層法による沈降反応およびモルモットにおける PCA 反応によりそれぞれの抗生物質に対する特異的 IgG 型抗体の存在を検討したところ、imipenem の IgG 型抗体産生の経時的推移は他の抗生物質の IgG 型抗体産生の経時的推移とほぼ同様であった。しかし、産生されたそれぞれの抗生物質に対する IgG 型抗体の抗体価は

異なっており、それぞれの抗血清の平均抗体価の程度は沈降反応あるいは PCA 反応のいずれにおいても CFX > PcG > CET > imipenem の順に高い値を示した。そこで、最終免疫後 14 日目に採取した抗血清を用いてそれぞれの抗生物質の免疫学的交叉反応性を検討したところ、imipenem 抗原抗体系における定量沈降ハプテン阻止反応で CET, CFX および CPZ は imipenem に比し弱い阻止能を示し、LMOX, PIPC, PcG および CZX は更に弱い阻止能を示した。CET, PcG および CFX 抗原

抗体系における定量沈降ハプテン阻止反応でそれぞれの抗生物質はある程度強い阻止反応 (homologous に比し 1/2.7~1/9.0, ただし PcG の CFX 抗原抗体系に対する阻止反応は極めて弱い) を示すのに対して, imipenem はほとんど阻止能を示さなかった。従って, imipenem は今回対照に使用した抗生物質との間に強い交叉反応性を持たないことが示唆された。

これらのことより, imipenem は弱い免疫原性を有し, 一度出来た抗体は高い特異性を持ち, ペニシリンならびにセファロsporin系化合物とは交叉アレルギーを起し難いカルバペネム系化合物であると考えられる。

ペニシリンおよびセファロsporin系抗生物質の大量投与はクームス反応陽性化を伴う溶血性貧血を治療患者に誘発させることが報告されている^{10), 13)~16)}。それ故に, 薬物起因性自己免疫性溶血性貧血の発生を推察するために通常実施されている試験管内直接クームス試験を imipenem ならびに cilastatin sodium について行った。その結果, 市販されている3社のクームス血清は種々の濃度の imipenem, cilastatin sodium および両薬物併用で処置した4名の健常人の血球に対してクームス反応を陽性化することはなかった。従って, imipenem および cilastatin sodium の併用使用は通常の臨床使用量において赤血球膜に対して何ら変化を及ぼさないものと考えられる。

文 献

- 1) MINE, Y.; M. NISHIDA, S. GOTO & S. KUWAHARA: Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic. IV Antigenicity of cefazolin and its cross-reactivity with benzylpenicillin, ampicillin and cephaloridine. *J. Antibiot.* 23: 195~203, 1970
- 2) SHIBATA, K.; T. ATUMI, Y. HORIUCHI & K. MASHIMO: Immunological cross-reactivity of cephalothin and its related compounds with benzylpenicillin. *Nature* 212: 419~420, 1966
- 3) BATCHELOR, F. R.; J. M. DEWDNEY, R. D. WESTON & A. W. WHEELER: The immunogenicity of cephalosporin derivatives and their cross-reaction with penicillin. *Immunology* 10: 21~33, 1966
- 4) HARVEY, R. G. & H. M. MARY: Immune cross-reactivity of penicillin and cephalothin. *Nature* 216: 1026~1027, 1967

- 5) GRIECO, M. H.: Cross-allergenicity of the penicillins and the cephalosporins. *Arch. Intern. Med.* 119: 141~146, 1967
- 6) ABRAHAM, G. N.; L. D. PETZ & H. H. FUDENBERG: Immunohematological cross-allergenicity between penicillin and cephalothin in humans. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 343~357, 1968
- 7) LEVINE, B. B. & N. M. VAZ: Effect of combination of inbred strain, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. *Int. Arch. Allergy* 39: 156~171, 1970
- 8) LEVINE, B. B. & Z. OVARY: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. *J. Exp. Med.* 114: 875~904, 1961
- 9) LOWRY, O. H.; H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275, 1951
- 10) GRALNICK, H. R.; L. D. WRIGHT & M. H. MCGINNIS: Coombs' positive reactions associated with sodium cephalothin therapy. *JAMA* 199: 725~726, 1967
- 11) 荻田忠厚, 水島裕: 薬物の抗原性の検討—とくにIgE型抗体産生のための動物モデルについて。医学のあゆみ 100: 812~814, 1977
- 12) MOTA, I & D. WONG: Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Science* 8: 813~820, 1969
- 13) LAI, M.; F. ROSNER & N. D. RITZ: Hemolytic anemia due to antibodies to penicillin. *JAMA* 198: 483~484, 1966
- 14) PETZ, L. D. & H. FUDENBERG: Coombs-positive hemolytic anemia caused by penicillin administration. *N. Engl. J. Med.* 274: 171~178, 1966
- 15) MOLTHAN, L.; M. M. REIDENBERG & M. F. EICHMAN: Positive direct Coombs test due to cephalothin. *N. Engl. J. Med.* 277: 123~125, 1967
- 16) YORK, P. S. & R. LANDES: Coombs positive reactions associated with cephaloridine therapy. *JAMA* 206: 1086, 1968

STUDIES ON IMMUNOGENICITY OF IMPENEM, A CARBAPENEM,
AND CILASTATIN SODIUM, A SPECIFIC COMPETITIVE
INHIBITOR OF DEHYDROPEPTIDASE-I

EIJI MAKI, MASAKO KUDO and TAKESHI YOSHIDA
Research Laboratories, Nippon Merck-Banyu Co., Ltd.

Immunogenicity of imipenem (MK-0787) and cilastatin sodium (MK-0791) was investigated using various assays for *in vivo* and *in vitro* immunological reactions. No systemic anaphylactic reaction was induced by injection of cilastatin sodium in animals immunized with this compound. In PCA assay using immune sera, no IgG-type antibody directed against cilastatin sodium was detected. Weak skin reactions with slight redness and induration was observed at 24 and 48 hours after the cutaneous challenge of high concentrations of this compound.

IgE-type antibody production was induced by the immunization of C3H/He mice with the intraperitoneal injection of antibiotic-BGG conjugates together with Al(OH)₃ gel. Although BGG conjugates of various β -lactam antibiotics have induced high titers of IgE-type antibodies, no detectable antibody against imipenem was induced after the primary immunization with the compound. A low titer of IgE-type antibody against this compound was detected only after the booster immunization. Immunogenicity of imipenem and other antibiotics was further investigated by ring precipitin reaction, PCA reaction, and quantitative precipitation reaction, using sera from rabbits immunized with antibiotic-BSA conjugates in complete Freund's adjuvant. The precipitating and skin-sensitizing antibodies were produced against imipenem as well as other antibiotics, although the titers for imipenem were significantly lower than those for other antibiotics. In hapten inhibition assay, the cross reactivity of imipenem against antigen-antibody reactions with other antibiotics was very low, while significant cross reactivity was detected among several β -lactam antibiotics tested. In the *in vitro* direct Coombs' test, imipenem, cilastatin sodium and imipenem/cilastatin sodium in combination have not induced any positive reaction.

It is, therefore, concluded that the immunogenicity of either imipenem or cilastatin sodium is relatively weak when compared to those of other antibiotics such as PcG, CFX, etc.