

## 抗生物質アレルギーに関する基礎的研究

—特に抗原型の変化による交叉反応性の拡大について—

栗 山 純 一

日本医科大学微生物学免疫学教室

(昭和 60 年 8 月 21 日受付)

Cephem 系抗生物質に対する抗体は、cephem 系薬剤の fresh な水溶液を 8 日間 PCA 反応の誘発抗原とした時、類縁の他  $\beta$ -ラクタム 系薬剤と免疫学的交叉反応性を示さないが、薬剤水溶液を放置して誘発抗原とした時には交叉反応性が出現する。この抗原型の変化による反応性の相違を以下の実験で確認した。

1. PCG, ABPC, CFS, CPZ と *Ascaris suum* extract 結合物をモルモットに免疫して得た抗体を用いたモルモット 8 日間 PCA 反応において、各薬剤の溶解直後 (fresh), 3 時間室温放置 (3 h-stored), 24 時間以上室温放置 (old) の 3 タイプを誘発抗原として特異反応性の変化を検討した。この結果、放置時間の経過とともに各薬剤相互の交叉反応性の増強がみられたが、これは経時変化に由来する重合化に相関するものと考えられた。

2. PCA 反応の誘発における血清タンパクの薬剤に対する影響を CFS およびその polymer について調べた。すなわち、モルモット血清タンパクとの混合物の限外濾過物 (filtrates), 残留物 (retentates) を誘発抗原とした 8 日間 PCA 反応および HPLC 法を用い検討した。この結果、CFS polymer 由来の未知物質がモルモット血清と結合している可能性が示唆され、HPLC によっても特異な溶出 pattern が確認された。

以上より、cephem 系薬剤の重合物と血清タンパクとの反応物質がアレルギー発症に関与している可能性が示唆され、さらに交叉反応性の増強をも来しうることが推測された。

ペニシリンアレルギーの発症機作を解明するために、薬剤中の種々の分解物の抗原性が検討されている。その中で benzylpenicilloyl-protein 結合物に由来する major antigenic determinant<sup>1-5)</sup> や high molecular substance<sup>6-9)</sup> は、抗原性の強い物質として報告されている。

一方、MURANAKA ら<sup>12,13)</sup> ははじめとして実験動物において IgE で mediate された passive cutaneous anaphylaxis (PCA) を製剤単独の負荷で誘発することが報告されているが<sup>14)</sup>、その誘発原性が製剤自身に起因するのか、または生体内に投与された際に何らかの因子が関与しているのかは、現在では一定の見解が得られていない。また、血清中の shock の発現を来す何らかの因子と抗生物質との関係についての検討は、過去の文献においていくつか散見されるに留まっており<sup>15,16)</sup>、最近の分析方法の飛躍的な進歩に基づいた新しい手法による解析が望まれているのが現状である。

著者は  $\beta$ -Lactam 系抗生物質の抗原性の有無を検討する過程で、最近開発された cephem 系抗生物質に対

する抗体は、薬剤の側鎖部分に特異的な免疫反応を示す傾向があるにもかかわらず、水溶液放置薬剤を誘発抗原とした際にはその特異性は消失し、他薬剤の抗体に交叉反応性の拡大を示すことを観察した。

本論文は上記の現象を解析する目的で製剤水溶液の放置による抗原型変化の免疫反応に及ぼす影響を測定するとともに、この反応系に血清タンパク等の生体内因子の関与の可能性を検討した。

## I. 材料および方法

## 1. 動物

免疫および passive cutaneous anaphylaxis (PCA) には、体重 250 g 前後の Hartley 系雌性モルモットを使用した。

## 2. 薬剤

PCG (Lot. No. GLD-12), ABPC (Lot. No. PAMD-7) は明治製菓(株)製、CFS (Lot. No. OK-106) は武田薬品工業(株)製、CPZ (Lot. No. MJ-433) は富山化学工業(株)製を使用した。7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) は Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.

USA) を用いた。

### 3. 免疫抗原の作製

*Ascaris suum* extract(Ase)<sup>17)</sup> 50 mg と抗生物質製剤 (PCG, ABPC, CPZ, CFS) 各 300 mg を pH7.2 の phosphate buffered saline(PBS) 10 ml に溶解し, 37°C 24 時間 pH7.2 に維持したのち遊離薬剤を連続向流透析器により除去した<sup>18)</sup>。その結果得られた薬剤 Ase conjugated solution を凍結乾燥し, 免疫抗原として用いた。

### 4. 免疫方法

Silica gel [Wako gel, 和光純薬(株)製] 5 mg/ml (Tris buffered saline) 中に PCG-Ase または ABPC-Ase, CPZ-Ase, CFS-Ase の各 10  $\mu$ g を混和し, その 1 ml をモルモット腹腔内に注射した。以後 booster を 10 日に 1 回の割合で約 2 か月間継続した。抗体価の上昇を確認ののち全採血し, 血清分離により抗血清を得た。なお抗体価の測定は免疫に用いた各々の製剤 10 mg/ml, saline の 1 ml を誘発抗原とし, モルモットを用いての 8 日間 PCA 反応<sup>19)</sup>によった。

### 5. PCA<sup>19)</sup>

剃毛したモルモットの背部皮内に抗血清の段階希釈液各 0.1 ml を注射し, 8 日後に 10 mg/ml の各抗原 1 ml と 1% Evans blue 0.5 ml の混合液と静脈内に注射した。

モルモットは静注 30 分後に屠殺し, 剝離皮膚について色素の漏出状態 (青色斑) を観察し, 直径 5 mm 以上を PCA 陽性とし, 希釈倍率の逆数をもって PCA 値とした。

一実験において 3 匹以上のモルモットを用い, その平均値を表に示した。

### 6. 反応用抗原の作製

A. PCA 反応に用いる抗原: 2. に記した薬剤を 1 mg/ml Aq. dest. の濃度で溶解 (PCG pH 6.0, ABPC pH 8.4, CFS pH 4.3, CPZ pH 3.7) し, その直後に使用する薬剤を fresh type 抗原, 3 時間室温放置された薬剤を 3 h-stored type 抗原, 24 時間以上放置された薬剤を old type 抗原として, その 1 ml を PCA 誘発抗原として使用した。

さらに 10 日間放置したものを重合物形成の高い試料とし<sup>20)</sup>, 薬剤の polymer として実験に使用した。

### B. 限外濾過による抗原の作製:

(1) *in vitro* での作製: CFS および CFS-polymer 20 mg を正常モルモット血清 1.0 ml に溶解し, 37°C 5 分間 incubate ののち, Amicon MPS-1 (Amicon Co. USA) を用いて限外濾過した。4°C 80 × g 30 分の遠心操作により濾過分画 (filtrates) と残留分画 (retentates) に分離した。retentates については, pH7.2 phosphate

buffered saline (PBS) 100 ml を用いて, Amicon MPS-1 上で洗浄し, PBS で最終 1 ml とした。

(2) *in vivo* での作製: モルモット足背静脈に CFS 100 mg を静注投与し, 30 分後心臓穿刺により採取した血液から血清を分離した。この血清を *in vitro* と同一条件下で限外濾過し, 濾過分画と残留分画を得た。得られた濾過分画を PCA 誘発抗原とするとともに高速液体クロマトグラフィーの試料として用いた。

7. 高速液体クロマトグラフィー [High performance liquid chromatography(HPLC)] による分析 HLC-803 D [東洋曹達(株)製] に UV-8 model II spectrophotometer [東洋曹達(株)製] および付属機器を組み合わせたシステムを用いた。

カラムは Li Chrosorb RP-8 250 × 4.6 mm (Merck Co., Rahway N. J., USA) を使用し, 溶離液は 10% アセトニトリル含有の 0.01 M phosphate buffer(PB) を用いた。溶出条件は flow rate 1.0 ml/min, pressure 91 kg/cm<sup>2</sup> とした。また吸光度測定は抗生物質製剤については 254 nm<sup>21)</sup>, タンパク成分ならびに抗生物質 polymer については 280 nm<sup>22)</sup> の 2 波長を用い測定した。なお, 本研究時点での高速液体クロマトグラフィー技術レベルでは, 前処置なしに血清タンパクのような高分子物質を分析し得るカラムは少なく, その解析能はまだ種々の問題点があるとされている。

この理由から逆相カラムを用い, 限外濾過によって得られた濾過試料を分析することにより残留分画を推測することとした。

## II. 成 績

### 1. $\beta$ -Lactam 系薬剤の交叉反応性の検討

A. 製剤間の交叉反応性: PCG, ABPC, CFS, CPZ, ならびに 7-ACA を誘発抗原とし, 得られた各抗血清の薬剤特異性をモルモット 8 日間 PCA 反応により検討した (Table 1)。PCG と antiABPC-Ase 間で 20 倍, また ABPC と antiPCG-Ase 間で 10 倍と若干の交叉反応性がみられたが, penicillin 系と cephem 系間および cephem 系相互の間には交叉反応性は認められなかった。また, cephalosporin 母核構造物に対する反応性を検討したが, いずれの抗血清とも交叉反応を示さなかった。

B. 薬剤の経時変化による交叉反応性の検討: Table 1 で使用した 4 種類の抗血清を使って type の異なる誘発抗原で PCA を行なった場合の変化について検討した。

抗生物質水溶液 (1 mg/ml) の放置時間の差によって fresh type, 3 h-stored type, old type の各 1 ml を抗原とした。fresh type では Table 1 と同様に交叉反応性は

Table 1 Antigenic cross reactivity among 5 antigens  
(8-d PCA in guinea pigs)

Challenging antigen	Molecular formula	PCA titer			
		anti PCG-Ase	anti ABPC-Ase	anti CFS-Ase	anti CPZ-Ase
PCG		160	20	0	0
ABPC		10	320	0	0
CFS		0	0	80	0
CPZ		0	0	0	160
7-ACA		0	0	0	0

Passive sensitization with antisera were injected intradermally 8-days before challenge. At the time of challenge, the various antigens were injected intravenously to the animal with 1% Evans blue.

Table 2 Antigenic cross reactivity with preparations and their stored sample  
(8-d PCA in guinea pigs)

Challenging antigen	Type**	PCA titer*** antibody			
		anti PCG	anti ABPC	anti CFS	anti CPZ
PCG(1mg/ml)	fresh	160	20	0	0
	3h-stored	320	80	10	10
	old	320	80	10	10
ABPC	fresh	10	320	0	0
	3h-stored	40	640	10	10
	old	80	640	10	10
CFS	fresh	0	0	80	0
	3h-stored	20	20	160	10
	old	20	20	160	10
CPZ	fresh	0	0	0	160
	3h-stored	20	20	10	160
	old	20	20	10	320
7-ACA	fresh	0	0	0	0
	3h-stored	0	0	20	40
	old	40	80	40	160

PCG : benzylpenicillin, ABPC : amino benzylpenicillin, CFS : cefsulodin,  
CPZ : cefoperazone, 7-ACA : 7-amino cephalosporanic acid.

\*\* Type fresh; agents used just after dissolved in water.

3h-stored; stored for 3h at room temperature after dissolution.

old; stored for 24h or more at room temperature after dissolution.

\*\*\* PCA titers were expressed as the reciprocal of the highest antiserum dilution that produced a positive PCA reaction.

Table 3 Antigenic activity of preparations and their polymer (8-d PCA in guinea pigs)

Challenging antigen	Minimal dose for the PCA reaction	
	Preparation( $\mu\text{g/ml}$ )	Polymer( $\mu\text{g/ml}$ )
PCG	1.0	0.05
ABPC	1.0	0.05
CFS	10.0	0.1
CPZ	1.0	0.01
7-ACA	>1,000.0	1.0

Preparation; agents used just after dissolved in water.  
Polymer; stored for 10 days or more at room temperature after dissolution.

ほとんど認められなかったが、3 h-stored type さらに old type と経時的に他薬剤の抗体に対して交叉反応性を示す結果が得られた (Table 2)。

## 2. PCA 誘発能の増強について

polymer 形成前の各薬剤は PCA 反応誘発に 1~10  $\mu\text{g/ml}$  の抗原量を要したのに対し、各薬剤の polymer は 0.01  $\mu\text{g/ml}$  の抗原量で PCA 反応を誘発した。

PCG と ABPC の polymer は製剤に比べ 20 倍、CFS と CPZ では 100 倍の誘発能の増大が認められた。特に 7-ACA の精製品では 1,000  $\mu\text{g/ml}$  以上の抗原量でも PCA 反応は誘発されなかったにもかかわらず、7-ACA の polymer では 1.0  $\mu\text{g/ml}$  で PCA 反応が誘発され、1,000 倍以上の誘発能の増強を来すことが観察された (Table 3)。

## 3. 血清タンパク結合薬剤の交叉反応性の検討

at random に選んだ CFS および CFS polymer を正常モルモット血清とともにインキュベーションした後、限外濾過によって得られた濾過分画と残留分画を誘発原として PCA 反応の誘発能を比較検討した (Table 4)。

CFS polymer の filtrates は各抗体と交叉性を示し、対照とした濾過前の CFS polymer と類似の結果を示し

た。さらに、CFS polymer の retentates は抗 PCG および抗 CPZ 抗体との交叉反応性が高まり、抗 CFS 抗体との反応と同程度の PCA 値 (160 倍) を示した。ただし、CFS retentates の抗 CFS 抗体に対する PCA 値は 5 倍と低値を示した。

この実験の対照としてモルモット正常血清を用いて PCA 反応を行なったが、すべて陰性であった。

## 4. モルモット血清タンパクの CFS に及ぼす影響 (高速液体クロマトグラフィーによる解析)

CFS を PBS のみに溶解した対照試料は、注入 3 分後に一つの peak を示し [Fig.1 (1)], また CFS を正常モルモット血清と *in vitro* に混和した後に限外濾過して得た濾過分画を検討した *in vitro* filtrates CFS でも、同様に 3 分後に一つの peak を認めた [Fig.1 (3)]。

CFS polymer では製剤の main peak と考えられる 3 分の peak のほかに 1 分 40 秒と 2 分の位置に peak がみられ、3 つの peak を示した [Fig.1 (2)]。また、*in vitro* filtrates CFS polymer では CFS polymer [Fig.1 (2)] の 3 つの peak に一致する分画と、新たに 3 分 30 秒に一つの peak が認められた [Fig.1 (4)]。次に、モルモットに CFS または CFS polymer を静注後採取し分離した材料についての検討では、対照とした正常モルモット血清で 2 分 15 秒、2 分 30 秒、2 分 45 秒、3 分 30 秒の peak が増大するとともに CFS 固有の 3 分の peak が認められた [Fig.1 (5)]。

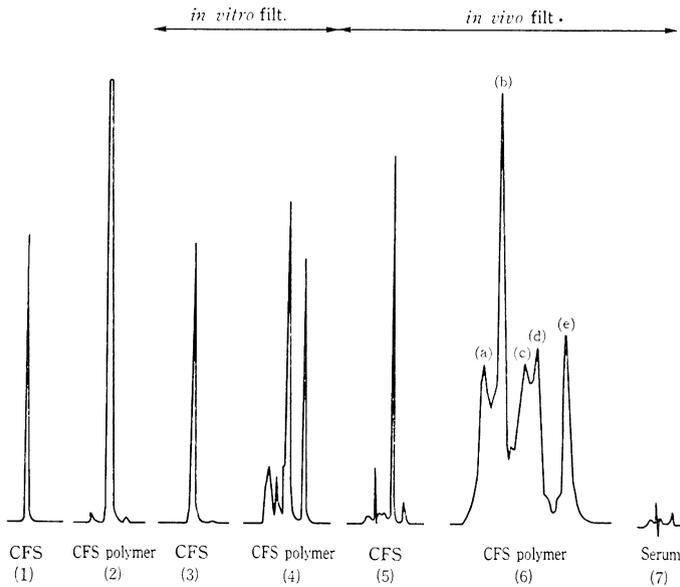
一方、*in vivo* filtrates CFS polymer では、CFS 固有の 3 分の peak [Fig.1 (6)-c] がみられたほかに、正常モルモット血清で認められた 2 分 15 秒、2 分 30 秒の peak [Fig.1 (6)-d] が、*in vitro* における peak [Fig.1 (4)] に比較して一層明瞭な pattern を示した。さらに、溶出時間 4 分の部分に他のいずれの試料にもみられていない新たな peak が認められた [Fig.1 (6)-e]。

Table 4 Cross reactivity of the agents bound with serum protein

Antigen type		PCA titer		
		anti PCG	anti CFS	anti CPZ
CFS	1mg/ml	0	80	0
CFS polymer	1mg/ml	20	160	10
CFS filtrates	0.5ml	0	80	0
CFS polymer filtrates	0.5ml	5	80	10
CFS retentates	0.5ml	0	5	0
CFS polymer retentates	0.5ml	80	160	160
Washed buffer	0.5ml	0	0	0

Filtrates and retentates were obtained from ultrafiltration with Amicon MPS-1.

Fig.1 HPLC chromatograms of CFS ; their polymer and their filtrates



[Chromatographic conditions] Column : Li Chrosorb RP-8.  
 Eluent : 0.01 M PB contained with 10% acetonitrile.  
 Flow rate : 1.0 ml/min.  
 Pressure : 91 kg/cm<sup>2</sup>.  
 Wave length : UV 254 nm or 280 nm.  
 Temperature : room temperature.

### III. 考 察

$\beta$ -Lactam 系抗生物質による薬剤アレルギーの発症機作は関与する抗原型について種々の報告がなされている<sup>1-11)</sup>。その中で薬剤重合物 (polymer) は免疫原性および誘発原性をもつ抗原物質として知られている<sup>6-8)</sup>。

今回の実験において、抗生物質-Ase の結合物の免疫によって得られた抗体は、免疫に用いられた薬剤単独の静脈内投与によって PCA 反応が誘発された。この抗体は免疫抗原特異な反応を示した (Table 1, 2)。しかしながら薬剤水溶液として放置された試料を用いて PCA を行なうと、他薬剤による抗体と交叉反応性を示した。この交叉反応性は放置時間が長くなるにつれて強まる傾向が認められた。

$\beta$ -Lactam 系抗生物質の水溶液中での変化は十分に検討されており<sup>2)</sup>、PCG の場合では penicillenic acid または penicilloic acid の型で生体タンパクと結合する機作が考えられている。

製剤単独の負荷によって誘発される PCA において、製剤の起因物質については一定の見解が得られていないが、高分子重合物、タンパク様不純物、MURANAKA ら<sup>12,13)</sup>の benzylpenilloic acid がある。今回の予備実験

において benzylpenilloic acid の検索を HPLC 法を用いて試みたが検出同定は困難であった。この理由から水溶液中で形成される polymer について注目し、交叉反応性の拡大との関連について検討した。

STEWART ら<sup>23)</sup>によれば PCG-polymer は1時間で0.1% ずつ形成され、24時間で約0.4~1.0% になると報告している。さらに竹内ら<sup>24)</sup>は cephem 系薬剤水溶液の抗原性について報告し、放置3時間で PCA 誘発能を発現すると述べている。これらの報告をもとにすると、もし製剤のもつ PCA 誘発能が製剤中の polymer に由来するとするならば薬剤水溶液の時間的経過に一致して、抗原量の増加に伴って誘発能が高くなるはずである。事実、Table 3 において薬剤水溶液は製剤自体の誘発能に比べて、100倍以上の誘発原性を保持していた。また、すでに実験に使用した 3 h-stored および old type の製剤水溶液中には polymer が存在することも確認されている<sup>25)</sup>。この結果から PCA 誘発と polymer の関連を示唆しうるものと考えられた。

一般に hapten-carrier 結合物を免疫抗原として得られた抗体は、抗原を構成する種々の構造に対して affinity をもつとされている<sup>26)</sup>。benzylpenicilloyl-protein の

場合には BPO の結合 site, protein, benzylpenicilloyl, benzene 環などに対して affinity をもつが, 最近の cephem 系薬剤の開発によって LEVINE らの提唱した major antigenic determinant よりもむしろ, minor antigenic determinant や  $R_1$ ,  $R_2$  側鎖に強い affinity をもつ抗体が形成されやすい<sup>24)</sup>。この点からするとモルモットの免疫により得られた抗体は, 製剤を抗原として PCA を誘発した場合には側鎖に強い affinity をもつが, polymerize されることによって誘発原性の増強を来すとともに, 抗体のもつ major な抗原決定基, すなわち各抗体に共通な抗原構造である hapten-carrier 結合 site をも認識する結果, 交叉反応性の増強を来す可能性が考えられる。

このような hapten-carrier 結合部位を認識しようという仮説を証明するためには, polymer が生体タンパクと簡単に結合し, 別の型に抗原化されるという条件が必要となる。そこで著者は血清タンパクの薬剤に対する影響を PCA 誘発能を指標として検討するとともにその試料を HPLC 法で解析し, 仮説の証明を試みた。

at random に選んだ CFS または CFS polymer とモルモット血清を 5 分間 incubate し限外濾過した。得られた試料 2 mg/ml を PCA 誘発抗原とした場合に, 対照とした CFS, または CFS polymer による交叉反応と濾過試料 (filtrates) は類似の反応を示した。一方, 濾過残留試料 (retentates) においては, CFS retentates はほとんど PCA を誘発せず, retentates 中に CFS が存在しない可能性が考えられたが, CFS polymer retentates は CFS polymer に比べ抗 PCG, 抗 CPZ 抗体に対しての交叉反応性の増強が認められた。

この結果から, CFS polymer の未知分画が限外濾過残留物としてモルモット血清に混在し, しかも washed buffer (Table 4) で PCA 誘発能が認められていないことから, 混在というより結合という形で存在する可能性が示唆された。この結合物が交叉反応性の本体として作用したものと考えられた。

さらに同一試料を HPLC 法を用いて検討した (Fig. 1)。in vitro の実験系である (3) は, 対照とした CFS 製剤 (1) とほとんど同一の peak であり, 変化は認められていないが, CFS polymer (2) と in vitro の CFS polymer (4) との間には明らかな peak の変化がみられ, 特に main peak の減少が顕著であった。また, 対照として検討した serum (7) とも pattern は異なっており, CFS polymer が血清成分による修飾を受けることにより, 物質として不安定になることが推測された。

さらに, in vivo の実験系として CFS および CFS polymer 各 50 mg をモルモットに投与し, 30 分後に採

取した試料の限外濾過物をみると特に, CFS polymer filtrates において著しい変化が認められた。すなわち, CFS 製剤および polymer でみられた main peak は“著明に減少”し, (e) の peak が新たに認められた。また, これらの peak は血清試料の対照の peak とも明らかに pattern が異なっている事実も注目すべき点であると考ええる。

以上の本実験において得られた溶出 peak より推測すると, polymer と血清との短時間の反応において対照で認められた main peak が“減少”した事実は, 他の物質への変化とは考え難く, retentates 中に結合または混合した可能性を示唆しうるものと考えられる。

これらの事実より, 薬剤水溶液の放置試料において他薬剤に対する抗体との交叉反応性の増強は, 試料中の polymer に由来する場合のあることが示唆された。

なお, HPLC カラムの血清因子の溶出に対する干渉作用は, 現時点では未だ完全に除去しうるものとは考え難いが, 今後の新しいカラムの開発により retentates 中の抗生物質と血清との変化についても検討すべき課題と考える。

(謝辞) 稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲賜わった日本医科大学微生物学免疫学教室 木村義民名誉教授, 御助言をいただいた横室公三教授および本研究を直接御指導下さった竹内良夫助教授に深謝するとともに, 御協力いただいた同教職員各位ならびに臨床面での御助言をいただいた東京大学医学部付属病院分院耳鼻咽喉科教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は第 34 回アレルギー学会総会において発表した。

#### 文 献

- 1) LEVINE, B. B.: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. I. Delayed allergic cross-reactions among penicillin G and its degradation products. J. Exp. Med. 112: 1131~1154, 1960
- 2) LEVINE, B. B.: Studies on the formation of the penicillin antigen. II. Some reactions of D-Benzylpenicillenic acid in aqueous solution at pH 7.5. Arch. Biochem. Biophys. 93: 50~55, 1961
- 3) LEVINE, B. B. & Z. OVARY: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D- $\alpha$ -benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875~904, 1961
- 4) LEVINE, B. B.: Studies on the dimensions of the rabbit antibenzylpenicilloyl antibody-combining sites. J. Exp. Med. 117: 161~183,

- 1963
- 5) BATCHELOR, F. R. & J. M. DEWDNEY : Some aspects of penicillin allergy. *Proc. Roy. Soc. Med.* 61 : 897~899, 1968
  - 6) BATCHELOR, F. R.; J. M. DEWDNEY, J. G. FEINBERG & R. D. WESTON : A penicilloylated protein impurity as a source of allergy to benzylpenicillin and 6-aminopenicillanic acid. *Lancet* 1 : 1175~1177, 1967
  - 7) STEWART, G. T. : Allergic residue in penicillin. *Lancet* 1 : 1177~1183, 1967
  - 8) DE WECK A. L.; C. H. SCHNEIDER & J. GUTERSOHN : The role of penicilloylated protein impurities, penicillin polymers and dimers in penicillin allergy. *Int. Arch. Allergy.* 33 : 535~567, 1968
  - 9) AHLSTEDT, S.; A. KRISTOFFERSON, P. O. SVARD & Ö. STRANNEGÅRD : Immunological properties of ampicillin polymers. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 53 : 247~253, 1977
  - 10) LIKOPOULOU, A. & A. B. VILIM : Immunological properties of dialysis retentates from penicillin. *Acta. Allergologica.* 31 : 255~264, 1976
  - 11) 竹内良夫, 西村葉子, 山地幸雄, 木村義民 : ペニシリン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 : 10~17, 1977
  - 12) MURANAKA, M.; H. IGARASHI, K. KOIZUMI, H. OKUMURA, K. TAKEDA & S. SUZUKI : Elicitation of homologous passive cutaneous anaphylactic reactions by a benzylpenicillin preparation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54 : 329~338, 1974
  - 13) MURANAKA, M.; S. SUZUKI, K. KOIZUMI, H. IGARASHI, H. OKUMURA, K. TAKEDA, K. TADOKORO & Y. HORIUCHI : Benzylpenicillin preparations can evoke a systemic anaphylactic reaction in guinea pigs. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62 : 276~282, 1978
  - 14) IGARASHI, H.; K. KOIZUMI & M. MURANAKA : Eliciting antigenicities of benzylpenicillin, ampicillin and carbenicillin preparations examined with the reagin-mediated passive cutaneous anaphylaxis system. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 57 : 341~348, 1978
  - 15) TORII, T. & Y. HORIUCHI : Antigenicity of penicillin and its relation to albumin binding. *Nature.* 192 : 429~431, 1961
  - 16) 小泉一弘, 五十嵐 宏, 村中正治 : Simple chemical allergy に関する研究, 3. ヒト血清および全血の担体作用に関する研究。アレルギー 22 : 627~634, 1973
  - 17) STREJAN, G. H.; K. RABHERN, R. WHITE & D. SURLAN : Reaginic antibody production to ascaris suum allergen, ASC-1. II. Influence of type of adjuvant and of carrier priming on the induction of IgE and IgG antibodies to dinitrophenyl conjugates. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 54 : 502~516, 1977
  - 18) 竹内良夫, 木村義民, 西村葉子, 八木和郎, 吉河達祐, 石井洋二 : T-1982 の抗原性に関する免疫学的研究。Chemotherapy 30 : 206~211, 1982
  - 19) OVARY, Z. : Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Progr. Allergy.* 5 : 459~499, 1958
  - 20) SMITH, H.; J. M. DEWDNEY & A. W. WHEELER : A comparison of the amounts and the antigenicity of polymeric materials formed in aqueous solution by some  $\beta$ -Lactam antibiotics. *Immunology.* 21 : 527~533, 1971
  - 21) GARLOCK, E. A. & D. C. GROVE : The quantitative determination of benzylpenicillin by ultraviolet adsorption. *J. Am. Pharm. Assoc.* 39 : 398~400, 1950
  - 22) 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
  - 23) STEWART, G. T. : Macromolecular residues contributing to the allergenicity of penicillin G and cephalosporins. In "Antimicrobial agents and chemotherapy", Ann. Arbor, American society for Microbiology. Washington, pp. 543~549, 1969
  - 24) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民, 石井洋二, 林宣之 : Cephalosporin 水溶液に対するラットの免疫応答。臨床免疫 14 : 653~660, 1982
  - 25) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民, 石井洋二, 林宣之 : 補液中で形成される PCG polymer について。Chemotherapy 28 : 378~381, 1980
  - 26) ATSUMI, T.; K. NISHIDA, Y. KINOSHITA, K. SHIBATA & Y. HORIUCHI : The heterogeneity of combining sites of anti-benzylpenicilloyl antibodies obtained from individual rabbits-Fractionation of antibodies with a specific immunoabsorbent. *J. Immunol.* 99 : 1286~1293, 1967

## FUNDAMENTAL STUDIES ON ALLERGIC REACTION INDUCED WITH ANTIBIOTICS

JUN-ICHI KURIYAMA

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

In 8-days PCA reaction, antibodies to recently developed cepheids showed specific immunological reaction at their side chains when fresh solutions of the drugs were used as eliciting antigens, but this specificity was lost and cross-reactivity with other cepheids was enhanced when fresh solutions of the drugs were allowed to stand at room temperature and used as eliciting antigens.

We attempted to elucidate the relationship among these changes of solutions of the drugs and their cross-reaction with other cepheids, and investigate the effect of serum proteins on the antigens.

We investigated changes in specific reaction in guinea pigs in 8-days PCA reaction, using antibodies obtained from guinea pigs immunized with conjugates of PCG-Ase (*Ascaris suum* extract), ABPC-Ase, CFS-Ase and CP Z-Ase, and as eliciting antigens three kinds of aqueous solutions (one: used immediately after dissolution of the drug; two: used after standing for 3 hours at room temperature; and three: used after standing for 24 hours or more at room temperature). The cross-reactivities were enhanced according to age of solution, and the enhancement was attributed to cefsulodin (CFS) polymers produced during the standing period.

Additionally to investigate the effect of serum proteins on the eliciting antigens in 8-days PCA reaction and by HPLC, ultrafiltrates and residue of CFS or its-polymers with guinea pig serum protein were used as eliciting antigens and cross-reactivity was enhanced by conjugating unknown substances derived from CFS polymers with guinea pig sera.

Our results suggest that serum protein conjugates of unknown substances derived from polymers of cepheids enhance allergic reactions and cross-reactivities.