

ペニシリン・アレルギーの研究

— ペニシリン G の抗原構造について —

北海道大学医学部第2内科(主任:真下啓明教授)

阿 部 守 邦

(受付: 3月21日, 1964)

I 緒 言

ペニシリンは広く用いられている薬剤であるが, その反面ペニシリンによるアナフィラキシー様反応も, 他の抗生剤に比較し最も多くの報告がみられる。ペニシリンによつてヒトが感作され, アレルギーを起すことは周知のことであるが, 感作機序に不明の点が多く, したがつてアナフィラキシーを未然に予知する手段として, ペニシリン単独を用いる2, 3の方法が考案されているものの, 未だ確実な予知法とはいえない。一方実験的ペニシリン・アレルギーにおいて, ペニシリンのように比較的簡単な構造の低分子化合物では, そのみでは抗原として容易に感作原性も, またアレルギー反応の誘発能をも表わし得ない。

ペニシリンの抗原性を解明するには, まず生体内でペニシリンが蛋白と結合して完全抗原となる機序を明らかにすることが必要である。鳥居ら¹⁾²⁾³⁾は, *in vitro* でペニシリンと卵白アルブミンとの生理的食塩水溶液を37°C, 24時間放置する, ごく自然な操作により得た抗原液, ペニシリン・アルブミン複合体の作成を考案した。これによつて, 容易かつ高率にモルモットを感作し得ることを能動的アナフィキシーおよび Schultz-Dale 反応で確認した。

Levine^{4)~8)}, Eisen^{9)~11)}らはペニシリンが抗原性を得る機序として, ペニシリンの中間分解物である Penicillenic acid を重要視して, Benzyl-Penicillin より Penicillenic acid を化学的につくり, これと蛋白を結合させてその結合様式, 特異的抗原性について詳細に報告した。

中島¹²⁾はハプテンとしてのペニシリンが, シュレツパーである蛋白と複合体を形成して抗原性を獲得するための種々の条件を, Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) を行つて検討した。すなわちペニシリンと蛋白の抗原性結合は酸性溶液では速やかであり, この蛋白結合は

透折では解離しない非可逆的結合であることを明らかにした。またペニシリンの分解物である Penicilloic acid Penillic acid は蛋白と結合しないので抗原性が認められないこと, ペニシリンGの Penicillenic acid 生成量と抗原性結合の強弱がほぼ並行することから, ペニシリンが抗原性を得るためには Penicillenic acid が関与していることを推定した。

著者は, 生体内で起り得ると考えられる条件で作成されるペニシリン・アルブミン複合体 (Pc albumin complex) が, ペニシリンと蛋白と如何なる結合であるか, その抗原構造は如何なるものであるかを Penicillenic acid と蛋白の結合体と対比して, 両者を免疫学的に検討した。

II 実験材料および実験方法

1) 抗原の作成

イ) Pc-albumin complex

感作抗原のシュレツパーとして, 卵白アルブミンは Cole¹³⁾ の方法で2回再結晶により, 誘発抗原のシュレツパーとしてのヒトアルブミンは血漿より低温エタノール法により作成した。ペニシリンGは万有製薬提供品を用いた。S³⁵ 標識ペニシリンGは日本化薬の提供によつた。Pc-albumin complex の作成は, 生食水に溶解したアルブミン10mg/ml と結晶ペニシリンG60mg/ml との等量混和液を, 37°C24時間 incubation し, 大量に生じた沈澱を N/10 NaOH で pH 7.6~7.8に再溶解し, pH 7.4~7.6の 0.15Mリン酸緩衝加生食水液中で1週間, 外液を取換えながら透折した。透折後のアルブミン濃度は Biuret 法で定量した。

ロ) Penicilloyl-Pretein conjugate

a) Penicillenic acid の製法

Penicillenic acid はペニシリンの自然崩壊過程の化合物であるが, 化学的操作を加えて製成できる。また分子構造の oxazolone 核に基づく紫外線最大吸収の波長は

図1 Penicillin-G と蛋白の非可逆的結合様式

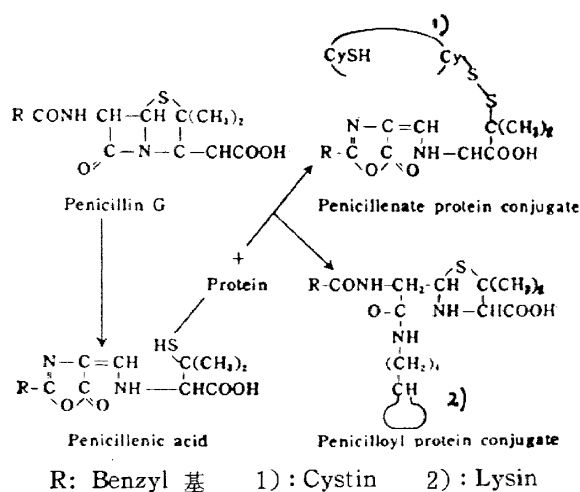
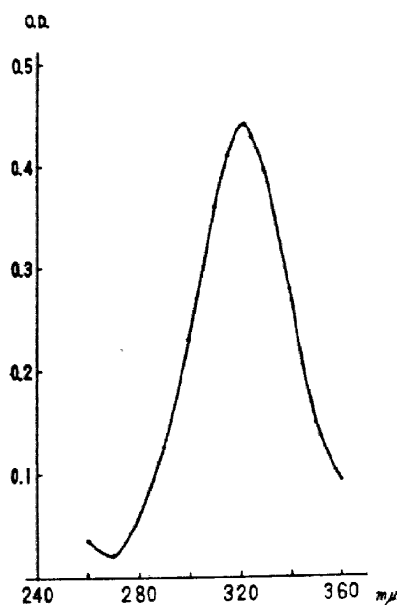


図2 Penicillenic acid の紫外吸光曲線



322m μ で、 $\epsilon=26.600$ より定量的に測定することができる。比較的不安定な化合物であるが、蛋白ないしアミノ酸と結合すると安定化するといわれている。蛋白のCystin残基との-S-S-結合 (Penicillenate protein conjugate, 図1) の場合も 322 m μ に紫外吸収が同様に存在する。

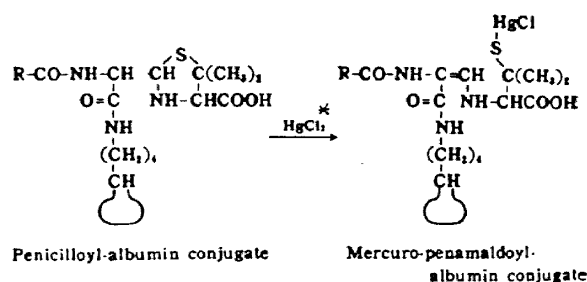
Penicillenic acid は Carpenter et al¹⁴⁾の方法をmodify した Levine⁹⁾の方法に従って作成した。ペニシリンGの水溶液3.56 g/200 ml と HgCl₂ 3.26 g/200 ml 水溶液を混和し、24時間・32°Cに放置後生成した沈澱物を冷水で数回遠沈操作を繰返し、最後にエーテルで洗滌する。これにベンゼン 200 ml と蒸留水50 ml とを加え H₂S を充分噴出させる。沈澱物は還元されて Penicillenic acid となりベンゼンに溶ける。ベンゼン層を分離

し、冷水で数回洗滌後冷凍乾燥をして結晶 Penicillenic acid を得た。図2は、Penicillenic acid の結晶を95%エタノールに溶解して得た紫外吸光曲線である。

b) penicilloyl protein conjugate の製法

Levine⁹⁾によると、Penicillenic acid と蛋白との結合様式には、(図1),前記の-S-S-結合以外に inter molecular rearrangement による Penicilloyl carboxyl 残基と Lysin のアミノ残基との酸アミド結合、つまり Penicilloyl protein conjugate がある。この結合体は Penamaldate method (図3),すなわち Hg Cl₂ または p-chloromercuribenzoic acid との反応で Thiazo-

図3 Penamaldate method.



* たまは p-chloromercuribenzoic acid

lidin 環が切れ、その S と Hg Cl が結合した Penamaldoyl protein conjugate を生じ、このものが 282 m μ に紫外最大吸収帯を示すことにより定量し得る。

Penicilloyl protein conjugate の作成は Levine の方法および Eisen¹⁰⁾の方法を幾分 modify して行つた。pH 7.4 リン酸緩衝液加生食水に溶解したアルブミンの 6.0mg/ml 溶液10 ml に、Penicillenic acid 350mgを溶解した95%エタノール溶液 2.0 ml を攪拌しながら滴下して加え、その間 pH の低下を防ぎ pH 7.5~8.0に保持する為 0.5 N NaOH 溶液を滴下した。反応液は充分混和後 4°Cの冷室に放置し、遠沈して上清を緩衝生食液に透析した。透析は外液を毎日取換え 7 日間継続し、透析後の蛋白濃度は Biuret 法により測定した。

2) 感作

動物は 2 kg前後のウサギを用いた。抗原は Complete Freund's Adjuvant としてあらかじめ Arlacel 1 容、流動パラフィン 8 容および乾燥結核死菌 2 mg/mlを乳鉢で混和し、これを攪拌しつつ抗原液 4 容を滴下して完全な懸濁液としたものを用いた。初回感作は、各足趾皮内に 0.05 ml 宛、腹背部の皮内18カ所に 0.1 ml 宛、総量 2 ml を 1 回量として注射、2 回目感作はその 2 週間後に腹背部のみに同量皮内注射を行つた。初回感作の 5 ~

6週目より耳静脈採血を行つた。別に Levine⁹⁾の方法にもとづき、ペニシリンG 100mgを生食水1 ml に溶解し上記 Freund's Adjuvant に懸濁したものを、初日足蹠および腹背部の多数個所に皮内注射し、ついで18, 20, 22, 24, 26日目にそれぞれペニシリンG 100mgの生食水溶液2 ml の静注、同時に懸独ペニシリン30万単位を筋注し40日目に採血した。

3) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

体重 250~300 g の白モルモットを用い Ovary¹⁵⁾¹⁶⁾の方法を一部変法¹²⁾して行つた。前日剃毛せるモルモット腹部皮内に、抗ペニシリンウサギ血清を生食水で1×, 10×, 100×, 1,000×, に稀釈した各0.1 ml を注射して、4~6時間後誘発抗原液1.0 ml と0.5% Evan's blue 1.0 ml との混合液を頸静脈より注入し、その30分後に抗血清注射部位の色素浸潤の拡がり判定した。陽性基準は Cooke¹⁷⁾に従い色素浸潤の直径7.0 mm以上のものと定め、抗血清の力価は陽性を示す抗血清の最大稀釈倍数で表わした。

4) BDB赤血球凝集反応

イ) Bisdiazotized benzidine の製法

N₅ NaNO₂ 0.6 ml を氷冷水槽中で攪拌冷却しつつ塩酸ベンチジン (N₁₀ HCl 7.5 ml に Benzidine 3.21 mg を溶解) の約3.25 ml を徐々に滴下する。反応液中の NaNO₂ の消失は、反応液の一部を沃化カリ澱粉液に滴下して発色の有無で検定しながら、塩酸ベンチジンを過不足なく加える。BDB液は-20°Cに保存する。

ロ) BDB赤血球の作成

あらかじめ羊赤血球を生食水で洗滌して50%血球浮遊液を作り、その0.1 ml と10倍稀釈誘発抗原液1.0 ml とを混和し、ついで0.15Mリン酸緩衝液加生食液 (pH 7.4) で12倍に稀釈したBDB液0.5 ml を加えて攪拌する。ひきつゞき上記緩衝生食液3.5 ml を加え、2~3度攪拌しながら10分間室温に放置した後遠沈する。上清を捨て、緩衝生食液で正常ウサギ血清を100倍に稀釈した蛋白液で遠沈洗滌操作を3回繰り、最後に上記蛋白液2.5 ml を加えて2%血球浮遊液を作成する。

ハ) 凝集反応

抗血清は56°C30分非働化し、等量羊血球で一昼夜吸収した後、上記蛋白液の0.5 ml で倍数稀釈系列を作り、それぞれの稀釈抗血清にBDB抗原赤血球液の0.05 ml 加え、振盪後4°C冷室に一昼夜放置して凝集を判定した。対照として上記蛋白液に感作血球を加えたものと、抗血清に非感作血球を加えたものとを併置した。

ニ) 凝集阻止反応

BDB赤血球凝集反応の結果、凝集価8単位に稀釈した抗血清を用いて0.5 ml 宛試験管に分注し、ペニシリンG, Penicilloic acid を阻止体として0.1mM/ml より2倍階段稀釈系列を作り、2時間室温放置後BDB赤血球凝集反応を行つた。

5) タンニン酸処理赤血球凝集反応

タンニン酸は Mallinckrodt, New York 製品を用いた。反応液は全て0.15Mリン酸緩衝液加生食水液pH7.4を用いた。2000倍タンニン酸溶液に等量の5%羊赤血球浮遊液を少量づゝ滴下して加え、37°C10分加温する。緩衝生食液で3回遠沈洗滌の後33.3%の血球浮遊液とする。別に33.3%に稀釈した抗原液を用意して、タンニン酸処理血球液の等量と混和し、37°C15分間加温する。遠沈後上清を捨て、0.1%濃度にウサギアルブミンを溶解せる緩衝生食液で3回遠沈洗滌して、上記蛋白液で2.5%の血球浮遊液とした。抗血清は非働化吸収処理後、0.5 ml の蛋白液に2倍階段稀釈系列とし、それぞれに感作血球液0.05 ml を加え、振盪後4°C冷室に一昼夜放置して凝集結果を判定した。対照として、抗血清に未処理およびタンニン酸処理のみの血球を加えたもの、蛋白液に感作血球を加えたものとを設けた。陽性判定は Stavitsky¹⁸⁾の基準に倣つた。

6) 寒天ゲル内沈降反応

Oakley-Fulthorpe 法により、0.3% J-Agar 生食液を用い、4°Cに保存した。

7) ヒト皮内反応

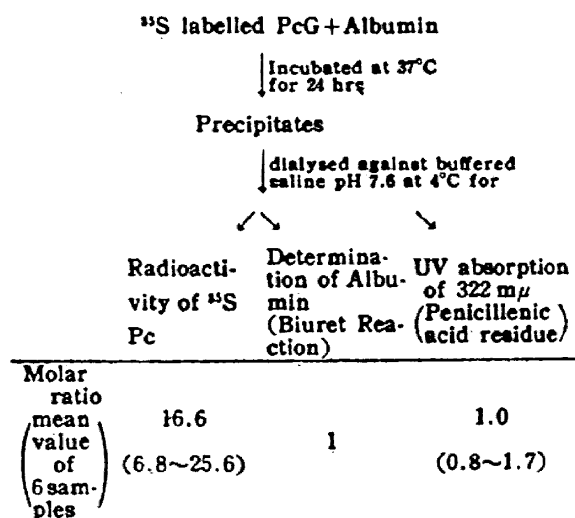
抗原としてペニシリン (Pc) G と Conjugate 抗原を用いた。Pc G は 500 u/ml 生食液0.02 ml を注射した。ヒトアルブミン Conjugate 抗原液は滅菌生食水で稀釈、milli-pore filter を用いて2回濾過し、濾過抗原液の一部は血液寒天培地で培養して無菌検査を行つた。抗原液は蛋白量0.1 mg/ml で0.02 ml を前腕屈側に皮内注射し、注入Pc量は約0.2~0.3単位であつた。注射後15分、30分に判定し発赤直径20mm以上、またわそれ以下でも膨疹10mm以上を陽性とした。皮内反応陽性者の血清は更に Prausnitz-Küstner 反応で検討した。

III 実験結果

1) Pc Albumin Complex のペニシリンと蛋白との結合様式

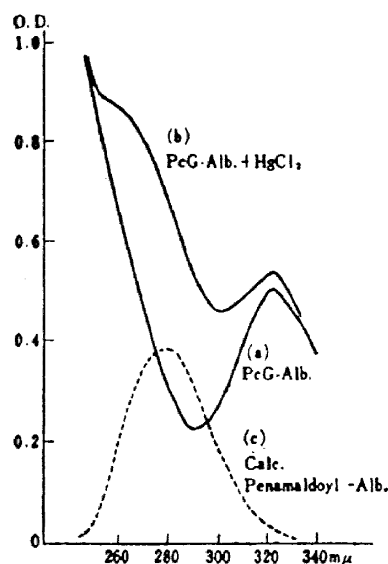
Pc Albumin Complex の透析前の Penicillenic acid 量を 322 mμ 紫外吸収で測定すると 2.2 mg/ml であるが、これを透析すると僅か 0.023 mg/ml であつた。こ

図4 S^{35} 標識ペニシリンによるペニシリンと蛋白の結合化



のためペニシリンとアルブミンの結合様式は Penicillenate protein conjugate である可能性が少ないと考えた。更にこのことを S^{35} 標識ペニシリンを用いて検討した。図4, Pc albumin complex と同じ条件で作製した S^{35} Pc albumin complex を充分透析して遊離ペニシリンを除去した後、一定量の複合体溶液に含有される S^{35} Pc 量 ($BaSO_4$ とし沈澱せしめた後) を G-M 管で測定して、複合体を形成する総ペニシリン量を算定、

図5 Penicillin Albumin Complex の Penamaldate 前後の紫外吸光曲線



Curve a: Penicillin-albumin complex
Curve b: Mercuric chloride is added to penicillin-albumin complex
Curve c: Difference between a and b.

また同じ溶液の 322 m μ 紫外吸光度より Penicillenic acid 残基量を算定、一方アルブミン量を Biuret 法により定量し、それぞれの結合比を算出した。その結果アルブミン 1 分子に対するペニシリン分子の結合比は平均 1 : 16.6 であった。一方アルブミン分子対 Penicillenic acid 分子の結合比は平均 1 : 1 であった。このことより Pc albumin complex におけるペニシリンの結合は、Penicillenate conjugate の関与する-S-S-結合以外の様式、すなわち Penicilloyl conjugate の様式が大部分を占めることが想定された。

更に Pc albumin complex に Penamaldate 法を応用した Hg Cl_2 処理後の複合体溶液の紫外線吸収を測定すると、(図5) Hg Cl_2 処理液はいちぢるしい吸光度の増加を示し、吸光度の差を図に表わすと、282m μ に最大吸光帯を示す抛物線を描き、あきらかに mercurio penamaldoyl albumin conjugate の存在を示し、Pc albumin complex に Penicilloyl conjugate の結合様式が多量に含まれることを認めた。

2) 免疫学的検討

イ) PCA

抗ペニシリン・卵白アルブミン複合体血清 (抗Pc EA complex), 抗 Penicilloyl EA conjugate 血清 および抗ペニシリンG単独血清 (抗 Pc G 血清) の3種の抗血清を用い、ペニシリン・ヒトアルブミン複合体 (Pc HSA complex) またわ Penicilloyl-HSAconjugate を抗原として誘発した。表1, Pc-HSA complex と Penicilloyl HSA conjugate はそれぞれの抗血清に対すると同様に、相互の抗血清および抗 Pc G 血清とも同程度に陽性を呈し、両抗原は強い交叉性をもつことが示された。

ロ) 赤血球凝集反応

B D B 赤血球凝集反応とタンニン酸処理赤血球凝集反応は同様の傾向を示した。表1, Pc HSA complex および Penicilloyl HSA conjugate は対応する抗血清と強い陽性反応を呈するが、同時に抗 Pc G 血清ともほぼ同程度の反応を示しかつ相互に交叉性が認められた。

B D B 赤血球凝集阻止反応は、Pc G および Penicilloic acid でほぼ等しく 1.5 $\mu M/ml$ 液にて凝集阻止がみられ、ハプテンとしての両者の関連性が示された。

ハ) 寒天ゲル内拡散沈降反応

Pc HSA complex またわ Penicilloyl HSA conjugate を抗原とした場合、抗 Pc-EA complex 血清および抗 Penicilloyl EA conjugate 血清は共に沈降線を形成し、

表1 Penicillin に対するウサギ抗血清と Pc HSA complex および Penicilloyl HSA conjugate の免疫反応

Rabbit antiserum	PCA	BDB hemagglutination test	Tanned cell hemagglutination test	Agar diffusion
	Reaction with Pc-HSA Complex			
Anti Pc-EA Complex	1: 1,000	1: 4,096	1: 4,096	+
Anti Pc-G	1: 1,000	1: 2,048	1: 2,048	+
Anti Penicilloyl-EA Conjugate	1: 1,000	1: 2,048	1: 2,048	+
	Reaction with Penicilloyl-HSA Conjugate			
Anti Pc-EA Complex	1: 1,000	1: 4,096	1: 16,384	+
Anti Pc-G	1: 100	1: 65,536	1: 4,096	+
Anti Penicilloyl-EA Conjugate	1: 1,000	1: 65,536	1: 65,536	+

PCA : Passive cutaneous Anaphylaxis

BDB : Bisdiazotized Benzidine.

Agar diffusion : Oakley Fulthorpe 法

Anti Pc EA complex : 抗ペニシリン・卵白アルブミン複合体血清

Anti Pc G : Levine の方法に準じた Pc G 単独大量注射抗血清

Anti Penicilloyl EA conjugate : Levine の方法による Penicillenic acid と卵白アルブミンの結合体に対する抗血清 HSA : ヒト血清アルブミン

表2 各種抗原によるヒトの皮内反応

		Pc-G		Total
		(+)	(-)	
		4	696	700
Penicilloyl-HSA Conj. (+)		4	15	19
Pc-HSA Complex (+)		4	17	21
		Penicilloyl-HSA Conj.		Total
		(+)	(-)	
Pc-HSA Complex	(+)	18	3	21
	(-)	1	678	679
Total		19	681	700

Penicilloyl HSA conjugate : Penicillenic acid とヒト血清アルブミンの結合体

Pc HSA complex : ペニシリン・ヒトアルブミン複合体

注射量 : 0.02 ml Pc G 10単位, 他は 0.2~0.3単位

共通に反応する抗体の存在が推定され, PCA および赤血球凝集反応の結果と共に Pc HSA complex は Penicilloyl protein conjugate と共通の構造を有することが想定された。

=) ヒトの皮内反応

表3 皮内反応陽性例の Prausnitz-Küstner 反応

Pc-G	0/4
Penicilloyl-HSA Conj.	4/19
Pc-HSA Complex	2/21

抗原として同時に Pc G 単独, Pc HSA complex および Penicilloyl HSA conjugate を用い, 無差別の 700人について行つた。表2, 陽性例は Pc G 4例, Pc HSA complex 21例, Penicilloyl HSA conjugate 19例にみられ, Pc G での陽性例は全て他の2抗原にも陽性であった。

Pc HSA complex の陽性例と Penicilloyl HSA conjugate の陽性例とは表2の如くきわめてよく一致した。

皮内反応陽性者の血清を用いて Prausnitz-Küstner 反応を行つた結果は, Pc G では全例とも陰性, Pc HSA complex は $\frac{2}{21}$, Penicilloyl HSA conjugate は $\frac{4}{19}$ の陽性を示した(表3)。

IV 考 按

Landsteiner^{19) 20)} 以来, 単純な低分子の化合物によつて過敏症がおこるのは, その化合物と生体内の蛋白とが結合して, あるいはそれが生体内で化学的により活性な分子構造に転換後蛋白と非可逆的に結合して完全抗原と

なるためと考えられている。

ペニシリン単独による動物の感作は種々の方法^{21)~26)}で試みられたが、いずれも確実な感作法とはいわれなかった。

ペニシリンによる確実な動物の感作法は1956年鳥居ら^{11)~13)}によりはじめて成功した。すなわちペニシリンと卵白アルブミンを37°C・24時間混合放置することにより、透折で分離しないペニシリンとアルブミンの非可逆的結合物が得られ、このものを感作に用いるとペニシリンに特異的な抗体を得られることが見出された。

Josephson²⁷⁾はウサギに大量のペニシリンを繰返し注射することによって感作に成功し、Levine⁸⁾は類似の方法によってPCA、沈降反応陽性の結果を得ている。中島¹²⁾の追試によると5例中1例(2例死亡)にのみPCA陽性の結果を得た。

ペニシリンとアルブミンの非可逆的結合(Pc albumin complex)による抗原性の獲得の条件は、酸性pHで速やかにかつ大量に生じ、中性では僅か、アルカリ溶液では殆んど生じない。また従来考えられていたペニシリン分解物のPenicilloic acid, Penillic acidは蛋白と結合しないことが見出された。更にペニシリンの単独溶液を37°C・24時間放置後中性に補正した後蛋白を加えても、同様に抗原性があることから、ペニシリンが崩壊して酸性となり、また酸性pHでその崩壊が速やかになり、この不明の崩壊物と蛋白が結合して完全抗原化する可能性を推定していた。

Levine^{9)~11)}は1959年以来ペニシリンの崩壊中間産物としてPenicillenic acidが生じ、これが蛋白と非可逆的結合をして強い抗原性を得ることを示した。Eisen⁹⁾らはPenicillenic acidと蛋白との-S-S-結合物(Penicillenate conjugate)によってウサギを感作することに成功し、ペニシリンの抗原構造はPenicillenic acidと蛋白の-S-S-結合によるものと考えた。

中島はPc albumin complexの抗原性結合を検討して、Penicillenic acidはペニシリンの生食水溶液では中性緩衝溶液の20倍の大量が生じ、またアルカリ溶液ではほとんど産生せず、完全抗原化と並行関係がある点から、このPc albumin complexの抗原性もPenicillenic acidと蛋白の結合物が主なものと考えた。

著者の実験結果では、このPc albumin complexを形成するペニシリンとアルブミンの結合molar ratioは平均1:16.6であるにもかかわらず、Penicillenic acid残基としてのratioは平均1:1のみであり、結合様式と

してPenicillenate結合はごく少部分にすぎないと考えられた。

Levine⁸⁾はその後ペニシリン単独感作法のウサギ抗血清について、沈降反応、PCAおよびそのハプテン阻止反応から、ペニシリンの抗原構造はPenicillenate conjugate以外の結合形式である、Penicilloyl carboxyl基と蛋白のLysin amino基との酸アミド結合のPenicilloyl protein conjugateが主なものであり、このことはヒトにペニシリンを大量に注射した場合の血清中にPenicilloyl protein conjugateが見出され、またペニシリン・アレルギー患者血清中にそれと反応する抗体が見出されたことから考えた。

著者はPc-albumin complexについてPenamaldate化することにより282 mμ紫外吸収が存在することから、同様にPenicilloyl conjugateの可能性を強くした。さらにPc-EA complexに対する抗血清、Levineの方法に準じたPenicilloyl EA conjugateに対する抗血清およびPc-G単独大量注射による抗血清にPc HSA complex抗原、Penicilloyl HSA conjugate抗原が共に免疫学的に同様の能度を示した点もこれを裏がきする。つまりペニシリンとアルブミンを37°Cで24時間混合放置するという、生体内で起こり得ると考えられる条件での蛋白結合抗原は、Penicilloyl protein conjugateの形を含み、かつ抗Pc-G血清との反応はそのconjugateと免疫学的同一態度をとることから、ペニシリンGの感作過程は生体内でPenicillenic acidを経てPenicilloyl protein conjugateとなり、これを完全抗原としておきる可能性を充分示すものと考ええる。

さらにヒトに対する皮内反応において、Pc-albumin complex, Penicilloyl albumin conjugateが殆んど同一人に陽性反応を示す点、これを裏がきするものと思われる。この場合ペニシリン単独注射ではペニシリン量としてはるかに多いにもかかわらず、蛋白結合抗原より陽性率が低い点は、ペニシリン・アレルギーに対する皮内反応は、これらconjugate抗原を使用した方がより有効と思われる。しかし著者の検査では、皮内反応陽性者にペニシリン治療を行いアレルギー症状発現の有無を確かめていたので、決定的なことはいえない。

Rajka²⁸⁾はペニシリンとヒトγ-globulinの混合液による皮内反応を行つて、ペニシリン単独皮内反応では陰性であった血清病型ペニシリン・アレルギーの陽性率を高めた。

Parker¹⁴⁾らはPenicilloyl conjugateによる皮内反応を1,250人に行い、ペニシリン・アレルギー既往者は

59例の中45例(75%)に陽性であるのに、アレルギーのない者での陽性は44例(4%)にすぎなかった。実際のペニシリン治療ではアレルギー既往がなく皮内反応陽性の23例中9例(39%)にアレルギー反応が現われたが、皮内反応陰性の1,147では1例も異常がなかった。一方 conjugate 抗原に陽性であった10例にペニシリン単独で皮内反応を行つたが9例は陰性であったと報告している。

これらの結果は、著者の検査で Prausnitz-Küstner 反応が conjugate 抗原のみに陽性を示したことも一致するものと考えられ、ペニシリン・アレルギーの皮内反応はペニシリン単独では不十分で conjugate 抗原を用いることが、より有効な結果を得られることを示している。

V 結 語

1) ペニシリンとアルブミンを37°C・24時間incubateして得られる Pc-albumin complex は、感作抗原としてまた誘発抗原としてペニシリンに特異的反応を示す結合物であるが、ペニシリンとアルブミンの結合は Penicillenic acid を介して起ると思われる。

2) Pc albumin complex を形成するペニシリンと蛋白の結合様式を S³⁵標識ペニシリンを用いて検討した。蛋白とペニシリンの結合 molar ratio は平均 1:16.6であるが、Penicillenic acid 残基としての ratio は 1:1であり、Penicillenate protein conjugate は少部分にすぎなかった。

3) Pc-albumin complex は Penamaldate 化により 282 mμ 紫外吸収を表わし、Penicilloyl protein conjugate の存在を示す。かつ Levine に準じた Penicilloyl conjugate と免疫学的同一態度を示すことより、Pc-albumin complex の形成は大部分 Penicilloyl protein conjugate の結合様式によるものである。

4) ペニシリンの大量注射を受けたウサギの抗ペニシリン血清に対する Pc albumin complex の免疫反応の結果より、生体内でのペニシリンによる感作過程は、ペニシリンが Penicillenic acid に転換後蛋白とPenicilloyl protein conjugate を形成して完全抗原となるためと思われる。

5) ペニシリン・アレルギーの皮内反応では、conjugate抗原とペニシリン単独を用いた場合、陽性率に有意の差があり、conjugate 抗原による皮内反応はより有効

な検査法である。

獨筆するにあたり、始終御懇篤な御指導と御校閲を賜わった恩師鳥居敏雄教授、真下啓明教授、堀内淑彦助教授に衷心より感謝致します。

文 献

- 1) 堀内淑彦, 谷本普一, 島倉洋, 櫛引昭一: *Chemotherapy*, 5, 168, 1957.
- 2) 鳥居敏雄, 堀内淑彦, 谷本普一: *日本臨床*, 16, 1901, 1958.
- 3) 堀内淑彦: *総合医学*, 17, 320, 1960.
- 4) Levine, B.B.: *J. Exp. Med.*, 112, 1131, 1960.
- 5) Levine, B.B.: *Nature*, 187, 939, 1960.
- 6) Levine, B.B.: *Nature*, 187, 940, 1960.
- 7) Levine, B.B.: *Arch. Biochem. and Biophysics*, 93, 50, 1961.
- 8) Levine, B.B. and Ovary, Z.: *J. Exp. Med.*, 114, 875, 1961.
- 9) De Weck, A.L. and Eisen, H.N.: *J. Exp. Med.*, 112, 1227, 1960.
- 10) Parker, C.W., DeWeck, A.L., Kern, M. and Eisen, H.N.: *J. Exp. Med.*, 115, 803, 1962.
- 11) Parker, C.W., Shapiro, I., Kern, M. and Eisen, H.N.: *J. Exp. Med.*, 115, 821, 1962.
- 12) 中島規道: *アレルギー*, 12, 116, 1963.
- 13) 緒方富雄: *血清学実験法*: 昭19, 南山堂.
- 14) Carpenter, F.H., Turner, R.H. and Du Vigneaud, V.: *J. Biol. Chem.*, 176, 893, 1948.
- 15) Ovary, Z. and Bier, O.G.: *J. Immunol.*, 71, 6, 1953.
- 16) Ovary, Z.: *Progr. Allergy*, 5, 459, 1958.
- 17) Fisher, J.P. & Cooke, R.: *J. Allergy*, 28, 150, 1957.
- 18) Stavitsky, A.B.: *J. Immunol.*, 72, 360, 1954.
- 19) Landsteiner, K. and Jacobs, J.: *J. Exp. Med.*, 64, 625, 1936.
- 20) Landsteiner, K. and Chase, M.: *J. Exp. Med.*, 66, 337, 1937.
- 21) McClosky, M.T. and Smith, M.I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 57, 270, 1944.
- 22) 鳥居敏雄: *Chemotherapy*, 3, 134, 1955.
- 23) 福野謙一, 塩田憲三: *Chemotherapy*, 3, 79, 1955.
- 24) 塩田憲三: *Chemotherapy*, 4, 129, 1956.
- 25) 堂野前維摩郷ら: *アレルギー*, 5, 144, 1956.
- 26) 堂野前維摩郷ら: *日本臨床*, 14, 1590, 1956.
- 27) Josephson, A.S.: *J. Exp. Med.*, 111, 611, 1960.
- 28) Rajka, G.J. and Vincze, E.: *Ann. Allergy*, 16, 291, 1958.

Studies on the Penicillin Allergy

Some Notes on the Antigenic Binding of Penicillin-G to Protein

Morikuni Abe

The Second Department of Internal Medicine, Hokkaido

University, School of Medicine, Sapporo

(Director: Prof. Keimei Mashimo)

The antigenic binding of penicillin-G to protein was investigated. The penicillin albumin complex was prepared by incubating penicillin-G and recrystallized egg white albumin (EA) in saline solution at 37°C for 24 hours. The anti-penicillin antibodies could be developed in guinea pigs and rabbits by injection of the above complex.

The S^{35} labeled penicillin human serum albumin (HSA) complex was assayed for total penicillin residue by taking radioactivity, for penicillenic acid residue spectrophotometrically at 322 $m\mu$, and for protein by Biuret method. The molar ratio of protein and penicillin was 1:16.6 (average of six experiments), whereas protein and penicillenic acid residue was 1:1. The ultraviolet absorption spectrum of the penicillin HSA complex after penamaldate treatment was markedly increased and the difference between the absorption spectra pre- and post-treatment was shown its peak at 282 $m\mu$. It would appear from the above phenomena that the penicillin residue in the penicillin HSA complex was bound to protein mainly by penicilloyl linkage.

The penicillin HSA complex was compared immunologically with the penicilloyl albumin conjugate which was prepared directly from the reaction of Benzyl penicillenic acid and human serum albumin solution.

Using the above conjugates as antigens, passive cutaneous anaphylaxis, tanned cell hemagglutination and agar gel diffusion study by Oakley Fulthorpe method were carried out on the rabbit anti-penicillin EA complex, rabbit anti-penicilloyl EA conjugate and rabbit anti-plain penicillin sera. The strong immunological cross reactions were observed in all experiments, and it was interesting that anti-plain penicillin serum was shown cross reactivity with both antigens as two other sera.

In 700 recipients, the penicillin HSA complex, penicilloyl HSA conjugate and penicillin-G were tested intracutaneously. It was obtained in high percentages that the positive responses to each protein conjugated antigen were observed in the same recipient.

From these results, the mechanism of penicillin hypersensitivity was considered as follows: penicillin-G should be rearranged to benzyl penicillenic acid in vivo, subsequently combined to tissue protein, and then penicillin protein conjugate (penicilloyl conjugate) might immunize animals.