— 原 著 —

β -lactam 系抗生物質の側鎖特異 IgE 抗体と, その測定法 としての modified passive cutaneous anaphylaxis (PCA) inhibition test に関する検討

吉河 達祐

日本医科大学法医学教室 (主任: 渡辺日章教授)

日本医科大学微生物学免疫学教室 (指導: 木村義民教授)

日本医科大学第1外科学教室 (指導: 代田明郎教授)

Studies on specific IgE antibody against side chain of β -lactam antibiotics
and the modified PCA inhibition test as a new measurement method

Tatsusuke Yoshikawa

Department of Legal Medicine, Nippon Medical School

β -lactam antibiotics elicited IgE mediated passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in guinea pigs. These antibodies have a high affinity for the side chain of the drug but have a low affinity for the nucleus of the drug.

In this paper, the effects of the side chain on IgE mediated immune response were studied by PCA inhibition test and the modified PCA inhibition test.

The guinea pigs were passively sensitized with an intradermal injection of antiserum, and 8 days later, the side chain or nucleus of β -lactam antibiotics was injected intravenously before challenging the mixture of antigen and evans blue. PCA titers were depressed by pretreatment rather high concentration of side chain.

Antigens were injected into the guinea pigs which had been passively sensitized with an intradermal injection of the mixture of antiserum followed by the side chain 8 days later. At that time PCA titers were significantly depressed and the specific antibody was detected using a lower dose of the side chain.

To prove the theoretical basis, retentates of the mixture of antibody and the drug extracted from the skin were measured by thin-layer chromatography and maximum UV spectra scanning.

The result showed that the drug bound to the reactive site of IgE antibody and the binding remained in the skin tissue for over 8 days. From these results, it was suggested that the modified PCA inhibition test may be a favourable new method for detecting the specific side chain of β -lactam antibiotics.

Key words : passive cutaneous anaphylaxis, side chain, cephalosporin, drug allergy, guinea pig

緒 言

β -lactam系薬剤に基因する薬剤アレルギー発症に関する major antigenic determinant^{1,2,5-7}は, benzylpenicilloyl-protein 結合物にあると報告されてきた¹⁻⁴。しかしながら, 近年開発された多くの cephalosporin (cephem) 系抗生物質では, その major antigenic determinant 以外に各々の側鎖に強い特異性を持つ抗体の出現が報告されており^{8,9}, この側鎖特異抗体が種々な観点から注目されている。

実験動物において, 側鎖特異抗体を証明するには, ①側鎖の異なる製剤の負荷で各々の側鎖に特異的な anaphylaxis が惹起され, 側鎖を異にする他の薬剤では惹起されないこと, ②各々の側鎖の前処置で抗原抗体反応が阻止されることを確認しなければならない。その方法として一般には, passive cutaneous anaphylaxis (PCA) ならびに PCA inhibition test が行われている。

しかしながら, 従前から薬剤に対する特異抗体を検出する方法として広く用いられている PCA inhibition test は, inhibitor として用いる薬剤またはその構成母核や側鎖部分を惹起注射の 20~30 分前に静注しておいてから惹起抗原を静注する方法で行われている。

ところが, 近年マウス, ラットまたはモルモットを用いた実験系で, IgE 抗体で mediate される反応が, ハプテンである製剤の単独負荷によっても惹起されることが報告されている¹⁰⁻¹⁴。

一方, 側鎖特異抗体の検出法として広く用いられている従前からの PCA inhibition test では, 惹起注射前に前処置としてかなり大量の薬剤またはその側鎖を静注するので, すでにその前処置の際に抗体感作皮膚周辺の細胞にも作用し, 反応部位の chemical mediator を遊離させてしまっている可能性もあるので, 惹起注射時に表現される PCA 値の低下に大きな影響を与えている可能性がある。

そこで著者は, 今回薬剤の側鎖特異抗体の検討に用いられている PCA inhibition test について再検討するため, 前処置する薬剤をあらかじめ抗体と in vitro で混合し, その段階希釈液で動物を感作して行う PCA inhibition test について検討するとともに, 本法が製剤の側鎖特異抗体の測定法として適切であるか否かについて実験的に検討し, いささかの興味ある知見を得たので報告する。

研究材料および方法

(1) 動物

体重 250 g 前後の Hartley 系雌性モルモットを使用した。

(2) 薬品

cefoperazone (CPZ, 台糖ファイザー社製セフォビット Lot. No 44329), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業社製エポセリン Lot. No JA-1300), cefazolin (CEZ, 同社製セファメジン Lot. No ZK-3170), cefmetazole (CMZ, 三共社製セフメタゾン Lot. No F155), aminobenzylpenicillin (ABPC, 明治製菓社製ビクシリン Lot. No PAMD 503) を使用した。6-aminopenicillanic acid (6-APA) および 2,3-dioxopiperadine は富山化学総合研究所から分与されたものを, 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) は Sigma 社製 (Lot. No 62 F-0543) を使用した。製剤の側鎖類似構造物として, 2-aminothiazole は半井化学薬品社製 (Lot. No M3 N5 073) を, 1H-tetrazole は Aldrich Chemical Company 製 (Lot. No 7801 MH) を, phenylacetyl glycine (PAG) は和光純薬工業社製 (Lot. No TSM 7596) をそれぞれ使用し, ABPC-polymer は Smith ら¹⁵の方法で作製したものを実験に使用した。

(3) 免疫・反応用抗原の作製

CPZ, CZX, CEZ および ABPC 製剤各 500 mg と *Ascaris suum* extract (Ase)¹⁶ 100 mg をそれぞれ pH7.2 の phosphate buffered saline (PBS) 20 ml に溶解し, 37°C, 1 時間 incubate した。遊離の薬剤を連続向流透析器¹⁷で除去し, 得られた各抗生剤-Ase 結合物を凍結乾燥し, それぞれ CPZ-Ase, CZX-Ase, CEZ-Ase および ABPC-Ase¹⁸ とした。

(4) 免疫方法

silica gel (和光純薬工業社製 Wakogel) の 5 mg/Tris buffered saline 1 ml に, CPZ-Ase, CZX-Ase, CEZ-Ase および ABPC-Ase 各 10 μ g を混合したものを¹⁹をそれぞれ 1 ml モルモット腹腔内に注射した。以後 10 日に 1 回同濃度の抗原で booster を行い, 50~55 日目に全採血し抗血清を得た。抗体価の測定はモルモットを用いての 8 days PCA test で行った。

(5) 8 days PCA test

剪毛したモルモット背腹部皮内に, 抗血清の生理食塩水による段階希釈液各 0.1 ml を注射し, 8 日後に抗生物質 10 mg/ml, 1 ml と 1% Evans blue (EB)

Fig. 1 Chemical structure of Cephems

Fig. 2 PCA inhibition test

0.5 ml との混合液を静注した。PCA 値は、直径 5 mm 以上の青色斑を示す抗体の最大希釈倍数の逆数をもって示し、1 実験に 3 匹使用しその平均値をもって表に示した。

(6) PCA inhibition test

上記 PCA を行う際に、抗原惹起 20 分前に各製剤の側鎖類似構造物 (inhibitor) を、PCA の抑制が最高に達しその濃度以上では一定の抑制を示す濃度¹⁴⁾で静脈注射し、その後、型通り抗原+EB で惹起注射を行った。PCA 値の減少をもって inhibition の成立とみなし観察した。

(7) Modified PCA inhibition test

各側鎖類似構造物 5 mg/生理食塩水 0.9 ml と抗各抗生剤-Ase 血清 0.1 ml を混合したものを 37°C、5 分間 incubate し、さらに生理食塩水によるこれらの段階希釈液を調製し、その 0.1 ml をモルモット背腹部皮内に注射した。8 日後に抗原を EB とともに静注し PCA の判定を行った。

PCA inhibition test ならびに modified PCA inhibition test 実施の概略は、Fig. 2 に示したとおりである。

(8) モルモット皮内中での薬剤の滞留

1) 試料の調整

ABPC 製剤 10 mg/生理食塩水 0.5 ml、または ABPC 製剤 10 mg/抗 ABPC-Ase 血清 0.5 ml、の各

skin was injected with ABPC preparation 10 mg/ml (0.1 ml) or ABPC-antiABPC antibody mixture.
 injected skin site (1×1 cm)
 microhomogenized 30 min
 centrifuge at 14,000×G, 20 min
 (supernatant)
 (filtrates)
 measurement max O.D. by UV absorption

Fig. 3 Detection of antibiotics in the skin

0.1 ml を、剪毛したモルモット背腹部皮内に注射した。8 日後に注射部位を中心に皮膚全層 1×1 cm を採取し細片化した材料を、microhomogenizer (日本精機社製) で 30 分間摩砕した。14,000×G, 20 分間の遠心上清を限外ろ過して得られたろ過物 (filtrate) を凍結乾燥して以下の試料とした。この際に、ABPC 製剤+抗 ABPC-Ase 血清からのものを Ag-Ab-filt とした。その概略を Fig. 3 に示した。

2) 薄層クロマトグラフィー

Manni ら²⁰⁾、Pokorny ら²¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、試料 1 mg を 1 ml の展開液 (n-butanol: acetic acid: water=60: 15: 25) に溶解し、その 0.025 ml を TLC 用 silica gel coated aluminum sheet (Merck 社製シリカゲル 60 F) 上に直径約 2 mm の範囲にスポットを形成せしめ、自然乾燥した。上記展開液が飽和された密閉展開槽内で、常法どおり上昇法により試料の展開を行った。この条件下では約 2 時間後に溶媒は 10 cm 移動した。展開を中止した後に TLC sheet を自然乾燥した。呈色反応は chloroplatinic reagent²¹⁾ (spraying reagent) を噴霧して 10 分後に薄赤色中に出現する白色のスポットを測定した。相対移動率 (Rf) は、試料の移動距離/溶媒の移動距離率として計算した。

3) UV 領域における最大吸収波長の測定

モルモット皮内から抽出した試料を蒸留水に溶解の上、日立製 model 100-50 spectrophotometer で 340 nm から 190 nm まで吸収波長を変えて、各試料の最大吸収波長を測定した。

結 果

1. β -lactam 系抗生物質の側鎖特異性 IgE 抗体の検討

(1) PCA test による検討

各薬剤と *Ascaris suum* extract の混合液の免疫によって得られた IgE 抗体の特異性を 8 日間 PCA によって検討した。homologous な各抗生物質各 10 mg の惹起によって、各抗体は各々の抗原に特異的な反応を示した (Table 1)。CZX と CEZ 間には各抗体に弱い交叉性 (5 倍 PCA 値) が認められたが、その他は、対応抗原とのみ反応し、また、各薬剤の母核部分である 7-ACA、6-APA とは反応しないことから、得られた抗血清は、側鎖に特異的な IgE 抗体であることが判明した。

Table 1 Antigenic cross reactivity among 6 antigens

antisera	8 days PCA titers					
	challenging antigens (10 mg/ml)					
	CPZ	CZX	CEZ	ABPC	7-ACA	6-APA
antiCPZ	160	0	0	0	0	0
antiCZX	0	80	5	0	0	0
antiCEZ	0	5	160	0	0	0
antiABPC	0	0	0	320	0	0

Tests were carried out in duplicate and PCA titers were expressed as the reciprocal of the highest antiserum dilution giving a positive reaction.

Table 2 In vivo PCA inhibition test

antibody	inhibitor	dose (mg)	8 days PCA titers			
			challenging antigens (10 mg/ml)			
			CPZ	CZX	CEZ	ABPC
antiCPZ-Ase	2, 3-dioxopiperadine	100	40	0	0	0
		10	80	0	0	0
		1	80	0	0	0
		0.1	160	0	0	0
	cefmetazole	100	80	0	0	0
		10	80	0	0	0
		1	160	0	0	0
		0.1	160	0	0	0
	7-ACA	100	160	0	0	0
		—	160	0	0	0
antiCZX-Ase	2-aminothiazole	100	0	40	2.5	0
		10	0	40	5	0
		1	0	40	5	0
		0.1	0	80	5	0
	7-ACA	100	0	80	5	0
		—	0	80	5	0
	antiCEZ-Ase	100	0	5	80	0
		10	0	5	80	0
		1	0	5	160	0
		0.1	0	5	160	0
antiABPC-Ase	7-ACA	100	0	5	160	0
		—	0	5	160	0
	PAG	100	0	0	0	160
		10	0	0	0	160
		1	0	0	0	160
		0.1	0	0	0	320
	6-APA	100	0	0	0	320
		—	0	0	0	320
	none	—	0	0	0	320
		—	0	0	0	320

Eight days after the passive sensitization with antiserum, inhibitors were injected intravenously, and 20 minutes after GPs were challenged intravenously with the mixture of antigen and evans blue dye.

(2) PCA inhibition test による検討

この結果を再確認する目的で PCA inhibition test を行った。方法に示したとおりに、各薬剤の側鎖部分を inhibitor として薬剤惹起 20 分前に静注し, inhibitor

の代わりに saline を静注した対照と比較した (Table 2). 側鎖類似構造物を前もって静注しても、免疫抗原とそれに homologous な惹起抗原との間の反応は, inhibitor を静注しない対照に比して, anti CPZ-Ase

Table 3 In vitro PCA inhibition test

antibody	inhibitor	dose (mg)	8 days PCA titers			
			challenging antigens (10 mg/ml)			
			CPZ	CZX	CEZ	ABPC
antiCPZ-Ase	2, 3-dioxopiperadine	5	10	80	80	80
	cefmetazole	5	20	80	20	80
antiCZX-Ase	2-aminothiazole	5	80	10	80	80
antiCEZ-Ase	1 H-tetrazole	5	40	80	10	80
antiABPC-Ase	PAG	5	80	80	80	10
anti each cephem-Ase	7-ACA	5	80	80	80	80
antiABPC-Ase	6-APA	5	80	80	80	40
	none	—	80	80	80	80

Antiserum was absorbed with the side chain and cephalosporin nucleus as a inhibitor of the drug. These absorbed antisera were injected intradermally for 8 days PCA tests.

血清-CPZ 製剤の系で対照の PCA 値 1:160 が2,3-dioxopiperadine を inhibitor に用いた場合 PCA 値は 1:40 に減少と最大 1/4, 多くは 1/2 の PCA 値の減少にとどまり, 反応が完全には阻止されなかった。また, 同様に各抗生剤の母核部分を静注しても阻止は認められなかった。

(3) Modified PCA inhibition test による検討

側鎖に特異的な反応を示す抗体が側鎖で完全には阻止されなかった結果を再検討する目的で, in vitro において側鎖と抗体を反応させその希釈液をモルモット皮内に注射し, 8日後に惹起注射を行うという PCA inhibition test を行った。8日後の抗原惹起注射によって得られた PCA 値は Table 3 に示すように, 免疫抗原に対応する inhibitors (側鎖) によって阻止された。すなわち, 対照の PCA 値 1:80 に対し, 各々の側鎖を inhibitor として用いると PCA 値は 1:10 となり約 1/8 に減少した。この結果は, 従前の PCA inhibition test に比較すると, 低濃度の inhibitor を使った場合でもその抑制程度が顕著に測定しうることから, PCA inhibition test としてより適切な方法であることが確認された。

2. In vitro PCA inhibition test における薬剤の皮内滞留についての検討

in vitro において抗体と結合した薬剤または側鎖構造物が8日間皮内に滞留し PCA 反応を抑制しえるか否かについて以下の基礎的検討を行った。

まず, Fig. 3 に示した方法によって得られた皮膚抽出物の限外ろ過物 (filtrate) について, 最大吸収波長を測定した (Fig. 4)。対照の ABPC のそれは

270 nm 前後, 同操作から得た skin extract のそれは 280 nm であるのに比較し, ABPC-anti ABPC mixtu-

UV spectra of filtrates

Fig. 4 UV spectra of the filtrates with ultrafiltration from skin and ABPC preparation. ABPC (ABPC filt) and anti ABPC antiserum+ABPC mixture (Ag·Ab filt) were injected intradermally. Eight days after, the skin sites of tests were homogenized and ultrafiltrated with Amicon microcorporation system. The maximum absorption of the samples were measured by scanning in UV range (190 nm-340 nm). Samples from the skin sites 2 days after intradermal injection.

Fig. 5 Rf value obtained with chloroplatinic reagent for ABPC and filtrates from skin
 Development solution : n-butanol : acetic acid : water = 60 : 15 : 20
 Spraying reagent; platinum chloride solution
 Development solution ; pH 2.5
 minimum detective dose ; 19 μ g
 Rf values were calculated from the ratio of mobile height of the test sample and that of development solution.
 0.025 ml of the test material (1 mg/ml) was developed.
 ND : not detected.

re の filt は 274 nm であったが、ABPC-filt は 280 nm であり、ABPC に由来する吸収帯は認められなかった。図には注射後 2 日目の皮膚抽出試料を示した。

次に、filtrates を薄層クロマトグラフィーにかけ、製剤由来物質を確認した。Fig. 5 に示すように、ABPC、ABPC-polymer の Rf 値は各々 0.68, 0.43 および 0.58 であるが、filtrates (ABPC-anti ABPC) は Rf 値 0.28 および 0.43, skin extract は原点に留まっており、spraying reagent でも呈色されなかった。

考 察

β -lactam 系抗生物質、特に cephem 系抗生物質投与後の血清中には、その側鎖に特異性の高い抗体が産生されることが報告されている^{22,23}。Fig. 1 に示されたように、共通の母核をもった CPZ, CZX および CEZ に対する抗体は各々側鎖の異なる他薬剤とは反応しないばかりでなく、母核の 7-ACA によっても PCA が惹起されなかった。7-ACA の PCA 惹起能は弱い²⁴ので、cephem 系薬剤の免疫によって側鎖に対する抗体のみが産生されたとは必ずしも断言できない。

ところで側鎖に対する抗体の特異性を検討するには、従来より、PCA 反応惹起前に前処置として側鎖を静注する PCA inhibition test が行われている。この方法では、inhibitor としてあらかじめ静注される薬剤またはその側鎖の薬理作用により体内の basophil

または mast cell から histamine が遊離する可能性がある¹⁴、事実その際に血中の histamine 量の増加が認められるといわれている²⁴。その結果、PCA 反応惹起局所の histamine 量の消費も当然推測される。すなわち、惹起抗原の静注による感作局所における反応は、あらかじめ投与された inhibitor の影響を受けて、必ずしも正確な PCA titer を示していない可能性がある。

著者は、そこで従来の PCA inhibition test の改良法として、あらかじめ in vitro において被検抗体と薬剤（側鎖）を混合し、その段階希釈液を用いて PCA 反応を行う modified PCA inhibition test を案出した。その結果は Table 3 に示すように、本法は従来の PCA inhibition test (Table 2) よりも低濃度の inhibitor を用いてより鋭敏に測定することが可能であった。すなわち、IgE 抗体とその対応薬剤の混合液の局所投与により、当該組織部位の histamine 遊離が起こることもあろうが、薬剤は 8 日以内に皮内から消失することも明らかであり (Fig. 5), histamine 保有細胞も十分その機能をこの間に回復していることが実証されている²⁵ので、この点からも問題はないと思われる。今回案出した改良 PCA inhibition test の方法を確立化するためには、側鎖または薬剤が抗体と 8 日間も組織中にとどまるか否かを確認しなければならないと考えられる。使用した抗体は、モルモットで作製した IgE type の抗体であるので、その組織固着時間は十分なはずである²⁶が、薬剤についての報告は少

ない²⁷⁻²⁹⁾。それは抗生物質の皮膚への移行等に関する研究で、長期間後の残留についてではなく、本実験の結果を補助するものではなかった。しかしながら、ハプテンが蛋白質と結合すると、吸収スペクトルや蛍光に変化が生じる³⁰⁾。事実、filtratesの最大吸収波長は、対照とした ABPC または、健常組織からの filtratesとも異なっていた。この結果は、薄層クロマトグラフィーで、展開液が pH 2.5 の条件下で IgE・薬剤結合物が解離する³¹⁾ことによって、Rf 値 0.28 および 0.43 に移行する物質として認められたが、健常組織からは検出されなかった。今回の実験では、ABPC としての同定がなされていないが、予備的な実験として、高速液体クロマトグラフィーを用いて ABPC の確認を試みた。その結果、組織中の抗体と結合した ABPC の溶出はごく微量か、ほとんど検出されなかったので表には示さなかったが、さらにカラム条件ならびに中性条件での ABPC の解離について詳細な検討が必要であると考えられた。今回の実験では ABPC を主として使用したが、その側鎖についても同様の結果が得られており、組織親和性の高い IgE 抗体に結合した薬剤またはその側鎖が長時間皮内に残留する可能性が示唆された。

近年実験動物において、IgE で mediate される反応が抗生物質の単独負荷で惹起されることが PCA で確かめられている¹⁰⁻¹⁴⁾。製剤自身のもつ惹起能については、まだ疑問点が多いが、Muranaka ら³²⁾の研究から、ペニシリン系薬物においては、D-benzylpenilloic acid の形が最も惹起能が高いとされている。一般に 2 価以上の抗原は、細胞表面に結合している IgE 抗体と bivalent な結合をした結果、細胞膜表面の縮合等が起こり、その後、種々の chemical mediator が遊離されるが、抗生物質等の低分子物質は、上記の現象が起こらないとされている。しかしながら、八木¹⁴⁾は、モルモット骨髓から分離した basophil を IgE で非働性に感作した後に ABPC を添加すると、ヒスタミン遊離が観察されたと報告し、薬剤によっては、それ単独の形で chemical mediator を遊離する可能性のあることが示唆された。

以上の報告からも、抗生物質特異 IgE 抗体の証明には、あらかじめ抗体と薬剤を in vitro で混合し、その反応 site を block した後に皮内注射するという改良 PCA inhibition test は、薬剤の側鎖特異的 IgE 抗体の検出に極めて有効な方法であると結論された。

結 論

β -lactam 系抗生物質、特に cephem 系抗生物質に対する抗体は側鎖に強い特異性を示すとされている。この側鎖特異性抗体を測定する方法の一つとして広く用いられている PCA inhibition test について検討するとともに、その改良法を案出し以下の結果を得た。

1) β -lactam 系抗生物質によって産生された IgE 抗体は、各々の対応薬剤に対し特異性の高い抗体価を示すことが、8 日間 PCA で証明された。

2) 上記の IgE 抗体は各々の側鎖を inhibitor とする PCA inhibition test によって側鎖特異的抗体であることが実証されたが、その母核を inhibitor とした場合には inhibition がみられなかった。

3) あらかじめ in vitro で側鎖と、それに対応する IgE 抗体を混合し、その段階希釈液をモルモットに皮内注射し、8 日後に抗原で PCA を惹起するという著者の案出した modified PCA inhibition test によって検討したところ、側鎖特異的な抗体を感度よく検出することができた。

4) modified PCA inhibition test の論理を明らかにするため抗体に結合した薬剤またはその側鎖の皮内滞留時間を測定したところ、8 日以上残留することが maximum ultraviolet absorption および thin-layer chromatography で証明された。

以上の結果から、薬剤、特にその側鎖に対する特異 IgE 抗体価の定量的測定法として著者が考案した modified PCA inhibition test が十分な免疫学的根拠に基づいた感度のよい検出法であることが証明された。

稿を終わるにあたり、御校閲賜った日本医科大学微生物学・免疫学教室木村義民教授ならびに本研究を直接御指導くださった竹内良夫講師、また本研究の機会を与えてくださった代田明郎教授、渡辺日章教授に深謝するとともに、御協力いただいた微生物学免疫学教室員ならびに法医学教室員各位に感謝致します。

なお本論文の要旨は、昭和 59 年、第 32 回日本化学療法学会総会で発表した。

文 献

- 1) Levine, B.B. and Ovary, Z.: Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. The N (D- α -benzylpenicilloyl) group as antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin. G. J. Exp. Med., **114**, 875~903, 1961.
- 2) Batchlor, F.R. and Dewdney, J.M.: Some aspects of penicillin allergy. Proc. R. Soc. Med., **61**, 897~899, 1968.

- 3) Stewart, G.T. : Allergic residues in penicillin. *Lancet*, **1**, 1177~1183, 1968.
- 4) 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). アレルギー, **26**, 10~16, 1977.
- 5) Levine, B.B. : Studies on the mechanism of formation of the penicillin antigen. 1. Delay allergic cross-reaction among penicillin G and its degradation products. *J. Exp. Med.*, **121**, 1131~1154, 1960.
- 6) Levine, B.B. : Studies on formation of the penicillin antigen. 2. Some reaction of D-benzylpenicillenic acid in aqueous solution at pH 7.5. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 50~55, 1961.
- 7) Levine, B.B. : Studies on the dimensions of the rabbit antibenzylpenicilloyl antibody combining sites. *J. Exp. Med.*, **117**, 161~183, 1963.
- 8) 竹内良夫, 西村葉子, 木村義民 : 新合成ペニシリン T-1220 に関する免疫学的研究. *Chemotherapy*, **26**, 609~613, 1978.
- 9) 柴田皓示, 渥美剛, 西田聖, 木下与四男, 堀内淑彦 : Cephalothin の抗原性; 特に benzylpenicillin との交叉性について. アレルギー, **18**, 108~112, 1967.
- 10) Igarashi, H., Koizumi, K. and Muranaka, M. : Eliciting antigenicities of benzylpenicillin, ampicillin and carbenicillin preparations examined with the reagin-mediated passive cutaneous anaphylaxis system. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **57**, 341~348, 1978.
- 11) Okumura, H., Takeda, K. and Horiuchi, Y. : Benzylpenicillin preparation can evoke a systemic anaphylactic reaction in guinea pig. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **62**, 276~282, 1978.
- 12) Muranaka, M., Tadokoro, K., Hirai, K., Koizumi, K., Fukuba, S. and Suzuki, S. : IgE antibodies produced in mice instrumental in analyses of antigenicity of cephalothin preparation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **63**, 275~283, 1980.
- 13) Iwata, M., Tokiwa, H. and Matuhashi, J. : Detection and characterization of polymers in cephalothin by passive cutaneous anaphylaxis in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**, 132~137, 1983.
- 14) 八木和郎 : Aminobenzylpenicillin の単独投与で惹起されるモルモットを用いての PCA 反応ならびにその発来機作に関する研究. アレルギー, **33**, 148~157, 1984.
- 15) Smith, H., Dewdney, J. M. and Wheeler, A.W. : A comparison of amounts and the antigenicity of polymeric materials formed in aqueous solution by some β -lactam antibiotics. *Immunology*, **21**, 527~533, 1971.
- 16) Sterejan, G.H. and Surlan, D. : Reaginic antibody production to *Ascaris suum* allergen Asc 1. 1. The function of glutaraldehyde polymerized antigen in the induction of reaginic (IgE) antibodies in the rat. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **54**, 487~501, 1977.
- 17) Zeinch, R.A., Pillary, V.K.G., Smith, E.C., Ebawa, E., Fiorella, B.J. and Dunea, G. : Thin-layer microtubular continuous flow countercurrent dialysis. *J. Lab. Clin. Med.*, **79**, 648~656, 1972.
- 18) Levine, B.B. and Redmond, A.P. : The nature of the antigen-antibody complexes initiating the specific wheal-flare reaction in sensitized man. *J. Clin. Invest.*, **47**, 556~567, 1968.
- 19) Mancino, D. and Bevilacqua, N. : Further studies on the adjuvant effect of silica on IgE antibody production in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **59**, 427~431, 1979.
- 20) Manni, P.E., Lipper, R.A., Blaha, J.M. and Hem, S.L. : Analysis of potassium penicillin G and its degradation products by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **76**, 512~515, 1973.
- 21) Pokorny, M., Vitezic, N. and Japelj, M. : Detection of penicillins with chloroplatinic acid on thin-layer chromatoplate. *J. Chromatogr.*, **77**, 458~460, 1973.
- 22) 木村義民, 竹内良夫, 西村葉子 : Cefoxitin の抗原性と免疫学的特異性に関する検討. *Chemotherapy*, **26** (Suppl. 1), 227~232, 1978.
- 23) 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** (Suppl. 3), 206~211, 1982.
- 24) 栗山純一, 竹内良夫, 吉河達祐, 木村義民 : 薬剤アレルギーに関する基礎的研究 (22) 重合化によって生じる抗原特異性の減弱について. 第 34 回日本アレルギー学会総会プログラム講演抄録, p. 705, 1984.
- 25) Drobis, J.D. and Siraganian, R.P. : Histamine release from cultured human basophils; Lack of histamine resynthesis after antigenic release. *J. Immunol.*, **117**, 1049~1053, 1976.
- 26) Bach, M.K., Bloch, K.J. and Austen, K.F. : IgE and IgG_A antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. *J. Exp. Med.*, **133**, 752~771, 1971.
- 27) 吉田哲憲, 大浦武彦, 沖本雄一郎, 飯田和典, 斉藤玲 : 抗生物質の投与速度と皮膚および熱傷組織内濃度の動態について. 熱傷, **1**, 195~202, 1976.
- 28) 吉田哲憲, 沖本雄一郎, 飯田和典, 松本敏明, 大浦武彦 : 抗生物質の皮膚への移行についての研究. 形成外科, **22**, 305~313, 1979.
- 29) 吉田哲憲, 沖本雄一郎, 飯田和典, 松本敏明, 大浦武彦, 佐藤清 : 形成外科領域における tobramycin の基礎的検討; とくに家兎皮膚への移行を中心とした検討. *Chemotherapy*, **27**, 260~264, 1979.
- 30) Volick, K., Parker, C.W. and Eisen, H.N. : Excitation energy transfer and the quantitative study of the antibody hapten reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 1400~1482, 1960.
- 31) Ishizaka, T. and Ishizaka, K. : Mechanism of passive sensitization. IV. Dissociation of IgE molecule from basophil receptors at acid pH. *J. Immunol.*, **112**, 1078~1084, 1974.
- 32) Ueno, H., Nishikawa, M., Suzuki, S. and Muranaka, M. : Eliciting IgE mediated passive cutaneous anaphylactic reaction by synthetic D-benzylpenicilloic acid. *Mol. Immunol.*, **21**, 37~42, 1984.

(受付 : 1985 年 1 月 12 日)