吸着剤によるHB抗原の除去に関する研究

高島征助* 黒川圭一* 高木俊昭*
山根 健*² 大高憲二*³ 村山良介*²

Study of Removal of Hepatitis B Antigen Using the Adsorption Method

Seisuke Takashima, Keiichi Kurokawa*, Toshiaki Takagi*,
Ken Yamane*², Kenji Ootaka*³, Ryosuke Murayama*²*

** Department of Medical Research and Development, Kuraray Co., Ltd.
1621, Sakazu, Kurashiki-city, Okayama, Japan*

**² Laboratory of Anesthesiology Oohashi Hospital, Toho University
2-17-6, Oohashi, Meguro-ku, Tokyo, Japan*

**³ Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Senbai Hospital
1-4-3, Mita, Minato-ku, Tokyo, Japan*

Abstract

In an attempt to decrease hepatitis B antigen (HBsAg and HBeAg) in patient plasma, adsorption method has been studied in vitro.

Various adsorbents such as calcium phosphate, cationic ion exchanging resins, anionic ion exchanging resins, and several Brønsted acid type adsorbents (silica-alumina, white carbon and zeolite) were used in batch system.

It was observed that acid type adsorbents such as calcium phosphate, cationic ion exchanging resins, silica-alumina and white carbon were effective to the adsorption of HBsAg in general. However, the adsorbent of very weak acidity (zeolite) and base type adsorbent (anionic ion exchanging resins) showed very slight or no effect on the adsorption of HBsAg in general.

It was also suggested that acidity of these adsorbents was very important for the adsorption activity for HBsAg and less so for HBeAg.

I. 緒 言

B型肝炎ウイルス (HBV) によって引き起こされる血清肝炎はB型肝炎抗原 (HBsAg) 保有

* ㈱クラレ メディカル研究開発室

*² 東邦大学 大橋病院麻酔科

*³ 東京専売病院 産婦人科
(原稿受付: 昭和61年8月25日)

者の血液の創傷部への接触により感染する。このB型肝炎 (HB) に罹患した場合、約10%は慢性肝炎、さらには肝硬変症・肝ガンへと進行するといわれている。HBを発病し慢性肝炎へと移行した患者の治療としては、抗ウイルス療法^{1,2)}、免疫の賦活化^{3,4)}などが行われているが確立されたものはない。最近、患者の血液中の

(2) 医器学 Vol. 56, No. 11 (1986)

HBAg 濃度の低減が免疫療法をより有効にするとの報告があり⁵⁾, double filtration plasma pheresis を利用する方法や抗体を固定した吸着剤を用いた吸着除去法などが試みられている.

著者らは, これまでに紫外線照射法(254nm)や吸着剤を用いる方法などによって血漿中の HBAg の低減化について検討し⁶⁾, 先に定性的に酸性吸着剤が有効であることを報告した⁷⁾.

今回, 酸性吸着剤 (Brønsted 型) についてさらに詳細な検討を行った結果, 酸強度には至適濃度領域が存在すること, また両性物質のリン酸カルシウム系吸着剤も血漿中の HBAg を効率的に除去し, しかもその吸着能は Ca/P 比に依存することなど興味ある知見が得られたので報告する.

II. 実験材料及び方法

1. 実験材料

HBAg 含有血漿としては, HBAg (s, e) (+) の人血漿を用いた.

吸着剤としては, リン酸カルシウム ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$; クラレ), シリカ/アルミナ (Davison Co., 日化精工^株), 活性白土 (ミズサワ化学), ゼオライト ($\text{Na}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3(\text{SiO}_2)_x(\text{H}_2\text{O})_x$; 昭和ユニオン), イオン交換樹脂 [陰イオン交換樹脂: IRA-45, 47, 401, 411, 陽イオン交換樹脂: IR-120B, IRC-50, 84, 718] (オルガノ) を用いた.

2. 実験方法

1) HBAg の吸着

各々の吸着剤を1gずつ正確に秤量し, 12 ml の試験管に入れる. これに生理食塩液を 3 ml 加え, 2時間の減圧操作により脱泡脱気した後実験に供した.

このように調製した吸着剤に HBAg (s, e) (+) の血漿を 3 ml 加え, ミキサーで30秒間攪拌し, 4°Cで 24時間放置した後, HBsAg 及び HBeAg を測定して未処理のものと比較した. 24時間の放置以外は全て室温で操作を行った.

2) HBAg (s, e) の測定法

血漿中の HBsAg 及び HBeAg の測定はダイナボット社製の測定キットを用いた RIA 法

により行った. 結果には titer として (検体カウント数)/(陰性コントロールの平均値 $\times$ 2.1) の値を示した.

3) 吸着剤の酸性度の測定法

吸着剤を約 0.05~1 g を精秤し, 0.01 規定水酸化ナトリウム溶液 5~10 ml 中に浸漬し, 15秒間振盪した. 室温にて1時間放置した後 3,000 rpm で10分間遠心分離して吸着剤を沈降させた. 上清液を約 2~5 ml 採取し, フェノールフタレインを指示薬として加え, 0.01規定塩酸で中和滴定を行った. アルカリ消費量から吸着剤の単位重量当りの酸性点の数 (水素原子数/吸着剤重量に換算) を算出した.

4) リン酸カルシウムにおける酸性度及び塩基性度の測定法

リン酸カルシウムには Ca と P の存在により酸性点と塩基性点の両性の存在が考えられ, その比率を変えることにより酸性点と塩基性点の存在比が変わることが考えられる. そこで今回用いたリン酸カルシウムについて, 塩酸または水酸化ナトリウム溶液を加えてその pH 値の変化を見ることにより酸・塩基の強さを確認した. 操作としては, リン酸カルシウムを約 1.5 g 精秤し, 0.01規定水酸化ナトリウム水溶液または 0.01 規定塩酸をそれぞれ 5 ml 加え, ミキサーで攪拌後24時間室温で放置してそれらの水溶液の pH 値を測定した.

5) 血漿蛋白への影響

各吸着剤の血漿蛋白の吸着能をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) 法にて検討した. 各吸着剤 1 g に生理食塩液 3 ml を加えて室温 30分間 120 cpm で振盪した. 振盪後 GPC (カラム: 東洋曹達^株 G-3000-SW, 移動相: クエン酸緩衝液 pH 6.0) でアルブミン及びグロブリン濃度を測定した. 有意差検定は Student の t 検定で行った.

III. 実験結果

1. HBAg の吸着

各吸着剤の HBsAg 及び HBeAg の吸着能を表 1~4 に示す. なお, ここで採用した RIA 法による HBAg の titer 測定値の INDEX は, HBsAg; (-) < 1, 5 < (+)

表 1 Adsorption activities of calcium phosphate for HBsAg in plasma

calcium phosphate	titer value of HBsAg		acidity of adsorbent (the number of H/g)	reference
	HBsAg	HBeAg		
blank value	48.8 ± 0.95	4.7 ± 0.20	-	in serum
1	3.4 ± 0.05	0.8 ± 0.05	2.89K	Ca/P = 1.48 pore size, 30nm
2	0.9 ± 0.05	0.7 ± 0	3.31K	Ca/P = 1.64 pore size, 40nm
3	0.8 ± 0	0.7 ± 0.05	5.51K	Ca/P = 1.66 pore size, 22nm
4	0.8 ± 0	0.7 ± 0	5.86K	Ca/P = 1.66 pore size, 26nm
5	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0	6.19K	Ca/P = 1.66 pore size, 30nm
6	0.7 ± 0.10	0.8 ± 0.10	4.30K	Ca/P = 1.68 pore size, 40nm
7	1.2 ± 0.05	0.9 ± 0	5.08K	Ca/P = 1.66 pore size, 20nm

Each value represents mean ± S.E.M.

HBsAg INDEX : HBsAg - < 1, 5 < +

HBeAg - < 1, 2 < +

K = 6.02×10^{23} (Avogadro's number) $\times 10^{-5}$

表 2 Adsorption activities of Bronsted type adsorbents for HBsAg in plasma

adsorbent	titer value of HBsAg		acidity of adsorbent (the number of H/g)	reference
	HBsAg	HBeAg		
blank value	48.8 ± 0.95	4.7 ± 0.20	-	in serum
silica-alumina (Davison Co.)	0.9 ± 0.05	0.8 ± 0	9.05K	SiO ₂ -Al ₂ O ₃ Si/Al = 4.40
silica-alumina (Nikka seikoh Co.)	1.0 ± 0.15	0.7 ± 0.15	4.09K	SiO ₂ -Al ₂ O ₃ Si/Al = 0.82
white carbon (Mizusawa Chem.)	0.9 ± 0.05	1.1 ± 0.05	23.5K	Si/Al = 3.31
zeolite (Showa Union Co.)	7.7 ± 0.40	1.1 ± 0.10	1.77K	Na ₂ O-Al ₂ O ₃ (SiO ₂) ₂ (H ₂ O) ₂ Si/Al = 1.46

Each value represents mean ± S.E.M.

HBsAg INDEX : HBsAg - < 1, 5 < +
HBeAg - < 1, 2 < +K = 6.02×10^{23} (Avogadro's number) $\times 10^{-5}$

HBeAg ; (-) < 1, 2 < (+)
とされている。

まず, HBsAg については, 未処理対照値の 48.8 ± 0.95 に対してリン酸カルシウム, シリカ/アルミナ, 活性白土及び陽イオン交換樹脂は陰性値, すなわち 1 以下の値を示し, HBsAg の著明な減少を示した。これに対してゼオライトは 7.65 ± 0.40 と減少は示したものの陽性の域

を脱し得ず, また, 陰イオン交換樹脂では 20~50 の値を示し著明な減少はみられなかった。

HBeAg については, 未処理対照値の 4.7 ± 0.2 に対し, リン酸カルシウム, シリカ/アルミナ, 活性白土, ゼオライト, 陽イオン交換樹脂で陰性値が得られ, HBeAg の除去に有効であることが確認されたが, 陰イオン交換樹脂はほとんど活性を示さなかった。

(4) 医器学 Vol. 56, No. 11 (1986)

表 3 Adsorption activities of cationic ion exchanging resins for HBAg in plasma

ion exchanging resin	titer value of HBAg		acidity of adsorbent (the number of H/g)	reference
	HBsAg	HBeAg		
blank value	48.8 ± 0.95	4.7 ± 0.20	-	in serum
IR-120B	0.9 ± 0.10	1.1 ± 0	48.5K	active site; SO ₃ H
IRC-50	7.6 ± 0.25	0.8 ± 0.05	9.96K	active site; COOH
IRC-84	0.6 ± 0.05	1.0 ± 0.05	43.0K	active site; N<COOH COOH
IRC-718	0.8 ± 0.05	1.1 ± 0.05	9.48K	active site; N<COOH COOH

Each value represents mean ± S.E.M.

HBAg INDEX : HBsAg - <1, 5 <+
HBeAg - <1, 2 <+

$$K = 6.02 \times 10^{23} (\text{Avogadro's number}) \times 10^{-5}$$

表 4 Adsorption activities of anionic ion exchanging resins for HBAg in plasma

ion exchanging resin	titer value of HBAg		basicity of adsorbent (the number of H/g)	reference
	HBsAg	HBeAg		
blank value	48.8 ± 0.95	4.7 ± 0.20	-	in serum
IRA-45	27.8 ± 0.85	2.3 ± 0.15	8.11K'	active site; N(R) ₂ ,NHR,NH ₂
IRA-47	50.9 ± 1.00	1.0 ± 0	5.61K'	active site; poly amine
IRA-401	44.6 ± 3.75	4.8 ± 0.10	5.54K'	active site; N≡(CH ₃) X
IRA-411	21.8 ± 2.05	1.6 ± 0.10	3.90K'	active site; N≡(CH ₃) X C ₂ H ₄ OH

Each value represents mean ± S.E.M.

HBAg INDEX : HBsAg - <1, 5 <+
HBeAg - <1, 2 <+

$$K' = 6.02 \times 10^{23} (\text{Avogadro's number}) \times 10^{-3}$$

2. 酸性度

酸性度に関しても表 1 - 4 に各吸着剤の酸性度として単位重量当りの酸性点の数(水素原子数/吸着剤重量に換算)を示した。

リン酸カルシウムでは Ca と P の比によってある程度酸性度が異なり, また他の吸着剤(シリカ/アルミナ, 活性白土, ゼオライト)についても, 酸強度に多少の差はあるものの, 全て酸性点を有するいわゆる Brønsted 酸型のものであることが確認できた。HBsAg の吸着能との関係としては, リン酸カルシウム-1 が酸性度 2.89 K ($K=6.02 \times 10^{23} \times 10^{-5}$) で HBsAg の titer は 3.45, ゼオライトが 1.77 K で 7.65 と低い酸性度で高い titer 値を示している。し

かし, HBeAg については特に酸性度の違いによる差はみられなかった。

3. リン酸カルシウムの酸性度及び塩基性度

リン酸カルシウムに塩酸水溶液または水酸化ナトリウム水溶液を加えた場合の pH 値の変化を表 5 に示した。塩酸を加えた場合の pH 値の上昇, 水酸化ナトリウムを加えた場合の pH 値の低下いずれもみられ, リン酸カルシウムには酸性点と塩基性点の両方が存在することが確認でき, それぞれの強さは Ca/P 値に依存することが判別した。

4. 血漿蛋白への影響

表 6, 7 に示すように, アルブミンについては陽イオン交換樹脂, ゼオライトに有意な減少

表 5 Comparison of acidity and basicity on various calcium phosphate

Calcium phosphate	Ca/P	pore size (nm)	0.01N HCl aq. soln. 5 ml added		0.01N NaOH aq. soln. 5 ml added	
			weight of ad- sorbent (g)	pH of soln.	weight of ad- sorbent (g)	pH of soln.
blank	-	-	-	1.92	-	11.47
1	1.48	30	1.5104	6.08	1.5284	7.13
2	1.64	40	1.5073	6.29	1.5034	8.15
3	1.66	22	1.5044	6.00	1.4989	7.15
4	1.68	26	1.5019	6.19	1.4950	7.38
5	1.66	30	1.4981	7.11	1.4940	9.51
6	1.68	40	1.5009	6.24	1.5054	10.81

表 6 Adsorption activities of calcium phosphate and Brønsted acid type adsorbents for albumin and globulin in plasma

adsorbent	albumin conc.(g/dl)	globulin conc.(g/dl)
control	2.32 ± 0.075	1.16 ± 0.095
calcium phosphate 1	2.15 ± 0.010	1.41 ± 0.115
2	2.26 ± 0.035	1.47 ± 0.080
3	2.10 ± 0.070	1.41 ± 0.105
4	2.19 ± 0.030	1.35 ± 0.140
5	2.23 ± 0.015	1.32 ± 0.055
6	2.33 ± 0.290	1.40 ± 0.085
7	2.09 ± 0.385	1.26 ± 0.340
white carbon (Mizusawa Chem.)	1.81 ± 0.040	1.20 ± 0.195
zeolite (Showa Union Co.)	1.41 ± 0.175*	0.85 ± 0.105*
silica alumina (Davison Co.)	1.92 ± 0.535	1.06 ± 0.295
silica alumina (Nikka seikoh Co.)	1.24 ± 0.385	0.74 ± 0.185*

Each value represents mean ± S.E.M.

* p < 0.05,

表 7 Adsorption activities of ion exchanging resins for albumin and globulin in plasma

adsorbent	albumin conc. (g/dl)	globulin conc. (g/dl)
control	2.78 ± 0.110	2.14 ± 0.080
IRA-45	2.83 ± 0.010	2.11 ± 0.015
-47	2.63 ± 0.485	1.99 ± 0.125
-401	3.09 ± 0.215	2.45 ± 0.235
-411	3.35 ± 0.535	2.56 ± 0.430
IR-1208	2.26 ± 0.090*	0.13 ± 0.015**
IRC-50	2.22 ± 0.100*	1.63 ± 0.010*
-84	1.68 ± 0.065**	1.25 ± 0.005**
-718	1.39 ± 0.030**	1.32 ± 0.105*

Each value represents mean ± S.E.M.

* p < 0.05, ** p < 0.01

(6) 医 器 学 Vol. 56, No. 11 (1986)

がみられ、グロブリンには陽イオン交換樹脂、シリカ／アルミナ及びゼオライトに有意な減少が認められた。リン酸カルシウム及び陰イオン交換樹脂ではアルブミン、グロブリンには有意な変化は認められなかった。活性白土ではクエン酸で抗凝固処理した血漿が凝固するという負効果が発現した。

V. 考 察

HB に罹患し慢性化した場合、血中に大量の HBsAg 及び HBeAg の存在が認められ、このうち、大量の HBsAg の存在は cytotoxic T-cell の抑制⁸⁾や抗原非特異的免疫の抑制作用⁹⁾を引き起こすことが報告されている。

HBeAg の慢性 B型肝炎における臨床的意義はまだ完全には解明されていないが、感染性は極めて大きいと言われている¹⁰⁾。さらに、血中の HBAg の除去・低濃度化処理が抗ウイルス療法や免疫賦活療法をより有効にすることが最近報告されている⁵⁾。

HBAg の除去法については汙過膜を用いる方法⁵⁾や抗体を固定化した担体を用いた吸着法¹¹⁾が試みられている。このうち、抗体を用いる吸着法は、その抗体の固定化法が煩雑であり、しかも高価であるなどの多くの問題を有しており、より簡便で扱いやすく、安価な、しかも効果的な吸着剤が必要である。

今回、リン酸カルシウムなどが HBAg を有効に吸着し、血中の抗原がかなり高濃度であっても陰性レベル以下にまで低下させることが可能であることを見出した。

各吸着剤の酸性度と HBAg の吸着能の相関関係は酸性度が大きいほど HBAg をより有効に除去できること、そして陰イオン交換樹脂はほとんど効果がないことなどから酸性点を有することが HBAg の吸着において重要な因子であると思われる。さらに、HBeAg は弱い酸性度のものでも吸着されるが、HBsAg に関しては、1 g 当りの酸性点の数として約 3 K ($K = 10^5 \times 6.0 \times 10^{23}$) より低い弱い酸性度のものでは吸着能力は低下し、より強い酸性度を必要とすることが判明した。

リン酸カルシウムは表 5 から明らかなように、

酸性と塩基性の両性を示すが、塩基性の程度の差による HBAg の吸着能の差はみられず、また、陰イオン交換樹脂がほとんど効果を有しないという結果からも、塩基性点は HBAg の吸着にはあまり重要ではないと考えられる。

HBAg のうち、HBsAg は直径 42 nm の Dane 粒子、22 nm の小型球状粒子及び小型球状粒子が融合した管状粒子の 3 種類が認められており、また、HBeAg は Dane 粒子の芯の内部に存在する非粒子構造物でより小さいものといわれている¹²⁾。リン酸カルシウムの場合、今回、孔径の異なる数種の試料について実験を行ったが、Ca/P 比が同じ程度、すなわち、同じ程度の酸性度であれば孔径が異なっても HBsAg や HBeAg の吸着能はほとんど変わらず、また粒子の大きさと孔径についても特に一致が認められないことから、HBAg の吸着は微小孔に入り込むことによるような物理的な吸着ではなく、表面での静電的な吸着によるものであろう。すなわち、吸着体の構造において、HBAg が接触できる表面積を大きくする意味においての微小孔の存在は有意義であるが、その孔径の差異による影響はそれほど大きな意義を持たないことが示唆される。

血漿蛋白に対する影響をみるためにアルブミン及びグロブリンの変化を GPC によって検討したが、陽イオン交換樹脂ではアルブミン及びグロブリンは吸着による有意な減少が認められた。このことから、HBAg の吸着と同様に酸強度が大きく影響していると考えられる。従って、血漿中のアルブミン、グロブリンに変化を及ぼさないためには吸着剤の単位重量 (1 g) 当りの酸性点が 9 K 以下が適しているものと考えられる。

これらのことから、血漿中の HBAg を血漿蛋白に影響なく吸着除去するためには適度な (吸着剤 1 g 当りの酸性点の数にして 3 K - 9 K 程度) 酸性度を有する吸着剤 (Brønsted acid 型) が適していると思われ、その意味からリン酸カルシウムは臨床応用においても有効な吸着剤となりうる可能性が期待できる。

IV. 結 語

血漿中の HBsAg の吸着除去法を検討し以下のような結果を得た.

- 1) 血漿中の HBsAg の吸着には酸性度が重要なファクターとなり, Brønsted 型の酸性吸着剤が有効である.
- 2) HBeAg の吸着は弱い酸性度を有する吸着剤でも可能である.
- 3) HBsAg の吸着には HBeAg の場合よりも酸性度が重要であり, 弱い酸性度では吸着されにくい.
- 4) 吸着剤の酸性度が強すぎると血漿蛋白の吸着あるいはダイマー化などの現象が認められる. 従って, HBsAg の吸着剤としては, 単位重量当りの酸性点の数が $3\text{K}-9\text{K}$ ($\text{K}=10^5 \times 6.02 \times 10^{23}$) の吸着剤が適当である.

(本文中の一部は, 第60, 61回日本医科器械学会大会において発表した)

謝 辞

本研究を実施するに当り, 終始, 御援助を賜りました, 大塚製薬㈱大塚アッセイ研究所の各位に対して, 改めて謝意を表します.

参 考 文 献

- 1) Greenberg, H. B., Pollard, R. B. and Lutwick, L. I.: Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 295 : 517-522, 1976
- 2) Bassendine, M. F., Chadwick, R. G. and Salmeron, J.: Adenine arabinoside therapy in HBsAg-positive chronic liver disease : A controlled study. *Gastroenterology*, 80 : 1016-1022, 1981
- 3) Kohler, P. F., Trembath, J. and Dubosi, R. S.:

Immunotherapy with antibody, lymphocytes and transfer factor in chronic hepatitis B. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2 : 465-471, 1974

- 4) Sano, M., Takeuchi, T. and Ito, K.: Transfer factor in treating hepatitis B. *N. Engl. J. Med.*, 296 : 53-54, 1977
- 5) 西原利治, 前田隆, 藤川正直, 富田昭, 宮崎正子, 大西三朗, 伊藤憲一, 山本浩志: Double filtration plasma pheresis による血中B型肝炎ウイルス除去に関する基礎的検討, 人工臓器, 14(4) : 1762-1765, 1985
- 6) 山根健, 吉田明, 内田隆治, 村山良介: 紫外線照射におけるHBVの変化. 紫外線, 2(2), 146-151, 1984
- 7) 山根健, 村山良介, 高島征助, 佐藤隆光: 血漿中のHB抗原の吸着除去法. 医器学, 55(4), 227, 1985
- 8) 西原利治, 大西三朗, 伊藤憲一: HLA restriction をうける HBs 抗原特異的 killer T 細胞活性の測定. 肝臓, 25 : 178-184, 1984
- 9) Margolese, R.G., Evelynisrael and Wainberg, M.A.: Non-specific inhibition by virus particles of human lymphocyte mitogenesis. *Clin. Exp. Immunol.*, 41 : 243-251, 1980
- 10) Shikata, T., Karasawa, T., Abe, K., Uzawa, T., Suzuki, H., Oda, T., Imai, M., Mayumi, M. and Moritsugu, Y.: Hepatitis B e Antigen and infectivity of Hepatitis B Virus. *J. Infect. Dis.*, 136 : 571-576, 1977
- 11) 大城孟, 森武貞, 上村八尋, 阪本昇: HBs 抗体固定化フィルターによるHBウイルス吸着除去. 人工臓器, 14(2), 608, 1985
- 12) Takahashi, K., Imai, M., Miyakawa, Y., Iwakiri, S. and Mayumi, M.: Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus : Evidence for the nonidentity of e antigen with immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 : 1952-1956, 1978