1,9-Nonanedial および 2-Methyl-1,8-octanedial のB型肝炎ウイルス 表面抗原に及ぼす影響^{*1}

松岡 一忠

国立長崎中央病院薬剤科^{*2}

Reduction of Reactivity of Hepatitis B Virus Surface Antigen with 1,9-Nonanedial and 2-Methyl-1,8-octanedial

KAZUTADA MATSUOKA

Department of Pharmacy, Nagasaki Chuo National Hospital

(Received May 12, 1986)

1,9-Nonanedial (NDL) and 2-methyl-1,8-octanedial (NDL : 2-methyl-1,8-octanedial=1 : 1, INDL) belong to dialdehyde compounds as well as glutaraldehydes, and it is presumed to show the similar reactivity to Hepatitis B virus. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) was treated with 0.04 mM NDL, 0.04 mM INDL, 0.04 mM glutaraldehyde and 10% formalin solution, and the titer was determined according to the method of radioimmunoassay. HBsAg were as follows : PLC/PRF/5 cells cultured medium, purified HBsAs coated beads and HBeAg positive sera.

NDL, INDL and glutaraldehyde (adjusted to pH 8.0 respectively) indicated the reduction of antigenicity of HBsAg (cultured medium and beads), but formalin did not. Moreover, NDL reduced the titer of HBsAg (HBeAg positive sera) to half for at least 10 minutes.

These results suggest that NDL and INDL may be employed for disinfectant to Hepatitis B virus.

Keywords—HBsAg; 1,9-nonanedial; 2-methyl-1,8-octanedial; disinfectant

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) の研究は、組織培養法の系が確立しないまま遺伝子組み換えを利用してその全遺伝子配列が解明され¹⁻³⁾、さらにワクチン作りのためのHBVの表面抗原 (HBsAg) の蛋白を酵母菌の助けをかりて開始された^{4,5)}が、病院等のHBVに感染の機会が多い職場ではHBVに対する抗体 (HBIG) が常備されているものの依然としてHBVの水平感染の危険性は存在する。その予防のための消毒法としては多くの経験および報告からWHOの基準となるレポート⁶⁾があり実際に応用されている。

一般に、ある消毒剤がウイルスに効果があるか否かを

調べようとする場合、TCID₅₀ (Tissue Culture Infectivity Doses 50%) という値を用いる。ホルムアルデヒドが口蹄疫ウイルスのTCID₅₀に及ぼす影響を検討した報告⁷⁾とは異なり、HBVの場合は*in vitro*による組織培養実験が現段階では不可能なため、ヒト⁸⁾やチンパンジー⁹⁾のような特殊な感染実験を除けば、一般の実験室レベルにおける基礎的実験としては以前の報告^{10,11)}のようにHBsAgの抗原性をマーカーにしてある消毒剤がその抗原性に影響するか否かを観察することにより感染性も類推される。

今回、WHOのレポートにHBVの消毒剤として記載されているglutaraldehydeと類似化合物である1,9-nonanedialおよび2-methyl-1,8-octanedialがHBsAgの抗原性に低下をもたらすか否かをRadioimmunoassay法により検討したので、その結果を報告しHBVの消毒法の一参考としたい。

^{*1} 本報を「B型肝炎ウイルスの消毒に関する研究」(第3報)とする。

^{*2} 長崎県大村市久原2丁目1001-1; 1001-1, Kubara 2-chome, Ohmura-shi, Nagasaki, 856 Japan

実験の部

1. 試料

HBsAg

HBsAg として次の三種を使用した。

1) PLC/PRF/5 細胞¹³⁾ 培養液上清

ヒトの肝癌細胞株の一つである PLC/PRF/5 細胞 (2×10^5 個) を直径 5 cm のシャーレに入れ、10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 (ニッスイ) にペニシリン (100 単位/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml), L-グルタミン 0.584mg/ml および NaHCO_3 1.54mg/ml を添加した培養液で 5% 炭酸ガス培養器で培養した。細胞が単一層になったのち 1% 牛胎児血清の培養液に切り替え、三日後に採取した培養上清液を HBsAg 液とした。

2) HBsAg 付着ビーズ

ダイナボット社の HBs 抗体測定用キット“オースブ”に添付されている HBsAg 付着ビーズを使用した。

3) HBeAg 陽性血清

R-PHA 法¹³⁾ により HBsAg 陽性を示した血漿 (佐世保赤十字血液センターより提供を受けた) で、さらに AGD 法¹⁴⁾ (Agar Gel Diffusion) で HBeAg 陽性を示した血漿を血清にして使用した。

アルデヒド化合物

本実験に供したアルデヒド化合物は、glutaraldehyde, 1,9-nonanediol, 2-methyl-1,8-octanediol および formalin の 4 種で前三者の化学構造を Fig. 1 に示した。

1) glutaraldehyde (GA)

GA は、丸石製薬製ステリハイド® 20% 液 (Lot No. 4721) で、これに添付されている酢酸塩を加えて pH 8.0 とした。希釈液として 25% Isopropanol および 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。

2) 1,9-nonanediol (NDL)

Fig. 1.

NDL (クラレ社製) も GA と同じ希釈液を用いた。

3) 2-methyl-1,8-octanediol

1,9-nonanediol (NDL) : 2-methyl-1,8-octanediol = 1 : 1 の混合物を本報では INDL と略する。INDL (クラレ社製) も GA と同じ希釈液を用いた。

4) formaldehyde

局方ホルマリン (丸石製薬, Lot No. 5531) を蒸留水で希釈し、10%ホルマリン液として使用した。

2. 実験方法

アルデヒド化合物の検出

E. Sawicki らの方法¹⁵⁾ で行った。検液 100 μ l に 1% 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone 25 μ l を加え攪拌して 2 分間放置する。そして、1% 塩化第二鉄水溶液 25 μ l をさらに加え再び攪拌する。陽性の場合には青色を呈するので比色法にて判定した。

HBsAg とアルデヒド化合物との反応

1) PLC/PRF/5 細胞培養上清液 100 μ l に 6% NDL 100 μ l (0.04mM) または 6% INDL 100 μ l (0.04mM) のいずれかを 96 穴の culture plate (Falcon 社製) に入れ、マイクロミキサー (三光, Model MX-3) に固定し一定時間室温で振とうさせた。反応後、静置させ NDL または INDL が分離したのち水相の HBsAg 液を取り出した。

2) HBsAg 付着ビーズとアルデヒド化合物 200 μ l を 20 穴のプレート (ダイナボット社) に入れ 1) と同様に反応させた。

3) HBeAg 陽性血清とアルデヒド化合物との反応も 1) と同様に反応させた。

HBsAg の検出

PLC/PRF/5 細胞培養上清および HBeAg 陽性血清の HBsAg の検出は、“オースリア II” (ダイナボット社) の方法に従った。アルデヒド化合物処理後の HBsAg 液 200 μ l に anti-HBs 付着ビーズを入れ、45°C, 60 分間反応させ 3 回洗浄 (パイオテック社, Model BW) する。¹²⁵I-anti-HBs 200 μ l をさらに加え 45°C, 60 分間反応させ二回目の洗浄をしたのち γ カウンター (Aloka, Auto Well Gamma System ARC 600) でカウントした。また、HBsAg 付着ビーズの場合は直接 ¹²⁵I-anti-HBs と反応させた。なお、以上の実験はすべて duplicate で行った。

結果および考察

PLC/PRF/5 細胞より分泌された HBsAg は、約 5000 cpm/100 μ l (本実験のバックグラウンドはすべて平均約 50 cpm 以下) の値を示したが、NDL および INDL 処理後

は 1/20 以下になり, 明らかに HBsAg の抗原性の低下が観察された. なお, アルデヒド化合物が存在した場合 HBsAg の抗原測定系に影響を及ぼすことも考えられるので, アルデヒド化合物処理後の HBsAg 液中のアルデヒド化合物の検出を行った. その結果, 前述の方法では 4 μ g の NDL および INDL が検出可能であり, HBsAg とアルデヒドとの反応後の分離した溶液からは最高で 6 μ g の NDL および INDL が検出された. このことは反応に使用した NDL および INDL の 6.2mg の 1/1000 以下であったためほぼ無視できると考えた.

つぎに, 現在実際に使用されている GA と NDL および INDL との比較実験を行うため HBsAg として HBsAg 付着ビーズ抗原を用いた. この場合は, 未反応のアルデヒド類を反応後ビーズ洗浄により完全に除去できる. GA は添付文書に従い 2% 水溶液 200 μ l (0.04mM) とし, NDL および INDL も 0.04mM (3%, 200 μ l) の 25% isopropanol 溶液を調製し, HBsAg 付着ビーズと反応させた.

その結果は NDL および INDL では HBsAg の抗原性をわずかに低下させたものの GA に比べて劣った (Fig. 3). そこで GA と同様に NDL および INDL の pH を 8.0

Fig. 2. PLC/PRF/5 細胞培養上清中の HBsAg と NDL (●) および INDL (○) との反応

Fig. 3. HBsAg 付着ビーズと GA (○), NDL (●), INDL (△) との反応 (NDL と INDL は pH 未調整)

Fig. 4. HBsAg 付着ビーズと GA (○), NDL (●), INDL (△) との反応 (pH 8.0 に調整)

に調整して同じ実験を行ったところ、これら三種のアルデヒド化合物はほぼ同様な結果を示した (Fig. 4). なお, Fig. 4 において, 25% isopropanol (13,300cpm) および10%ホルマリン液 (9,800 cpm, 両者とも3時間反応) という値が得られた. さらに HBeAg 陽性血清と NDL との反応 (10分間) では 3,500cpm, 未処理では 7,300cpm という結果であった.

NDL および INDL の長所としては GA やホルムアルデヒドに見られる特異的な刺激臭をほとんど感じなかった. 逆に, 短所としては油性であるために反応中は振とうの必要があった. しかし, 今回の実験ではこの性質を逆に利用し HBsAg と NDL 等の分離に用いたが, 実際には使用される場合には適当な可溶化剤が必要になる (データとしては示していないが, Tween 80 や NP-40 など可溶化を試みたが満足すべき結果は得られなかった). また, GA と同様に NDL 等は蛋白凝固作用があるために HBV の感染源である血液そのものの消毒には不向きである.

最後に, HBV の4つの遺伝子のうち HBsAg gene が合成する分子量約2万5千の蛋白について今回は検討したが, 特殊な例かもしれないが HBV DNA のみをチンパンジーに接種して肝炎が生じたという報告¹⁰⁾もあり, HBV 水平感染予防のためには慎重に対処する必要がある. その点で, HBV DNA の存在する HBeAg 陽性血清でその HBsAg のタイターを10分間で半分以下に減少させたことは, NDL 等が HBV の消毒に実際に応用できる可能性を示唆するものと考ええる.

結 論

1) NDL および INDL は, PLC/PRF/5 細胞より分泌された HBsAg の抗原性を室温1時間処理で1/20以下にした.

2) NDL および INDL は, HBsAg 付着ビーズの HBsAg の抗原性をわずかに低下させたが, GA に比較してかなり劣った (反応液の pH 未調整).

3) 反応液の pH を8.0に調整して2)と同様な反応を

行ったところ, 室温1.5時間処理で NDL および INDL は GA とほぼ同様な HBsAg 付着ビーズの HBsAg の抗原性の低下を示した. さらに, 室温3時間処理を続けると, GA に比べ NDL および INDL の方が HBsAg 付着ビーズの HBsAg の抗原性の低下をもたらした.

4) 10%ホルマリン液は, NDL等のアルデヒド化合物に比べ HBsAg 付着ビーズの HBsAg の抗原性にあまり影響を及ぼさなかった.

5) NDL は HBeAg 陽性血清の HBsAg のタイターを室温10分処理で半分以下に減少させた.

謝辞 1,9-Nonanedial および 2-Methyl-1,8-octanedial を提供された(株)クラレならびに PLC/PRF/5 細胞を分与された長崎大学医学部細菌学教室宮本勉教授および五十嵐久永講師に深謝いたします.

文 献

- 1) C.J. Burrell, et al.: Nature, 279, 43 (1979).
- 2) J.J. Sninsky, et al.: Nature, 279, 346(1979).
- 3) P. Valenzuela, et al.: Nature, 280, 815 (1980).
- 4) A. Miyahara, et al.: Proc. Nat. Acad. Sci., 80, 1 (1983).
- 5) R.A. Hitzeman, et al.: Nucl. Acids Res., 11, 2745 (1983).
- 6) WHO technical report, No.512 (1973).
- 7) H.L. Bachrach, et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95, 147 (1957).
- 8) S. Krugman, et al.: J. Infect. Dis., 122, 432 (1970).
- 9) T. Shikata, et al.: J. Infect. Dis., 138, 242 (1978).
- 10) 松岡一忠ほか: 九州薬学会会報, 35, 83 (1981).
- 11) 松岡一忠ほか: 九州薬学会会報, 36, 99 (1982).
- 12) J.J. Alexander, et al.: S. Afr. Med. J., 50, 1124 (1976).
- 13) T. Juji, et al.: J. Exp. Med., 39, 615 (1969).
- 14) L.D. Magnus, et al.: J. Immunol, 109, 1017 (1972).
- 15) E. Sawicki, et al.: Anal. Chem., 33, 93 (1961).
- 16) H. Will, et al.: Nature, 299, 740 (1982).