

厚生労働科学研究補助費（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
分担研究報告書

分担する研究項目：『E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究 - エタノール前処理をした血漿由来 E 型肝炎ウイルス（HEV）の挙動 - 』

分担研究者 坂井 薫 日本血液製剤機構 中央研究所 感染性病原体研究室

協力研究者 前野英毅、高橋一恵、井手野祥次、足立美保子、宇野滝子、服部眞次
日本血液製剤機構 中央研究所 感染性病原体研究室

[研究要旨]

血漿由来の E 型肝炎ウイルス（HEV）あるいは培養上清由来の HEV は、糞便由来の HEV とは異なり、宿主由来の脂質膜が結合していると報告されている。血漿由来や培養上清由来の HEV を有機溶媒や胆汁酸に含まれるデオキシコール酸ナトリウム（NaDOCA）で処理すると、浮上密度が高い方へ移行するため、これらの処理により脂質膜が解離しているのではないかと考えられている¹⁾。

今年度は、各アルコール分画工程において血漿由来 HEV がどのような形態（脂質膜の有無）どのような挙動を示すのか正しく把握するためにエタノール濃度 40%（血漿分画製剤のアルコール分画工程において最も高いエタノール濃度）あるいは 25%エタノールで前処理した血漿由来 HEV の浮上密度の変化（脂質膜の解離）および分画 II+III での分配パターンについて検証した。

その結果、非処理の血漿由来 HEV の浮上密度は 1.104g/mL であったが、25%エタノール前処理で 1.111g/mL、40%エタノール前処理 1.128g/mL へシフトした。ブタ糞便由来 HEV の浮上密度は 1.244 g/mL であり、40%エタノール前処理ではブタ糞便由来 HEV の浮上密度まではシフトしなかった。また、非処理または 25%エタノール前処理の血漿由来 HEV は、分画 II+III において上清に 84~95% 分配されたが、40%エタノール前処理では沈殿により多く分配された（沈殿への分配：59~84%）。以上のことから、血漿由来 HEV に結合した脂質膜は、40%エタノール前処理により解離し（解離の程度は不明）分画 II+III の分配に影響を及ぼすことが示唆された。

また、評価用の高力価の HEV を得るためにリバースジェネテクスを用いて HEV を安定的に産生する細胞株の樹立し、HEV 遺伝子（mRNA 型）を直接導入することにより、約 10⁸ゲノム/mL 以上の高いゲノム濃度を示す HEV 株を安定して確保できる可能性を見出した。

A. 研究目的

血漿由来 HEV あるいは培養上清由来 HEV には宿主由来の脂質膜が結合していると報告されており、これらの HEV を界面活性剤処理すると浮上密度が高くなる¹⁾。また、同様の処理をすることで抗体の結合性が高くなることから、血漿由来 HEV あるいは培養上清由来 HEV から脂質膜が解離すると考えられている¹⁾。一方、血漿分画製剤の多くは複数のエタノール分画工程を経て製造されるが、その中のエタノール分画 II+III 工程は、上清と沈殿への分配比率に関して、血漿由来 HEV とブタ糞便由来 HEV の間に差がみられる特徴ある工程である（自社データ）分画 II+III において血漿由来 HEV は上清によ

り多く分配され、SD 処理した血漿由来 HEV や 1%NaDOCA 処理した血漿由来 HEV は上清より沈殿に分配される。

血漿分画製剤の製造工程には様々なエタノール濃度の分画工程が含まれるが、これらの工程におけるエタノールによって血漿由来 HEV の脂質膜が解離し、HEV の分配パターンに影響を受ける可能性が考えられる。本試験は、エタノール濃度 25%および 40%（血漿分画製剤のアルコール分画工程において最も高いエタノール濃度）で前処理した血漿由来 HEV の浮上密度が変化するのか、また、分画 II+III での分配パターンが変化するのか検証することを目的とした。

略語： HEV; Hepatitis E virus. NaDOCA; Sodium deoxycholate. SD; Solvent/detergent. DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline. TE; Tris-EDTA. TNBP; Tri(n-butyl)phosphate. EMC; Encephalomyocarditis virus.

B. 研究方法

(1) 血漿由来 HEV の処理

HEV 陽性血漿を遠心分離し（970 × g、10 分）その上清を超遠心分離した（150,000 × g、3 時間、25 °C）。沈殿を超遠心分離前の液量と等量の DPBS

で懸濁したものを精製 HEV とした。精製 HEV にエタノールを最終濃度 25%あるいは 40%として -6 で静置した(25%エタノール前処理 21 時間、40%エタノール前処理 2 時間)。一方、対照としてエタノールの代わりに注射用水を加え、4 で 2 時間静置したものを非処理の血漿由来 HEV とした。なお、これらの前処理を 2 ロットのヒト血漿で実施した。

(2) 密度勾配遠心による HEV の浮上密度分析

遠心チューブに 8~50 w/v % の OptiPrep (AXIS-SHIELD) 密度勾配 (TEN Buffer : TE buffer (pH7.4) /150mM NaCl) を作製した。エタノール前処理血漿由来 HEV、非処理血漿由来 HEV、あるいはブタ糞便由来 HEV を密度勾配に重層した。120,000 × g, 4 で 18 時間超遠心分離を行った後、140~500 μL ずつ回収し、各フラクションの屈折率 (nD) を測定した。別途作成した検量線から浮上密度 (g/mL) を求めた。各フラクションは一旦 -80 で保存し、後日 HEV ゲノム濃度を測定した。

(3) HEV ゲノム濃度の測定

QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit を用いて核酸を抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用い、Jothikumar らの方法²⁾に従って HEV ゲノム濃度を測定した。

(4) エタノール分画 II+III における HEV の分配

エタノール分画 II+III のスタート材料である上清 I に、25%あるいは 40%エタノール前処理した血漿由来 HEV、もしくは非処理の血漿由来 HEV をそれぞれ 1/10 量添加し、ロードサンプルを採取した。規定量の 95%エタノールを添加し、酢酸バッファで pH を 6.0~7.0 とした。-6~-7 で 1 時間静置し、3,000 × g, -7 で 30 分遠心分離後、上清を回収した。沈殿は分画前の液量と等量の DPBS で懸濁した。上清と沈殿は -80 で保存し、後日 HEV ゲノム数を測定した。

(5) リバースジェネティクスによる HEV 産生

ゲノム全長配列が既知であるブタ糞便由来 HEVGeno type jp (swJR-PS) の全長ゲノム RNA を、合成 DNA から作成したプラスミドを鋳型として in vitro 合成し、ヒト樹立肝細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションした。培養後、培養上清中の HEV ゲノムを後述の方法で定量した。

(倫理面への配慮)

研究対象としてヒト血漿 (HEV 陽性血漿) を用いている。この血漿の使用については、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」に従い、一般社

団法人日本血液製剤機構ヒト組織研究倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

(1) HEV の浮上密度の比較

非処理の血漿由来 HEV (血漿 B) の浮上密度のピークは、1.104g/mL であった。25%エタノール前処理をすると浮上密度は 1.111 g/mL となり、40%エタノール前処理で 1.128 g/mL までシフトした。非処理のブタ糞便由来 HEV の浮上密度は、1.244 g/mL であり、血漿由来 HEV の 40%エタノール前処理では、ブタ糞便の浮上密度まで高くないことが確認できた (図 1)。なお、血漿由来 HEV の 40%エタノール前処理による浮上密度のシフトは他の HEV 陽性血漿 (血漿 A) でも見られ、血漿由来 HEV に共通して起こる事象であろうと推測できた (Data not shown)。また、ブタ糞便由来 HEV を 40%エタノール前処理しても浮上密度に変化がなかった (Data not shown)。なお、Yin らは、トランスフェクション後の培養上清中の HEV の密度は 1.10g/mL、糞便由来 HEV の密度は 1.25g/mL 程度と報告しており³⁾、本試験の結果と同様であった。

(2) エタノール分画 II+III における HEV の分配

2 ロットの HEV 陽性血漿 (血漿 A、血漿 B) について、エタノール分画 II+III における分配パターンを検証した。非処理の血漿由来 HEV は上清に 84% (血漿 A) あるいは 95% (血漿 B) 分配された (図 2 (A))。25%エタノール前処理は、血漿 B についてのみ実施した。94%が上清に分配され、非処理と同様であった。一方、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV は、逆に沈殿側に多く分配された (血漿 A 84%、血漿 B 59%)。40%エタノール前処理により、沈殿へ分配された現象は一般的であることが推測できた。

(3) リバースジェネティクスによる HEV の産生

ヒト樹立肝細胞 PLC/PRF/5 樹立細胞系に HEV 遺伝子 (mRNA 型) を直接導入することにより、約 10⁸ ゲノム/mL 以上の高いゲノム濃度を示す HEV 株を安定して確保できる可能性を見出した。

D. 考察

(1) エタノール分画 II+III における HEV の除去効果について

本試験結果をこれまで得られた自社データと比較すると、非処理の血漿由来 HEV は上清により多く分配される再現性が認められた (図 2 (B))。また、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV の分画 II+III における分配は、SD (1%Tween80/0.3%TNBP,

30 , 6 時間) 処理と同等であった。一方、1%NaDOCA 処理した血漿由来 HEV、モデルウイルスである脳筋炎ウイルス (EMC) (ノンエンベロープ、RNA ウイルス) は、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV や SD 処理した血漿由来 HEV より沈殿への移行度が大きく、ほぼ 100%が沈殿に認められた。

アルブミンは分画 II+III の上清画分から精製されるが、この工程はウイルス除去効果が認められる工程である。一方、免疫グロブリンはこの工程の沈殿画分から精製され、ウイルス除去効果が低い工程である。したがって、分画 II+III における上清のウイルス除去率 (LRV) について注目すると、非処理血漿由来 HEV、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV、および SD 処理した血漿由来 HEV は、いずれも LRV が 1Log_{10} 以下と、除去効果が見られなかった。一方、1%NaDOCA 処理した血漿由来 HEV、EMC は、 $2\sim 3\text{Log}_{10}$ のウイルス除去効果が認められた。したがって、分画 II+III による血漿由来 HEV のウイルス除去効果を評価する場合には、適切なウイルスを選択する必要があると考えられた。

(2) エタノール分画工程における適切なウイルスの選定について

Cohn/Oncley のアルコール分画では、分画 I (エタノール濃度 8%)、分画 II+III (エタノール濃度 20~25%)、分画 IV-1 (エタノール濃度 18%)、分画 IV-2 (エタノール濃度 40%) の順に分画され、分画 IV-2 が最大のエタノール濃度となる。血漿由来 HEV の脂質膜が解離する工程前後の HEV に対する安全性を評価するには適切なウイルスを用いることが重要となる。その場合、HEV が脂質膜を有していると考えられる工程では、血漿由来あるいは培養上清由来 HEV (脂質膜が結合した HEV) を用いることになるだろう。一方、脂質膜が上流工程で失われている工程では、エタノールや SD 処理した血漿由来 HEV、ブタ糞便由来 HEV などが候補となるだろう。これらのウイルスが、各工程の HEV に対する安全性評価においてどのくらい妥当であるかについて更に検討する予定である。

(3) リバースジェネティクスによる HEV の産生

リバースジェネティクスによる、約 10^8 ゲノム/mL 以上の高いゲノム濃度を示す HEV 株を安定して確保できる可能性を見出した。今後、リバースジェネティクスで作製した HEV についても浮上密度と分画 II+III の挙動を明らかにして、ウイルススクリアランス試験に応用可能か検証する予定である。

E. 結論

非処理の血漿由来 HEV の浮上密度は 1.104g/mL であったが、25%エタノール前処理で 1.111g/mL 、40%エタノール前処理 1.128g/mL ヘシフトした。ブタ糞便由来 HEV の浮上密度は 1.244g/mL であり、40%エタノール前処理ではブタ糞便由来 HEV の浮上密度まではシフトしなかった。また、非処理または 25%エタノール前処理の血漿由来 HEV は、分画 II+III において上清に 84~95%分配されたが、40%エタノール前処理では沈殿により多く分配された (沈殿への分配: 59~84%)。以上のことから、血漿由来 HEV に結合した脂質膜は、40%エタノール前処理により解離し (解離の程度は不明) 分画 II+III の分配に影響を及ぼすことが示唆された。さらに遺伝子操作手法により高感染価で工程応用可能な HEV を安定して供給できる可能性を見出した。

(引用文献)

- 1) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuno H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48:1112-25.
 - 2) Jothikumar N, Cromeans T, Robertson B, Meng X, Hill V. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Meth.* 2006;131:65-71.
 - 3) Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Freg Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J. Virol.* 2016; 90(8):4232-42.
- ## F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, Hagiwara K, Yunoki M, Wakisaka A. Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan. *Vox Sang.* 2016; 111(3):242-246.
 - 2) Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives. *Biologicals.* 2016; 44(5):403-11.

- 3) Urayama T, Takahashi K, Ideno S, Yunoki M, Saito M, Numakura K, Inoue T, Satoh S, Sakai K. BK polyomavirus neutralizing activity of intravenous immunoglobulin products derived from donated blood in Japan. ISBT Science Series. 2016; 11:146–152.
- 4) Yunoki M, Kurosu T, Koketsu KR, Takahashi K, Okuno Y, Ikuta K. Neutralizing activities of human immunoglobulin derived from donors in Japan against mosquito-borne flaviviruses, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, and dengue virus. Biologics: Targets and Therapy. 2016; 10: 99-102.
- 5) Onodera H, Urayama T, Hirota K, Maeda K, Koketsu RK, Takahashi K, Hagiwara K, Okuno Y, Ikuta K, Yunoki M. Neutralizing activities against seasonal influenza viruses in human intravenous immunoglobulin. Biologics: Targets and Therapy. 2017; E-Pub ahead.

2 . 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

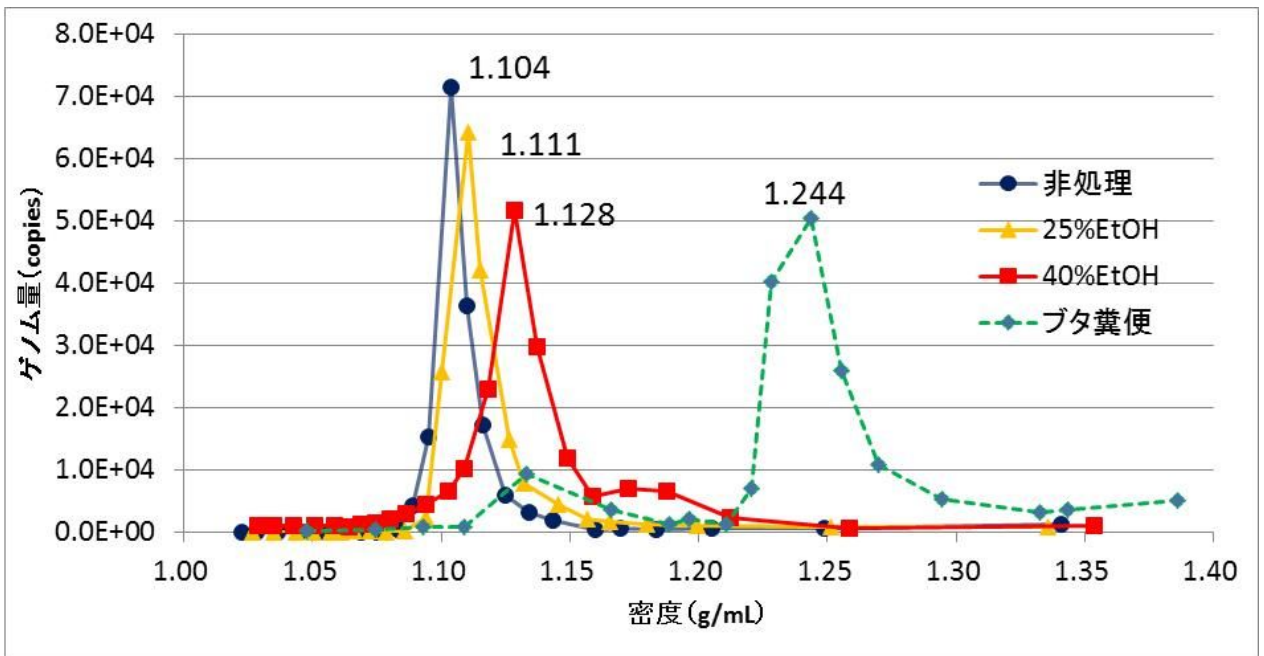
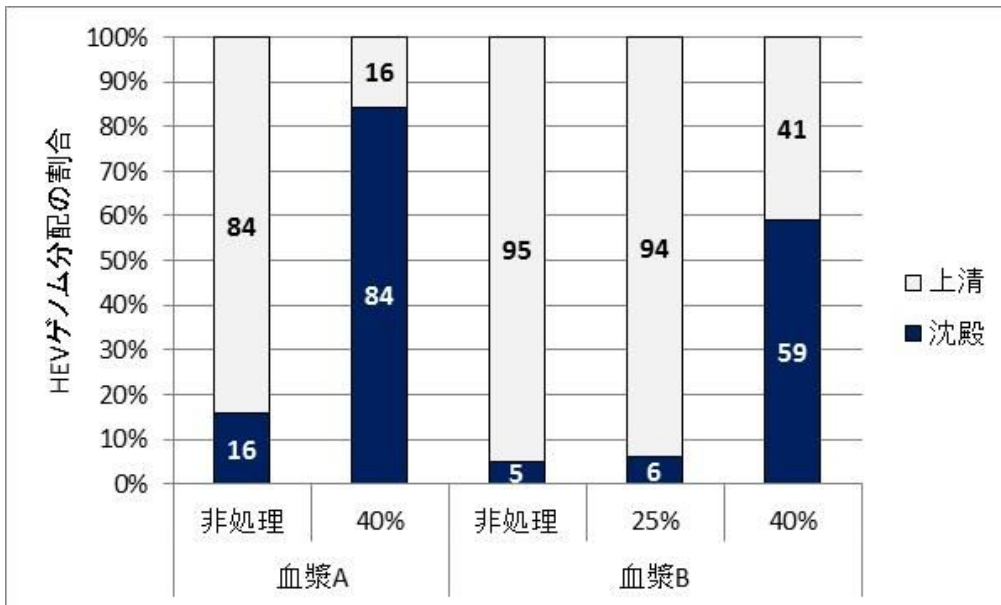


図1 OptiPrep 密度勾配遠心による HEV の浮上密度解析結果

(A) 本試験結果



(B) 過去の自社データ

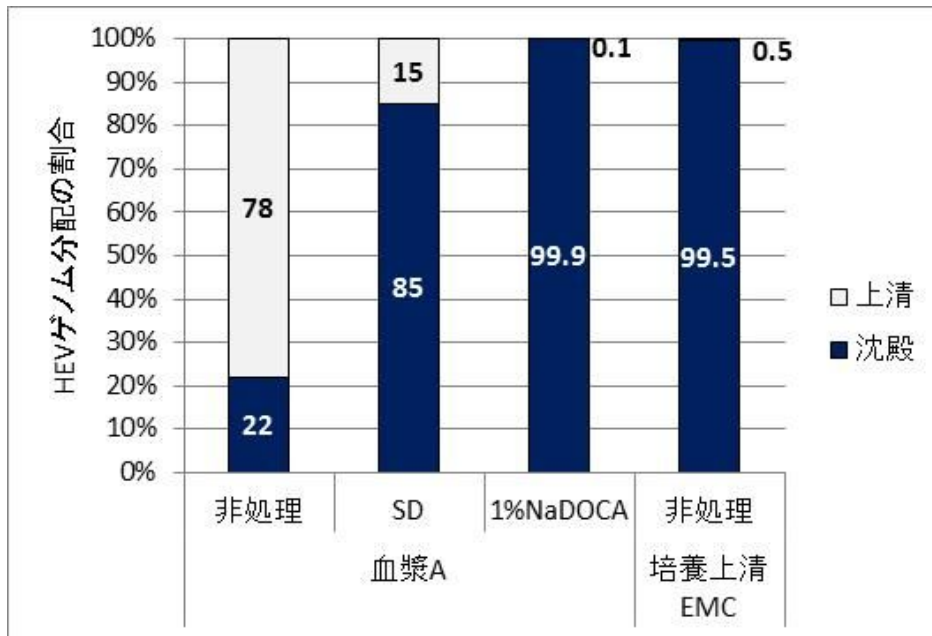


図2 エタノール分画 II+III における HEV ゲノムの分配割合