

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 - 高濃度 E 型肝炎ウイルス（HEV）の産生と性状解析 -

分担研究者 坂井薫（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所）

支援研究者 高橋一恵、井手野祥次、服部眞次、前野英毅（一般社団法人 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]

血漿分画製剤製造工程での HEV の除去・不活化効果評価に適したウイルス株を探索する目的で高濃度の HEV 取得方法を検討し、得られた HEV について血漿由来 HEV (pd-HEV) との比較を行った。PLC/PRF/5 細胞にブタ糞便由来 HEV swJR-P5 株 (sw-HEV) の合成ゲノムをトランスフェクションするリバースジェネティクス法で、培養上清中に約 9 Log copies/mL の高濃度 HEV (RG-HEV-PLC) を得ることができた。得られた RG-HEV-PLC は、SD 処理やウイルス表面の脂質膜が除去されると報告されている NaDCA+Trypsin 処理で浮上密度が pd-HEV と同様に高密度側に変化し、NaDCA+Trypsin 処理では RG-HEV-PLC と pd-HEV は共に sw-HEV と同様の高い浮上密度 (1.171-1.185 g/mL) となった。また非処理ではほとんど認められない ORF2 抗体との結合性が上昇する点で両者はよく似た性状を示した。一方、非処理の RG-HEV-PLC は浮上密度 (1.121 g/mL) が pd-HEV (1.102-1.108 g/mL) よりやや高く、アルコール分画で沈殿に多く分配される点で pd-HEV と異なる性状を示した。40%エタノール処理では RG-HEV-PLC の浮上密度は変化せず、ORF2 抗体との結合性の上昇もほとんど認められなかったのに対し、pd-HEV は高密度への変化又はピーク形状の変化が観察され抗 ORF2 抗体との結合性も上昇した。両者の性状の差異は表面に結合した宿主由来の脂質に起因している可能性が示唆された。今回取得した高濃度 RG-HEV-PLC を製造工程におけるウイルス安全性評価に用いるためには、両者の性状の類似点と相違点に着目したさらなる検討が必要と考えられる。今後は、ウイルス除去・不活化工程として有用性が報告されているウイルス除去膜ろ過と液状加熱について、除去・不活化効果を比較し、本研究で得た RG-HEV-PLC の特性を明らかにする予定である。

A. 研究目的

略語： HEV; Hepatitis E virus. NaDCA; Deoxycholic acid sodium salt. SD; Solvent/detergent. TNBP; Tri(n-butyl)phosphate. TEN; Tris-EDTA- NaCl(150mM) buffer (pH7.4). TBS; Tris-Buffered Saline

献血者における HEV ゲノム陽性者は、8173 ~ 15075 人に 1 人である¹⁾が、HEV-NAT は現在北海道ブロックでしか実施されていない。数万人の血漿をプールして製造する血漿分画製剤については、製造工程で HEV が除去・不活化されているのか検証

することが重要となる。血漿由来 HEV (pd-HEV) LC131066、pd-HEV-27 : GenBank 登録予定、
を製造工程液に添加し、ウイルス除去・不活化効果 pd-HEV-40 : GenBank 登録予定)、
を検証することが望ましいが、高タイターの
pd-HEV は稀であり、十分量を確保することが非常
に困難であった。

そこで、日本血液製剤機構では pd-HEV のモデル
ウイルスとしてブタパルボウイルス (PPV) 及びネ
ズミ脳心筋炎ウイルス (EMCV) あるいはブタ糞便
由来 HEV (sw-HEV) を用いて血漿分画製剤の製造工
程における除去・不活化効果を検証してきたが、こ
れらのウイルスの除去・不活化の挙動は pd-HEV と
は異なっていた^{2,3)}。

pd-HEV や培養上清由来 HEV は、界面活性剤処
理をすると浮上密度が高くなり、HEV 抗体への結
合性が高くなることが報告されている⁴⁾。これは、
ウイルスに結合した脂質膜が、界面活性剤により解
離したためと考えられている⁴⁾。また、昨年度、
pd-HEV をデオキシコール酸 Na (NaDCA)、40%エタ
ノール又は SD 処理することにより、エタノール分
画 + での分配が sw-HEV やモデルウイルス様に
変化することを報告した。

本年度は、pd-HEV と性状が同じで高濃度の HEV
の入手を目的としてリバースジェネティクス法を用
いた HEV (RG-HEV) の調製を試みた。RG-HEV
を除去不活化検討に用いた報告⁵⁾はあるが、その性
状についての解析は不十分と考え、得られた
RG-HEV の性状について pd-HEV と比較した。

B. 研究方法

(1) ウイルス

sw-HEV は swJR-P5 株 (GenBank AB481229.1) を、
pd-HEV は 3 人のドナー由来の HEV ゲノム陽性血漿
をウイルス材料とした (pd-HEV-1 : GenBank

(2) HEV ゲノム濃度の測定

QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (Qiagen)
を用いて核酸を抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR
Kit (Qiagen) を用いて Jothikumar らの方法⁶⁾に
従って HEV ゲノム濃度を測定した。

(3) HEV 感染価の測定

96 well plate で培養した A549 細胞に、培地で段階
希釈した HEV サンプルを添加し 7 日間培養した後、
上清を除き細胞より RNeasy 96 kit (Qiagen) を用い
て Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA 中の
HEV ゲノムを測定し、Karber 法により感染価
(TCID₅₀/mL) を算出した。

(4) RG-HEV の産生

sw-HEV 及び pd-HEV-1 ゲノム配列の DNA を合成
し、プラスミドベクター pSP64 に挿入した。組み換
えベクターを大腸菌 DH5 でクローニングし、制限
酵素消化により直鎖状とし、これを鋳型として
CUGA in vitro Transcription Kit (ニッポンジーン) に
より RNA 合成を行った。ScriptCap mG Capping
System (Epicentre) を用いて 5' 末端のキャッピング
を行った。TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus) を
用いて、sw-HEV 由来の合成 RNA は PLC/PRF/5 細
胞に、pd-HEV-1 由来の合成 RNA は PLC/PRF/5、
Hep3B、HepG2 細胞にトランスフェクションした。6
well plate 又は T-75 フラスコで培養し 2~3 日毎に半
量培地交換を行い、培地交換時に採取した培養上清
中の HEV ゲノム濃度を測定した。また一部の上清
については ORF2 抗体によるウェスタンブロッティ

ングを行った。

(5) HEV の処理

各由来の HEV を超遠心分離し (150,000 × g、3 時間、4)、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した。これらの HEV 懸濁液に対して以下の 4 つの処理を施した； エタノールを終濃度 40% 加え -6 で 2 時間 (pH 6.8)、又は終濃度 25% 加え -6 で 21 時間 (pH 6.8) インキュベーション、 Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1% 加え 30 で 2 時間 インキュベーション (SD 処理)、 陽性コントロールとして NaDCA を終濃度 1%、 Trypsin を終濃度 0.1% 加え、37 で 2 時間 インキュベーション (NaDCA+Trypsin 処理)、 陰性コントロールとして、50mM Tris 緩衝液のみを加え 37 で 2 時間 インキュベーション。各処理後液を TBS で約 10 倍に希釈後、超遠心分離し (150,000 × g、3 時間、4)、沈殿画分を TBS で懸濁して各処理後 HEV とした。

(6) 密度勾配遠心による HEV の浮上密度測定

遠心チューブに 4.9 mL の 8~50 w/v % OptiPrep™ (AXIS-SHIELD)/TEN の密度勾配を作製し、各処理後 HEV を 100 μL 重層して超遠心分離 (120,000 × g、18 時間、4) を行った。超遠心分離後、表面より 200 μL ずつ回収し、各フラクションの屈折率 (nD) と HEV ゲノム濃度を測定した。浮上密度 (g/mL) は別途作成した検量線を用いて屈折率から算出し、HEV の浮上密度を求めた。

(7) ORF2 抗体の結合性

4~5 Log copies/mL の HEV 100 μL と、1000 倍希釈した ORF 抗体 (ウサギ血清) 100 μL を混合し、

37 で 2 時間静置した。TBS で 1 mg/mL に溶解したウサギ IgG 20 μL 及び 20% (v/v) に懸濁した Protein-G Sepharose 4FF 100 μL を添加し、室温で 1 時間振とうし、マイクロバイオスピカラムで遠心分離した。分離した Protein-G Sepharose 4FF を TBS で 3 回洗浄後、0.1 M Glycine-HCl Buffer pH2.5 180 μL で吸着画分を溶出し、1M Tris-HCl Buffer pH9.0 を 20 μL 加えたチューブに回収し、HEV ゲノム濃度を測定した。また非免疫ウサギ血清で同様に操作し陰性コントロールとした。

(8) エタノール分画 II+III における HEV の分配

エタノール分画の上清 I に、各由来の HEV をそれぞれ 1/10 量添加した。また一部の HEV についてはヒト血漿と混合し、超遠心分離 (150,000 × g、3 時間、4) 後、上清 I に 64 mM 酢酸を含む 95% エタノールを添加してエタノール終濃度 21%、pH6.8 とし、-6~-7 で 1 時間 インキュベーション後 -7 で 3,000 × g、30 分間遠心分離した。上清は 0.45 μm フィルターでろ過し、沈殿は分画前の液量と等量の DPBS で懸濁し、各画分の HEV ゲノム濃度を測定した。

(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) RG-HEV の産生

3 種の細胞 (PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2) にブタ

糞便あるいはヒト血漿由来の HEV 合成ゲノムをトランスフェクションあるいは産生された RG-HEV を感染させた (表 1)。PLC/PRF/5 細胞に sw-HEV 合成 RNA をトランスフェクションし、T-75 Flask で培養したものは、33 日目以降に培養上清中の HEV ゲノム濃度が約 9 Log copies/mL に達したが、6well plate で培養したものは、約 8 Log copies/mL に留まった (図 1A)。T-75 Flask で培養した培養上清からは、トランスフェクション後 12~15 日目に ORF2 抗原の発現が確認できた (産生された HEV を以下 RG-HEV-PLC と称す) (図 1B)。

PLC/PRF/5 細胞よりもりが蛋白質合成能が高いと報告されている Hep3B 細胞⁷⁾に RG-HEV-PLC を感染させた場合、培養上清中の HEV ゲノムは約 7 Log copies/mL であった (図 1A、産生された HEV を RG-HEV-Hep3B 称す)。

一方、pd-HEV-1 合成 RNA を PLC/PRF/5、Hep3B または HepG2 細胞にトランスフェクションした場合、培養上清中の HEV ゲノム濃度はいずれも経時的に低下し、5~6 Log copies/mL の濃度のものしか得られなかった (図 1C)。

以上の結果から、最も高濃度となった RG-HEV-PLC についての性状解析を主に行った。

(2) RG-HEV の浮上密度

由来の異なる HEV の浮上密度を密度勾配遠心により調べたところ、pd-HEV 3Lot が 1.102-1.108 g/mL にピークを示したのに対し、RG-HEV-PLC のピークは 1.121 g/mL と、わずかに高密度であったが、sw-HEV よりは低密度であった (図 2A)。なお、RG-HEV-Hep3B の浮上密度は、RG-HEV-PLC と同様であった (Data not shown)。また、pd-HEV 及び RG-HEV-PLC を NaDCA+Trypsin 処理すると浮上密

度は、いずれも 1.225-1.234 g/mL にピークを示し sw-HEV と同様の密度となった (図 2B)。このことから、RG-HEV-PLC と pd-HEV は性状は若干異なるが、NaDCA+Trypsin 処理により同様の性状になる事が示唆された。

(3) 感染価と HEV ゲノム濃度

各 HEV のゲノムあたりの感染価を測定したところ、sw-HEV (-2.4 Log TCID₅₀/copy) 以外は -3.4 ~ -3.9 Log TCID₅₀/copy であった (表 2)。この結果は、RG-HEV が、pd-HEV と同様に、脂質膜に覆われているためにゲノムあたりの感染価が sw-HEV より低下している為と推察された。

(4) 各処理による浮上密度の変化

RG-HEV-PLC と pd-HEV に 25% エタノール、40% エタノール及び SD の各処理を行い、浮上密度の変化を観察した。25% エタノール処理ではいずれの HEV も浮上密度の変化は認められなかったが (図 3A)、40% エタノール処理では pd-HEV-1 と pd-HEV-40 において高密度への変化が観察され、また pd-HEV-27 もピークがややブロードとなった。このように 40% エタノール処理で pd-HEV はロットにより異なる変化を示した (図 3B)。一方、40% エタノール処理でも RG-HEV-PLC の浮上密度に変化は認められなかった (図 3B)。

また、SD 処理では全ての HEV が 1.171-1.185 g/mL の高密度へピークが変化した (図 3C)。

(5) 各処理による抗体結合性の変化

RG-HEV-PLC 及び pd-HEV-1 の ORF2 抗体との結合性の変化を、ORF2 抗体を用いた Immuno Capture PCR により検証した。非処理ではいずれの HEV も

ORF2 抗体との明確な結合は認められなかったが、pd-HEV は 25%エタノール処理でやや結合が認められるようになった。更に、40% エタノール処理では明確な結合が認められるようになった。一方、RG-HEV-PLC は 25%及び40%エタノール処理のいずれにおいても明確な結合は認められなかった。SD 処理ではいずれの HEV も明確な結合が認められるようになった(表3)。

(6) エタノール分画 II+III での分配

エタノール分画 II+III において pd-HEV は上清に分配されるのに対し、RG-HEV-PLC や RG-HEV-Hep3B は sw-HEV と同様に主に沈殿に分配された(図4)。pd-HEV のみ分画 II+III における挙動が異なるのは、血漿由来の成分がウイルスに結合しているためかもしれないと考え、RG-HEV-PLC、sw-HEV を各々ヒト血漿に懸濁(懸濁後 150,000g で 4、3 時間超遠心分離)してからエタノール分画 + を実施した。しかし、いずれのウイルスについても、沈殿に多く分配し、pd-HEV のような分配パターンとはならなかった(図4)。

D. 考察

今回得られた RG-HEV-PLC は高濃度であり、NaDCA+Trypsin 処理や SD 処理後の性状(浮上密度、抗体結合性)が pd-HEV と同様であったことから脂質膜を完全にまたは部分的に除去した場合、pd-HEV の性状を反映することが期待される。特に NaDCA+Trypsin 処理で脂質膜を完全に除去した RG-HEV-PLC はウイルス除去膜ろ過など大きさで分離する工程のワーストケースとしての評価に有用であることが期待され、今後 pd-HEV との比較を進める予定である。

一方、非処理における浮上密度やエタノール分画 + の分配、エタノール処理における浮上密度変化や抗体結合性変化が、RG-HEV-PLC と pd-HEV では異なっており、高濃度 RG-HEV-PLC を製造工程におけるウイルス安全性評価に用いるためには、加熱に対する安定性などで両者の性状の異同について更に検討が必要と考えられる。

HCV では血漿由来と培養由来で結合する脂質組成が異なるとの報告もあり⁸⁾、HEV についても脂質組成が両者で異なる可能性がある。今後、pd-HEV の性状をより反映した HEV の産生が望まれる。

E. 結論

血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去・不活化効果を検証するにあたり、リバーシジェネティクス法を用い約 9 Log copies/mL の HEV (RG-HEV-PLC) を得ることができた。結合している脂質膜を完全に除去した RG-HEV-PLC はウイルスの大きさで分離するウイルス除去膜ろ過工程のワーストケースとしての評価に有用であると期待されるが、非処理では pd-HEV と性状が異なったことから工程評価に用いるには注意が必要である。両者の異同について更なる検討が必要である。

(謝辞)

本研究の一部は筑波大学医学医療系消化器外科学 大河内信弘先生、大城幸雄先生、環境微生物学 竹内薫先生との共同研究の成果です。厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 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) 高橋一恵ら「由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて」*血液事業* 第 36 巻 第 3 号 2013.11 679-685
 - 3) 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 Sep;44(5):403-11.
 - 4) 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.
 - 5) Farcet MR, Lackner C, Antoine G, Rabel PO, Wieser A, Flicker A, Unger U, Modrof J, Kreil TR. Hepatitis E virus and the safety of plasma products: investigations into the reduction capacity of manufacturing processes. *Transfusion.* 2016 Feb;56(2): 383-91.
 - 6) 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.
 - 7) Forte TM1, McCall MR, Knowles BB, Shore VG. Isolation and characterization of lipoproteins produced by human hepatoma-derived cell lines other than HepG2. *J Lipid Res.* 1989 Jun;30(6):817-29.
 - 8) Piver E, Boyer A, Gaillard J, Bull A, Beaumont E, Roingeard P, Meunier JC. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut.* 2017;66(8):1487-1495.
 - 1) Yunoki M, Sakai K, Totsuka A, Wakisaka A. Transfusion. Hepatitis A virus strain KRM238 resistant at heat inactivation. *Transfusion.* 2013 53(9):2103-42.
 - 2) 高橋一恵、大久保祐土、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良 . 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて . *血液事業* , 2013; 36(3): 679-685.
 - 3) Ideno S, Sakai K, Yunoki M, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Nakamura S, Yasunaga T, Okuno Y, Ikuta K. Immunization of rabbits with synthetic peptides derived from a highly conserved β -sheet epitope region underneath the receptor binding site of influenza A virus. *Biologicals.* 2013;7:233-41
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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. *Biologicals: Targets and Therapy.* 2016; 10: 99-102.
 - 8) 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. *Biologicals: Biologicals.* 2017; 10;11:23-30.

F. 研究発表

1 . 論文発表

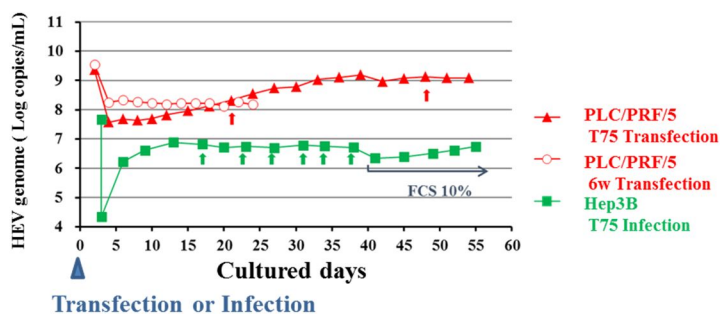
2 . 学会発表

- 1) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. Pathogen inactivation in plasma derivatives – Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. 21st IPFA/PEI Workshop (21-22 May 2014), Rome.
- 2) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. EMA workshop (28-29 October 2014), London.
- 3) 池川礎令、皆木隆男、井手野祥次、坂井薫、柚木幹弘、宮本尚、大場徹也、川浪雅好: 日本血液製剤機構における原料血漿の HEV 陽性率. 第 38 回日本血液事業学会 (2014.10.29-31) 広島.
- 4) Maeno H, Adachi M, Takahashi K, Ideno S, Sakai K, Takeuchi K, Oshiro Y, Ohkohchi N, Okada Y. Treatment of Hepatitis E virus (HEV) particles with ethanol or detergent alters their physical behavior during Chon's ethanol fractionation. Plasma Product Biological Meeting 2017, Malta.

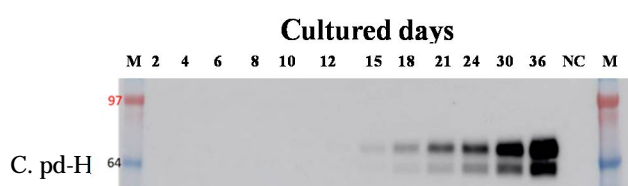
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

A. sw-HEV 合成ゲノム RNA を用いた RG-HEV 産生



B. PLC/PRF/5 T75 Transfection 培養上清の ORF2 抗体ウェスタンブロット



C. pd-H

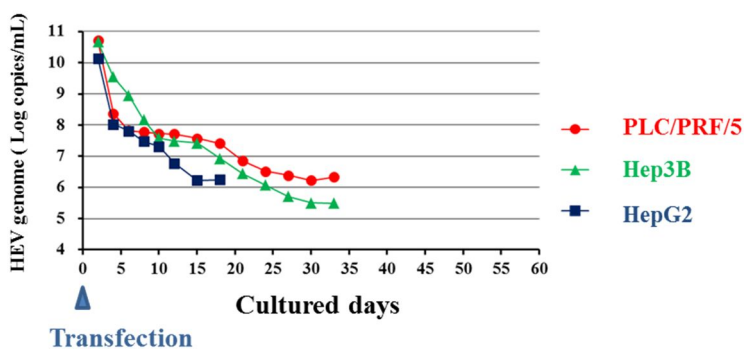


図 1 RG-HEV の産生

A. PLC/PRF/5 T75 Transfection ; sw-HEV 合成ゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に T-75Flask で Transfection した。PLC/PRF/5 6W Transfection ; sw-HEV 合成ゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に 6 well plate で Transfection した。Hep3B T75 Infection ; PLC/PRF/5 T75 Transfection で得られた培養上清プールを Hep3B 細胞に感染させた。Hep3B T75 Infection の FCS 10% と示した培養期間以外は全て FCS 2% で培養を行った。また図中の矢印はいずれの細胞についても非感染細胞を追加したことを示す。

B. PLC/PRF/5 T75 Transfection の経時的に採取した培養上清を還元条件で Nu-PAGE 後 ORF2 抗体 (ウサギ抗血清) と反応させ化学発光でバンドを検出した。

C. T-75 Flask で培養した PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2 の各細胞に pd-HEV-1 合成ゲノム RNA を Transfection した。各ポイントは培養上清の HEV ゲノム濃度を示している。

表 1 RG-HEV の産生条件の検討

細胞	HEV			
	swJR-P5株(ブタ糞便由来)		LC131066株(ヒト血漿由来)	
	Transfection	Infection	Transfection	Infection
PLC/PRF/5	○	NT	○	NT
Hep3B	NT	○	○	NT
HepG2	NT	NT	○	NT

○は実施したことを示す。NT: Not tested

表 2 各種由来 HEV のゲノム当たりの感染価

HEV	感染価/ゲノム濃度 (Log TCID50/copy)	
sw-HEV	-2.40±0.32	n=7
pd-HEV-1	-3.92±0.37	n=5
RG-HEV-PLC	-3.40±0.14	n=3
RG-HEV-Hep3B	-3.42	n=1
HEV-A549	-3.62	n=1

n=3 以上の測定については平均値 ± SD で表示した。

- A. 非処理 HEV-A549 は A549 細胞 (ヒト肺がん細胞株) にブタ糞便由来 HEV Genotype sp を感染させて得た培養上清の HEV を示す。

B. 1% NaDCA+0.1%Trypsin 処理

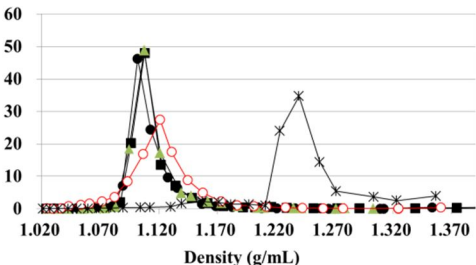
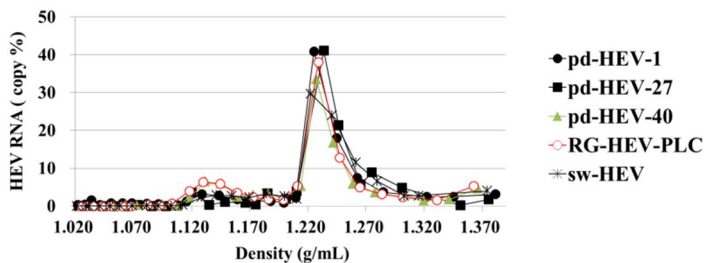
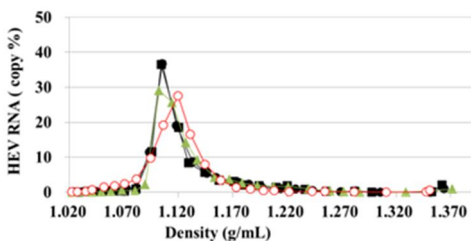


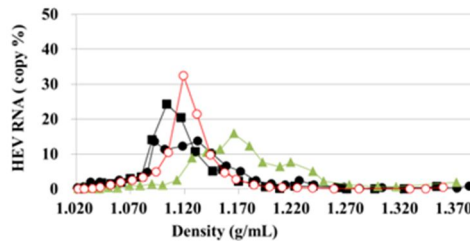
図2 由来の異なる HEV の密度勾配遠心分析-非処理又は 1% NaDCA+0.1%Trypsin 処理-

pd-HEV-1、pd-HEV-27、pd-HEV-40 は各々異なるドナー血漿由来の HEV を示す。縦軸は全フラクションの HEV ゲノム量の総和に対する各フラクションの割合を示す。

A. 25% エタノール



B. 40% エタノール



C. SD

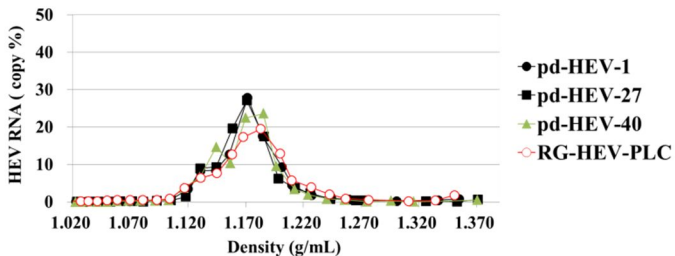


図3 pd-HEV 及び RG-HEV の密度勾配遠心分析-エタノール又は SD 処理-

縦軸は全フラクションの HEV ゲノム量の総和に対する各フラクションの割合を示す。

表 3 RG-HEV の性状解析 - 化学処理による密度勾配遠心の浮上密度と ORF2 抗体反応性変化 -

HEV	非処理	25% Ethanol		40% Ethanol		SD	
	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3
pd-HEV-1	±/±/±	-	+ / ± / ±	+	+ / + / +	+	+ / + / +
pd-HEV-27	± / + / ±	-	+ / - / +	±	+ / + / +	+	+ / + / +
pd-HEV-40	± / ± / ±	-	+ / + / +	+	+ / + / +	+	+ / + / +
RG-HEV-PLC	± / ± / ±	-	± / ± / ±	-	± / ± / -	+	+ / + / +

浮上密度変化：-；非処理に対して変化無し、±；ピーク的位置は変化無いが形状変化、+；ピーク位置が変化
 抗体結合性(ORF2 抗体による免疫沈降)：-；沈降画分の HEV が検出限界未満、±；沈降画分の HEV が陽性対照の 10% 未満、
 +；沈降画分の HEV が陽性対照の 10% 以上。陽性対照：NaDCA+Trypsin 処理 HEV

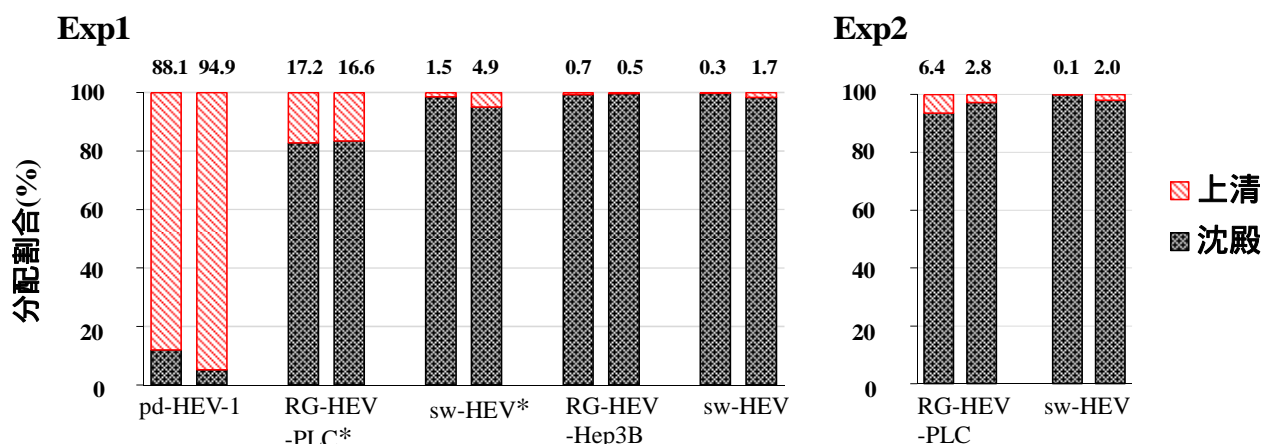


図 4 各種由来 HEV のエタノール分画 + での分配

グラフ上の数字は上清に分配された HEV ゲノム量の割合(%)を示す。

*：エタノール分画前にヒト血漿にウイルスを懸濁し、150,000g, 4 3 時間超遠心分離を行った。