

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ーウイルス除去膜ろ過工程における HEV の除去効果の検証ー』

分担研究者 前野英毅（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所）

研究協力者 高橋一恵、浦山健、井手野祥次、井上隆昌、服部眞次（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における HEV の除去・不活化効果を適切に評価することを目的に、リバースジェネティクス法により約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得した (2017 年度報告)。2018 年度は RG-HEV を用い、ウイルス除去膜ろ過工程における HEV の除去効果を検証した。

まず、RG-HEV を血漿由来 HEV (pd-HEV) の代わりとして使用することが妥当であるのか確認するために、pd-HEV 又は RG-HEV を TBS にスパイクし、プラノバ 20N と 35N (平均孔径はそれぞれ 19 nm と 35 nm) でろ過した。いずれの HEV もろ液には検出されず、35 nm 以上の大きさであることが推測できた。本来 pd-HEV や RG-HEV には、ブタ糞便由来 HEV と異なり脂質が結合しているが、血漿分画製剤の製造ではアルコール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理工程において脂質が除かれて粒子径が小さくなることが予想された。そこで、ワーストケースを想定し、RG-HEV と pd-HEV をデオキシコール酸ナトリウム/トリプシン (NaDCA/T) 処理し、プラノバ 20N と 35N の除去効果を検証した。プラノバ 20N ではいずれの HEV もろ液には検出されなかった。一方、プラノバ 35N では、いずれの HEV もろ液で同程度検出されたことから、NaDCA/T 処理した RG-HEV と pd-HEV は同程度の大きさであることが推測できた。

血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC のプラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果を検証するにあたり、製造フロー上流に S/D 処理工程が含まれることからワーストケースである NaDCA/T 処理した RG-HEV を用いた。その結果、LRV はゲノム濃度測定で $\geq 5.3/\geq 5.3$ 、感染価測定で $\geq 4.7/\geq 4.3$ となり、プラノバ 20N ろ過工程は HEV の除去に有効な工程であると確認された。

A. 研究目的

略語； HEV: Hepatitis E virus. NaDCA: Deoxycholic acid sodium salt. TBS: Tris-Buffered Saline. LRV: Log Reduction Value.

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) を製造工程液に添加し、ウイルス除去・不活化効果を検証することが望ましいが、高濃度の 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る。

そこで、一般社団法人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)}。

昨年度は pd-HEV と同様に脂質が結合した HEV をリバースジェネティクス法により培養上清中に約 9 Log copies/mL の高濃度で得られたこと、及び得られた HEV (RG-HEV) に各種の処理を行った場合の密度や抗体反応性から RG-HEV と pd-HEV は脂質の性状が異なる可能性があることを報告した。

本年度は、RG-HEV を用いてウイルス除去膜ろ過工程の除去効果を評価することの妥当性を検証し、血液凝固第 VIII 因子製剤・クロスエイト MC のプラノバ 20N

B. 研究方法

(1) ウイルス

RG-HEV は、PLC/PRF/5 細胞にブタ糞便由来の swJR-P5 株の合成ゲノムをトランスフェクションし、その培養上清中に産生された HEV を用いた (2017 年度分担研究報告書参照)。pd-HEV として HEV ゲノム陽性血漿、sw-HEV として swJR-P5 株をウイルス材料とした。

(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⁴⁾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) HEV の NaDCA/T 処理

各 HEV を超遠心分離し (150,000×g、3 時間、4°C)、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した。これらの懸濁液に対して NaDCA を終濃度 1%、Trypsin を終濃度 0.1% 加え、37°C で 2 時間インキュベーションした。また、陰性コントロールとして、50 mM Tris 緩衝液のみを加え 37°C で 2 時間インキュベーションした。

(5) ウイルス除去膜ろ過

各 HEV の大きさの比較

RG-HEV、pd-HEV 及び sw-HEV を氷冷下で 4 分間 2 回超音波処理後、0.22 µm フィルターでろ過した。これを終濃度約 5 Log copies/mL となるように TBS に添加し、その内 10 mL をプラノバ 20N (平均孔径 19 nm、膜面積 0.001 m²) 又はプラノバ 35N (平均孔径 35 nm、膜面積 0.001 m²) で室温、20 kPa でろ過を行い、ろ液 (Filtrate) を回収した。その後、10 mL の TBS で押し出し洗浄し、洗浄液 (Post wash) を回収した。ろ過前後の各サンプルを、2 U/mL の

Micrococcal Nuclease で 28°C 30 分間処理後、ゲノム濃度を測定した。

クロスエイト MC ・ プラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果

RG-HEV を氷冷下で 4 分間 2 回超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。これを最終約 8 Log copies/mL となるように血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC 製造工程中間液に添加し、0.22 μm フィルターでろ過後、その内 27 mL をプラノバ 20N でろ過した (室温、80 kPa)。ろ液を回収した後、実製造と同様に 10 mL の緩衝液で押し出し洗浄し、洗浄液 (Post wash) を回収した。ろ過前後の各サンプルの HEV 感染価を測定した。また、それぞれのサンプルを 0.8 U/mL の RNaseA で 37°C 30 分間処理後、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) 各 HEV の大きさ

RG-HEV を pd-HEV の代わりとして使用することが妥当であるのか確認するために、pd-HEV、RG-HEV 及び sw-HEV を TBS にスパイクし、プラノバ 20N と 35N でろ過した。その結果、sw-HEV はプラノバ 20N ろ液中からは検出されず、プラノバ 35N ろ液からは検出された。一方、pd-HEV と RG-HEV はいずれのろ液でも検出されず、それぞれ 35 nm 以上の大きさであることが推測できた (表 1、2)。pd-HEV や RG-HEV は、sw-HEV と異なり脂質が結

合しているが、血漿分画製剤製造工程であるアルコール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により、脂質が除かれて粒子径が小さくなることが予想された。そこで、ワーストケースを想定し、各 HEV を NaDCA/T 処理してプラノバ 20N と 35N の除去効果を検証した。プラノバ 20N では、いずれの HEV もろ液では検出されず同様な除去効果であった (表 1)。また、プラノバ 35N では、pd-HEV と RG-HEV はろ液で同程度に漏れ出ていることから (表 2)、NaDCA/T 処理 RG-HEV は同処理 pd-HEV とほぼ同じ大きさであると推測され、ウイルス除去膜ろ過工程で pd-HEV の代わりとして使用することは妥当であると判断した。なお、sw-HEV は NaDCA/T 処理の有無に関わらず、プラノバ 35N ろ液に約 5 Log copies の HEV ゲノムが検出され、比較した HEV の中で一番小さいウイルスであると推測された。

(2) クロスエイト MC ・ プラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果

血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC のプラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果を検証するにあたり、製造フロー上流に S/D 処理工程が含まれることからワーストケースである NaDCA/T 処理した RG-HEV を用いた。このウイルスをクロスエイト MC の実製造から抜き取った工程液に添加し、プラノバ 20N ろ過を行った (n=2) とし、LRV はゲノム濃度測定で $\geq 5.3/\geq 5.3$ 、感染価測定で $\geq 4.7/\geq 4.3$ となり、プラノバ 20N ろ過工程は HEV の除去に有効な工程であることが確認された (表 3)。

D. 考察

血漿分画製剤製造工程に混入する可能性のある HEV は血漿由来で、場合によっては S/D 処理などに

より脂質が除去された状態となる。ただし、製造工程ではトリプシンによる消化を受ける可能性は低い
ため、NaDCA/T 処理した RG-HEV はウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価するためのワーストケースのモデルウイルスとして適している。また RG-HEV は高濃度であり、血漿分画製剤のウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価する上で有用である。

E. 結論

NaDCA/T 処理した RG-HEV はウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価する上でワーストケースのウイルスとして有用であった。このウイルスを用い、血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC のプラノバ 20N ろ過工程を評価したところ、感染価で 4 Log 以上の有効な除去効果を確認することができた。

(謝辞)

本研究の一部は筑波大学医学医療系生命医科学域環境微生物学 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):242-6.

- 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;11:679-85
- 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) 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.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

井手野 祥次、高橋一恵、浦山健、竹内薫、岡田義昭、前野英毅：細胞培養による E 型肝炎ウイルス (HEV) の高濃度産生とヒト血漿由来 HEV との性状比較. 第 42 回日本血液事業学会総会 (2018.10.2~10.4) 千葉

H. 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

表 1 緩衝液系でのプラノバ 20N ろ過実験結果

Sample	Genome(Log copies)															
	NaDCA/T -							NaDCA/T +								
	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV		
				#1	#27	#40					#1	#27	#40			
Virus-spiked material	5.4	5.4	5.3	6.0	6.2	6.0	6.5	5.9	5.9	5.9	6.1	5.9	5.6	6.4	6.5	6.6
Filtrate	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.4	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5
Post wash	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5

NaDCA/T はデオキシコール酸ナトリウムとトリプシンによる脂質膜除去処理を示し、-は処理を行っていない場合、+は処理を行った場合を示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の対数を表している。

表 2 緩衝液系でのプラノバ 35N ろ過実験結果

Sample	Genome(Log copies)															
	NaDCA/T -							NaDCA/T +								
	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV		
				#1	#27	#40					#1	#27	#40			
Virus-spiked material	5.5	5.2	5.3	6.0	6.2	6.0	6.5	6.0	5.9	5.8	6.1	5.8	5.5	6.4	6.6	6.6
Filtrate	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	5.1	3.0	<3.5	3.5	4.0	<3.5	<3.4	5.2	5.1	5.1
Post wash	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	5.3	4.2	<3.5	<3.5	4.3	2.9	<3.4	5.2	5.3	5.4

NaDCA/T はデオキシコール酸ナトリウムとトリプシンによる脂質膜除去処理を示し、-は処理を行っていない場合、+は処理を行った場合を示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の対数を表している。

表 3 クロスエイト MC 実製造工程液でのプラノバ 20N ろ過実験結果

Sample	Genome (Log copies)		Infectivity (Log TCID ₅₀)	
Virus-spiked material	9.3	9.3	6.9	6.5
Filtrate	<3.9	<3.9	<2.1	<2.1
Post wash	<3.4	<3.4	<1.6	<1.6
Filtrate+ Post wash	<4.0	<4.0	<2.2	<2.2
LRV	≥5.3	≥5.3	≥4.7	≥4.3

LRV 以外の数値はゲノム濃度 (copies/mL) または感染価 (TCID₅₀/mL) に液量 (mL) を乗じた数値 (総ゲノム量又は総感染価) の対数を表している。LRV は Virus-spiked material の総ゲノム量又は総感染価を Filtrate+Post wash の総ゲノム量又は総感染価でそれぞれ除した値の対数を表している。