

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 - 液状加熱工程における HEV の不活化効果の検証 - 』

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）

支援研究者 井上隆昌、井手野祥次、服部眞次、浦山健、高橋一恵（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高濃度の HEV (RG-HEV) を取得したが、2019 年度はこの RG-HEV を用いて液状加熱工程における HEV の不活化動態を検証した。

有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理等で RG-HEV から脂質を除去すると、熱安定性はヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) と同様に低下し、RG-HEV も脂質の結合した状態が液状加熱処理のワーストケースであることが確認できた。

アルブミン非存在下で液状加熱処理 ($59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間) を行った場合、RG-HEV は pd-HEV と同様な不活化動態で、10 時間後の LRV は 4 以上であった。一方、アルブミン存在下 (アルブミン濃度 25%) では、RG-HEV は pd-HEV と同様に安定化し、10 時間後の LRV は 1.10 であった。RG-HEV と pd-HEV の熱安定性は同程度であったことから、脂質の結合する RG-HEV を pd-HEV の代替として液状加熱処理の評価を行うことは妥当と判断された。

アルブミン製造工程にはアルコール分画工程が含まれ、最大のエタノール濃度が 40% に達することから、pd-HEV の脂質が除去されることが予想される。そこで、40% エタノールで前処理した RG-HEV を 25% アルブミン溶液へ添加し、液状加熱処理 ($59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間) を行った。その結果、10 時間後の LRV は非処理の RG-HEV と同程度であったが、不活化動態は異なっていた。以上のことから、実製造工程を模した前処理を施した RG-HEV を使用することで、実製造での液状加熱中の pd-HEV の不活化動態を推測できると考えられた。

略語； HEV: Hepatitis E virus. NaDCA: Deoxycholic acid sodium salt. TBS: Tris-Buffered Saline. LRV: Log Reduction Value. TNBP: Tri(n-butyl)phosphate.

A. 研究目的

東京都の献血者における HEV ゲノム陽性者は、1,367 人に 1 人であり¹⁾、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、NAT スクリーニングによる HEV 陽性血漿の排除に加えて製造工程における HEV 除去・不活化効果の検証が重要となる。

HEV はノンエンベロープウイルスに分類されるが、ヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) の粒子表面には脂質が結合する。これまで、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)、ネズミ脳心筋炎ウイルス (EMCV) 及びブタ糞便由来 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)}。さらに、血漿分画製剤の製造過程で、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 pd-HEV より脂質が除去され、その物理化学的性質が変化することが予想されている。これより、HEV の除去・不活化の評価には、ワーストケースまたは実態を反映したモデルウイルスを選択することが必要となる。実際に混入リスクがある pd-HEV を用いてウイルス除去・不活化効果を検証することが望ましいが、高濃度の pd-HEV を確保することは困難である。血漿分画製剤製造工程における HEV 除去・不活化工程を適切に評価するため、pd-HEV の代替品を探索し、リバースジェネティクス法により培養細胞から約 9 Log copies/mL の高濃度で脂質の結合する HEV (RG-HEV) を取得する方法を確立した (2017 年度分担研究報告書参照)。さらに、RG-HEV のウイルス除去膜工程でのろ過特性は pd-HEV と同等であり、高濃度の RG-HEV を用いて血液凝固第 VIII 因子製剤・クロスエイト MC のプラノバ 20N のろ過工程が感染価 LRV で 4 以上の有効な HEV 除去工程であることを確認した (2018 年度分担研究報告書参照)。

本年度は、液状加熱工程において RG-HEV が pd-HEV の代替品として妥当であるのか検証した。また、アルブミン製造工程のアルコール分画工程に

おいて pd-HEV が 40%のエタノールと接触するため、40%エタノールで処理した RG-HEV を用いて液状加熱工程条件での不活化動態を検証した。

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 は献血血漿からスクリーニングした HEV ゲノム陽性血漿を用いた。

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. RG-HEV の 40%エタノール処理

RG-HEV を含む培養上清を超遠心分離して沈殿を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6 で懸濁し、エタノールを最終濃度 40%となるよう添加して-6℃で 2 時間インキュベーションした。

4. 液状加熱処理 (60.0±1.0℃、120 分)

RG-HEV を含む培養上清を超遠心分離 (150,000 × g、4℃、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6 で懸濁、氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。このろ液に NaDCA を最終濃度 1%、Trypsin を最終濃度 0.1%となるよう各々加え、37℃で 2 時間インキュベーション (NaDCA/T 処理) した。インキュベーション後、再度超遠心分離 (150,000 × g、4℃、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6、

注射用水及び TBS の混合液(8:1:1 の割合)に懸濁し、氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過し、NaDCA/T 処理サンプルとした。NaDCA/T 処理の代わりに注射用水と TBS を各々最終容量の 1/10 量 (v/v)加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間 インキュベーションした RG-HEV を、コントロール処理サンプルとした。また、RG-HEV を含む培養上清に Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1%となるよう各々加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベーション (S/D 処理) した後、超遠心分離 (150,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6、注射用水及び TBS の混合液 (8:1:1 の割合)に懸濁し氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過し、S/D 処理サンプルとした。これらの処理サンプルを加熱前及び加熱処理サンプルとしてチューブへ分注した。加熱前サンプルは感染価測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルは、液温 60.0 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽内中に浸漬し 120 分間加熱処理を行った。浸漬開始 15、30、60、120 分後、各サンプルを取り出し急冷し、感染価測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザーに保存した。

5. 液状加熱処理 (59.0 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 、10 時間)

培養上清中の RG-HEV、Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した RG-HEV、40% エタノールで処理した RG-HEV を超遠心分離し(150,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間)沈殿画分をアルブミン安定化液 (20 mM アセチルトリプトファン、20 mM カプリル酸ナトリウム、60 mM 塩化ナトリウム)または 25% アルブミン溶液 (実製工程より採取された 25% アルブミン液状加熱処理直前液)により懸濁した。各懸濁液を氷上で超音波処理後、加熱前及び加熱処理サンプルとしてチューブへ分注した。加熱前サンプルは感染価測定まで、-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルを

恒温槽により加温し、59.0 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ で 10 時間加熱処理を行った。加熱開始 0.5、1、5、及び 10 時間後にそれぞれのチューブを取り出し急冷し、感染価測定まで、-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。

6. 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。液状加熱処理の不活化効果は加熱処理前サンプルのウイルス感染価を加熱処理後サンプルの感染価で除した値の Log₁₀ 価を LRV として算出した。

7. RG-HEV と pd-HEV の熱安定性比較

RG-HEV と pd-HEV の熱安定性の比較には、2019 年度以前に日本血液製剤機構において取得された液状加熱処理 (59.0 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 、10 時間)による pd-HEV の不活化データを使用した。これらのデータは、血液事業 第 36 巻 第 3 号、2013;11:679-85 及び Biologicals. 2016; Sep; 44(5): 403-11.において発表している。

(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おいて承認されている。

C. 研究結果

1. RG-HEV に結合する脂質の熱安定性への寄与
pd-HEV に結合する脂質は熱安定性へ寄与する^{2,3)}。このことが RG-HEV でもあてはまるか確認するため、RG-HEV を S/D 処理、NaDCA/T 処理、又はいずれの試薬も加えずインキュベーション（コントロール処理）した。次に、各 RG-HEV を液状加熱処理（ $60.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、120 分）し、不活化カイネティクスを比較した。NaDCA/T 処理した RG-HEV は速やかに不活化され、加熱開始 30 分後に LRV は 4 に達した（図 1、緑線）。S/D 処理した RG-HEV は NaDCA/T 処理と比較し不活化速度は遅く、加熱開始 120 分後で LRV は 3 であった（図 1、赤線）。これらに対して脂質が除去されていないコントロール処理 RG-HEV は 120 分間の加熱に渡って安定であり、加熱開始 120 分後でも LRV は 1 未満であった（図 1、青線）。密度勾配遠心による解析から RG-HEV の脂質は NaDCA/T 処理でほとんどが、また S/D 処理で部分的に除去されると推察される（2017 年度分担研究報告書参照）。以上より RG-HEV でも pd-HEV と同様に結合する脂質は熱安定性に寄与することが確認できた。

2. RG-HEV と pd-HEV の熱安定性比較

RG-HEV の熱安定性を pd-HEV と比較するため、脂質の結合する RG-HEV をアルブミン非存在下（アルブミン安定化液）またはアルブミン存在下（25% アルブミン溶液）に添加し、液状加熱処理（ $59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間）を行い、pd-HEV の不活化カイネティクスと比較した^{2,3)}。アルブミン安定化液中では、RG-HEV と pd-HEV は類似するカイネティクスで不活化され、加熱開始 10 時間後の LRV は RG-HEV で

4.6、pd-HEV で 3.6 であった。（図 2、青線と赤線）。一方 25% アルブミン溶液中では、pd-HEV は安

定化することが分かっている^{2,3)}。RG-HEV も同様に安定化し、加熱開始 1 時間後まで不活化されなかった。加熱開始 1 時間から 5 時間後にかけてゆっくり不活化され両 HEV の LRV は 1 程度であった（図 2、緑線と紫線）。加熱開始 10 時間後には pd-HEV の LRV は 1.5 の検出限界であったが、加熱開始 1~5 時間までのカイネティクスをもとにすると大きな不活化は起こらないと考えられた。RG-HEV の LRV は 1 程度のままであり不活化の進行は僅かであった。（図 2、緑線）。このように、アルブミン安定化液及び 25% アルブミン溶液中で RG-HEV の不活化カイネティクスは pd-HEV に類似しており、RG-HEV の熱安定性は pd-HEV とほぼ同程度であった。

3. 40% エタノールで前処理を行った RG-HEV の不活化動態

製造工程中使用されるエタノールや S/D 試薬により pd-HEV から脂質が除去される（2018 年度分担研究報告書参照）ため、実製造工程の pd-HEV の状態を反映した HEV を用いて、不活化動態を把握することが必要となる。本研究では、アルブミン製造のアルコール分画工程でエタノール濃度が最大 40% となることから、40% エタノールで前処理した RG-HEV を 25% アルブミン溶液に添加し、液状加熱試験（ $59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間）を行った。40% エタノールで前処理した RG-HEV は、加熱開始直後から不活化され、加熱開始 1 時間後には感染価 LRV は 1 程度に達した。一方、それ以降の不活化に進行は無く、加熱開始 10 時間後の感染価 LRV は 1 程度のままであり、最終的な LRV は非処理の RG-HEV や pd-HEV と同程度であった（図 3）。

D. 考察

RG-HEV でも pd-HEV と同様に、ウイルス粒子表面

に結合する脂質を有する方が、その熱安定性は高いことから、脂質を有する HEV を用いて液状加熱処理工程の HEV 不活化効果を評価することはワーストケースとなる。また、アルブミン安定化液及び 25%アルブミン溶液中での液状加熱における非処理の RG-HEV と pd-HEV の不活化動態は同様であったことから、液状加熱工程における HEV の不活化効果を評価する際に非処理 RG-HEV を使用することが可能であろう。さらに、非処理 RG-HEV は液状加熱工程の評価においてワーストケースであるが、アルブミンのアルコール分画工程を経た HEV を考慮する時には、40%エタノールで前処理した RG-HEV を用いる方が実態を反映しているであろう。このように RG-HEV に実態を反映した前処理を施すことにより、加熱工程における pd-HEV の不活化動態を適切に評価できると考えられる。

E. 結論

RG-HEV と pd-HEV の熱安定性は同程度であり、液状加熱処理の pd-HEV の不活化を評価する上で RG-HEV は有用である。また、実製造を反映させる前処理した RG-HEV を使用することで、万が一実製造に pd-HEV が混入した場合の液状加熱中の不活化動態を確度高く推測することが可能である。

(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) 東京地域における HEV 感染実態調査
薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料 (平成 28 年 8 月 3 日開催)

<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000138834.pdf>

- 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

Practical Approach to Evaluating the Removal of Hepatitis E Virus, a Membrane-Associated Non-Enveloped Virus by Nanofiltration Membrane., 22nd Planova™ Workshop, Portugal, 2019/10/10

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

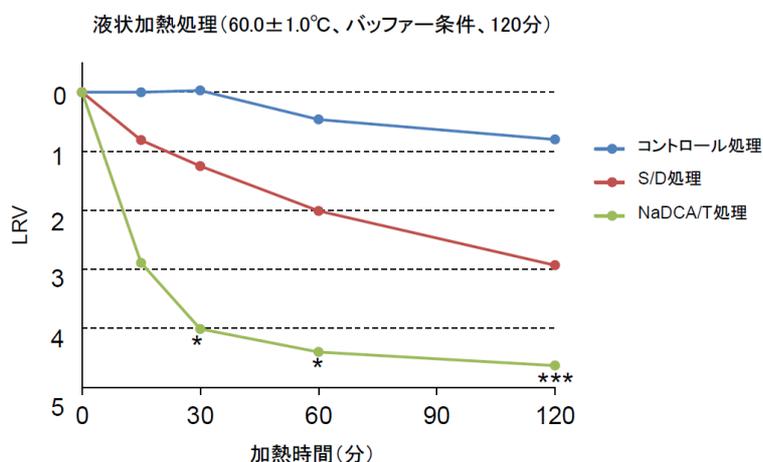


図1 各処理を行ったRG-HEVの不活化動態

コントロール処理、S/D処理、NaDCA/T処理したRG-HEVを液状加熱処理(60.0±1.0°C、120分)した。加熱時間とLRVの関係を示した。*は3回の感染価測定のうち1回が検出限界以下、***は3回の感染価測定のうち3回全てが検出限界以下であることを示す。

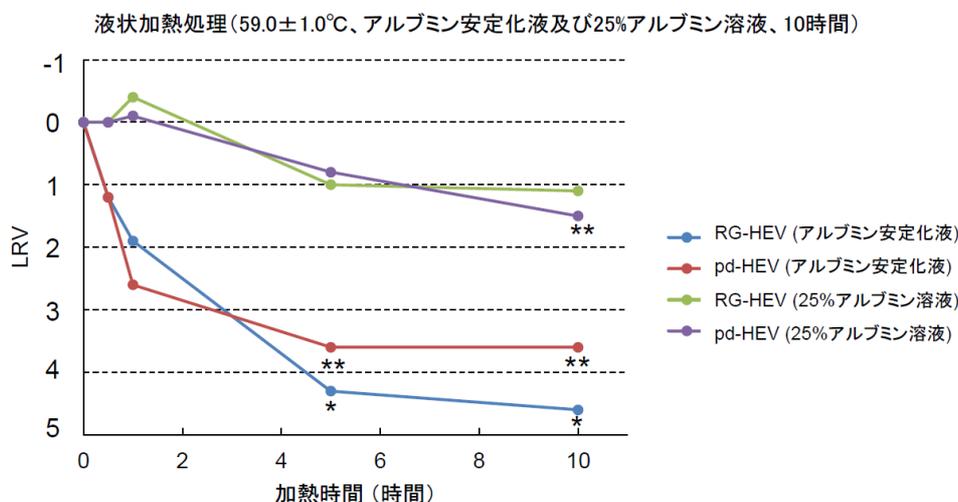


図2 RG-HEVとpd-HEVの不活化動態比較

RG-HEVをアルブミン安定化液及び25%アルブミン溶液に添加し(それぞれRG-HEV(アルブミン安定化液)及びRG-HEV(25%アルブミン溶液)と表記)、液状加熱処理(59.0±1.0°C、10時間)を行った。本研究以前に同様の試験を行い取得したアルブミン安定化液中のpd-HEV及び25%アルブミン溶液中のpd-HEV(それぞれpd-HEV(アルブミン安定化液)及びpd-HEV(25%アルブミン溶液)と表記)の不活化動態も示した。*は2回の感染価測定のうち1回が検出限界以下、**は2回の感染価測定のうちいずれも検出限界以下であることを示す。

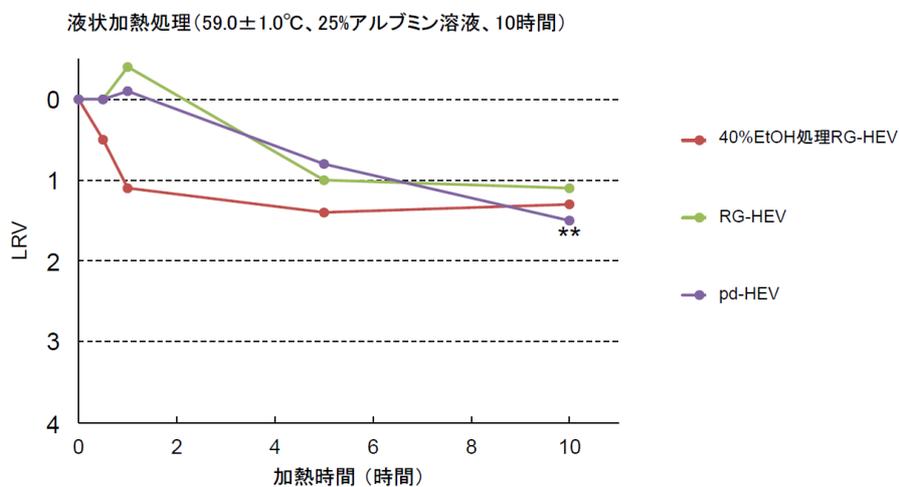


図3 40%エタノールで前処理したRG-HEVの不活化動態

40%エタノールで処理したRG-HEV(40%EtOH処理RG-HEV)を25%アルブミン溶液に添加し液状加熱処理($59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10時間)を行った。図2と同様に加熱時間とLRVの関係を示した。比較のため、図2のRG-HEV(25%アルブミン溶液)とpd-HEV(25%アルブミン溶液)の不活化動態も示した。