

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』

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]

本分担研究では血漿分画製剤製造工程における HEV の除去・不活化を適切に評価する方法の確立を目指した。

1 年目は確保が困難なヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) を代替するモデルウイルスを探索し、リバースジェネティクス法を用いて培養細胞より約 9 Log copies/mL の高濃度 HEV (RG-HEV) を産生する方法を確立した。RG-HEV の粒子表面には pd-HEV と同様に脂質が結合しており、有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理によって部分的に、またデオキシコール酸ナトリウム/トリプシン (NaDCA/T) 処理によりほぼ全て除去されることを確認した。

2 年目は RG-HEV を用いたウイルス除去膜ろ過工程による HEV 除去効果を検証した。脂質の除去により HEV の粒径は小さくなり、NaDCA/T 処理した場合がウイルス除去膜ろ過工程のワーストケースとして想定された。NaDCA/T 処理した pd-HEV と RG-HEV のろ過特性は同等であり、NaDCA/T 処理 RG-HEV を用いたウイルス除去膜ろ過工程の評価は妥当であった。NaDCA/T 処理 RG-HEV を用いて血液凝固第 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が確認できた。

3 年目は RG-HEV を用いた液状加熱工程による HEV 不活化動態を検証した。RG-HEV でも pd-HEV と同様に、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った。両 HEV の熱安定性は同程度であったことから、脂質が結合する 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であった。

以上のように、高濃度で取得可能な RG-HEV を用い、血漿分画製剤製造工程でのウイルス除去膜ろ過工程による除去効果及び液状加熱による不活化効果の評価法を確立した。

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 陽性血漿の排除や製造工程での 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プタ
 バルボウイルス (PPV)、ネズミ脳心筋炎ウイルス
 (EMCV) 及びプタ糞便由来 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)}。実際
 に混入するリスクがある 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った。さ
 らに、血漿分画製剤の製造過程で用いられるアルコ
 ール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により
 pd-HEV から脂質が除去され、その物理化学的性質
 の変化が予想される。そのため、HEV の除去・不活
 化効果を評価する際には、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必要がある。
 このように既存のモデルウイルスとは異なる特性を
 有する pd-HEV を代替するモデルウイルスを探索し、
 候補となるモデルウイルスを用いて、血漿分画製剤
 製造工程における HEV の除去・不活化評価法を確
 立することが本研究の目的である。

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
 LC131066、pd-HEV-27 : GenBank LC386856、
 pd-HEV-40 : GenBank LC386855)。

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. リバースジェネティクス法を用いた培養細胞か らの HEV 産生

sw-HEV 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 DH5α 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。合成された RNA に対し ScriptCap mG
 Capping System (Epicentre) を用いて 5' 末端のキャッ
 ピングを行い、TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus)
 を用いて PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし
 た。2~3 日毎に培地の半量を交換し、この培地交換
 時に採取した培養上清中に含まれる HEV を
 RG-HEV として本研究に使用した。

5. HEV の処理

各 HEV を超遠心分離し (150,000 × g, 4℃, 3 時間)、
 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 2 つの処理を施し
 た; Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1%
 となるよう各々加え 30℃ で 2 時間インキュベーショ
 ン (S/D 処理)、NaDCA を終濃度 1%、Trypsin を
 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)。各処理後液を TBS で約 10 倍に希釈後、超遠心分離し (150,000 × g、4□、3 時間)、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) 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、4□、18 時間) を行った。超遠心分離後、液面より 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、各 HEV の浮上密度を求めた。

7. ウイルス除去膜による HEV の大きさ比較

RG-HEV、pd-HEV を氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。HEV の終濃度約 5 Log copies/mL となるよう各ろ液を TBS へ添加した (Virus-spiked material)。このうち 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) によりろ過し (室温、20 kPa) 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 Nuclease で 28□ 30 分間処理後、ゲノム濃度を測定した。

8. 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

NaDCA/T 処理 RG-HEV を氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。RG-HEV が終濃度約 8 Log copies/mL となるよう、このろ液を血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC 製造工程中

間液に添加した (Virus-spiked material)。再度 0.22 μm フィルターでろ過し、このうち 27 mL をプラノバ 20N でろ過した (室温、80 kPa)。ろ液 (Filtrate) を回収した後、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。

9. 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し (150,000 × g、4□、3 時間) 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。このろ液を NaDCA/T 処理後、再度超遠心分離し (150,000 × g、4□、3 時間)、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、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) を加え、37□ 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 を含む培養上清を S/D 処理後、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、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□ フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルは、液温 60.0±1.0□ 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□ フリーザーに保存した。

10. 液状加熱処理 (59.0±1.0℃、10 時間)

RG-HEV を含んだ培養上清及び 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 に懸濁された RG-HEV を超遠心分離し (150,000 × g、4℃、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 (実製造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℃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±1.0℃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℃フリーザー中に保存した。なお比較のため示した pd-HEV の不活化データは、2017 年度以前に取得し、論文誌に発表済み^{2,3)}である。

(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. リバースジェネティクス法を用いた培養細胞からの HEV 産生

sw-HEV をもとに合成された HEV ゲノムを PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし、約 60 日間培養した。培養上清中の HEV RNA を定量すると、約 30 日目に培養上清中の HEV RNA 濃度は約 9

Log copies/mL に達し、その後も同程度の HEV RNA が検出された (図 1A)。トランスフェクション 4、24、及び 54 日後に回収した培養上清中の HEV 感染価を測定したところ、検出される HEV RNA 量に応じて感染価は上昇し、感染性を有した HEV (RG-HEV) が高濃度で産生されていることが確認された (図 1B)。

2. 密度勾配遠心による RG-HEV の評価

RG-HEV の浮上密度を、ドナーの異なる 3 種の pd-HEV (-1, -27, -40) 及び sw-HEV と比較した。RG-HEV のピークは 1.121 g/mL であり、脂質の結合する pd-HEV のピーク (1.102-1.108 g/mL) より僅かに高く、脂質を有さない sw-HEV のピーク (1.239 g/mL) より低かった (図 1C)。RG-HEV 及び pd-HEV を NaDCA/T 処理すると 1.225-1.234 g/mL にピークを示し、sw-HEV とほぼ同じになった (図 1D)。また NaDCA/T 処理に比べてその程度は小さいが、S/D 処理によっても高密度 (1.171-1.185 g/mL) へピークが変化した (図 1E)。これより、RG-HEV には pd-HEV と同様に脂質が結合し、この脂質は NaDCA/T 処理によりほぼ全てが、S/D 処理により部分的に除去されることが確認された。

3. HEV の大きさ

RG-HEV または pd-HEV を TBS に添加し、プラノバ 20N と 35N でろ過したところ、いずれのろ液でも HEV は検出されず、各 HEV は 35 nm 以上の大きさであることが推測できた (表 1, 2)。脂質の結合する HEV は、血漿分画製剤製造工程中のアルコール分画や S/D 処理によりその脂質が除去され、粒子径が小さくなると予想される。そこで、ワーストケースを想定し、NaDCA/T 処理した HEV のプラノバ 20N

と 35N による除去効果を検証した。プラノバ 20N の液中には、いずれの HEV も検出されなかったが (表 2) プラノバ 35N では、pd-HEV と RG-HEV は液中に同程度に漏れ出し (表 1) NaDCA/T 処理後の pd-HEV と RG-HEV はほぼ同じ大きさと推測された。これより、ウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果の検証に pd-HEV の代わりとして RG-HEV を使用することは妥当と判断した。

4. 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 の実製造から採取し工程液に添加し、プラノバ 20N ろ過を行った (n=2) と、LRV は、感染価測定で 4.7/ 4.3 となり (表 3)、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。

5. RG-HEV に結合する脂質の熱安定性への寄与

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 RG-HEV の液状加熱処理 (60.0±1.0℃、120 分) を行い、感染価を測定した。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、120 分後の LRV は 1 未満であった (図 2A 青線)。一方、NaDCA/T 処理により脂質が除去された RG-HEV は速やかに不活化され、30 分後の LRV は 4 に達した (図 2A 緑線)。S/D 処理により脂質が部分的に除去された RG-HEV も不活化された

が、そのカイネティクスは NaDCA/T 処理より遅かった (図 2A 赤線)。以上より、過去に報告した pd-HEV^{2, 3)}と同様、RG-HEV でも脂質の結合した状態の熱安定性は高いことが確認された。

6. 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 をアルブミン安定化液または 25% アルブミン溶液に添加し、液状加熱処理 (59.0±1.0℃、10 時間) し、加熱開始 0.5、1、5、及び 10 時間後の感染価を測定し、過去に同条件で処理を行った pd-HEV と比較した^{2, 3)}。アルブミン安定化液中で、RG-HEV は pd-HEV と類似するカイネティクスで不活化され、10 時間後の LRV は 4 以上であった (図 2B 赤と青線)。一方 25% アルブミン溶液中では、pd-HEV と同様に、RG-HEV は安定化し、1 時間後まで不活化されなかった。その後、RG-HEV はゆっくり不活化され 10 時間後の LRV は 1 を僅かに超え (図 2B 緑線)、その不活化カイネティクスは pd-HEV に類似していた (図 2B 緑と紫線)。以上より、両 HEV の熱安定性はほぼ同程度と推察され、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した

D. 考察

リバースジェネティクス法を用いて培養細胞 PLC/PRF/5 より産生される RG-HEV の濃度は 9 Log copies/mL (およそ 6 Log TCID₅₀/mL 相当) であり、血漿分画製剤の HEV 除去・不活化工程を感染価で評価することが可能である。

RG-HEV には pd-HEV と同様に脂質が結合しているが、NaDCA/T 処理により脂質が除去され RG-HEV の粒径は同処理した pd-HEV と同様な大きさとなっ

た。血漿分画製剤の製造工程に用いられるエタノール分画や S/D 処理によっても pd-HEV から脂質は除去されたが、その効果は NaDCA/T 処理よりも低く、ウイルス粒子表面の脂質が残存していると推察された(図 1D と E、及び 2017 年度分担研究報告書参照)。そのため、NaDCA/T 処理により脂質を除去した RG-HEV は血漿分画製剤工程中の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に適するだろう。

また、RG-HEV は、pd-HEV と同様に脂質を除去すると熱安定性が同程度に低下した。このことから、脂質が結合した非処理 RG-HEV を用いて、液状加熱工程における HEV 不活化効果を評価することがワーストケースとなるだろう。

本研究より製造工程において HEV から脂質が除去されることが予想されている(2017 年度分担研究報告書参照)。この実態を反映する前処理を施した RG-HEV を使用することにより、ウイルス除去・不活化工程における pd-HEV の動態を確度高く推測することもできるだろう。

E. 結論

リバースジェネティクス法により得られた高濃度の RG-HEV を用い、血漿分画製剤製造工程でのウイルス除去膜ろ過工程における HEV 除去効果及び液状加熱工程における HEV 不活化効果を評価できるようになった。

(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(現・水戸中央病院長)、大城幸雄先生(現・東京医科大学茨城医療センター消化器外科 所属)、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

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.*

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

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

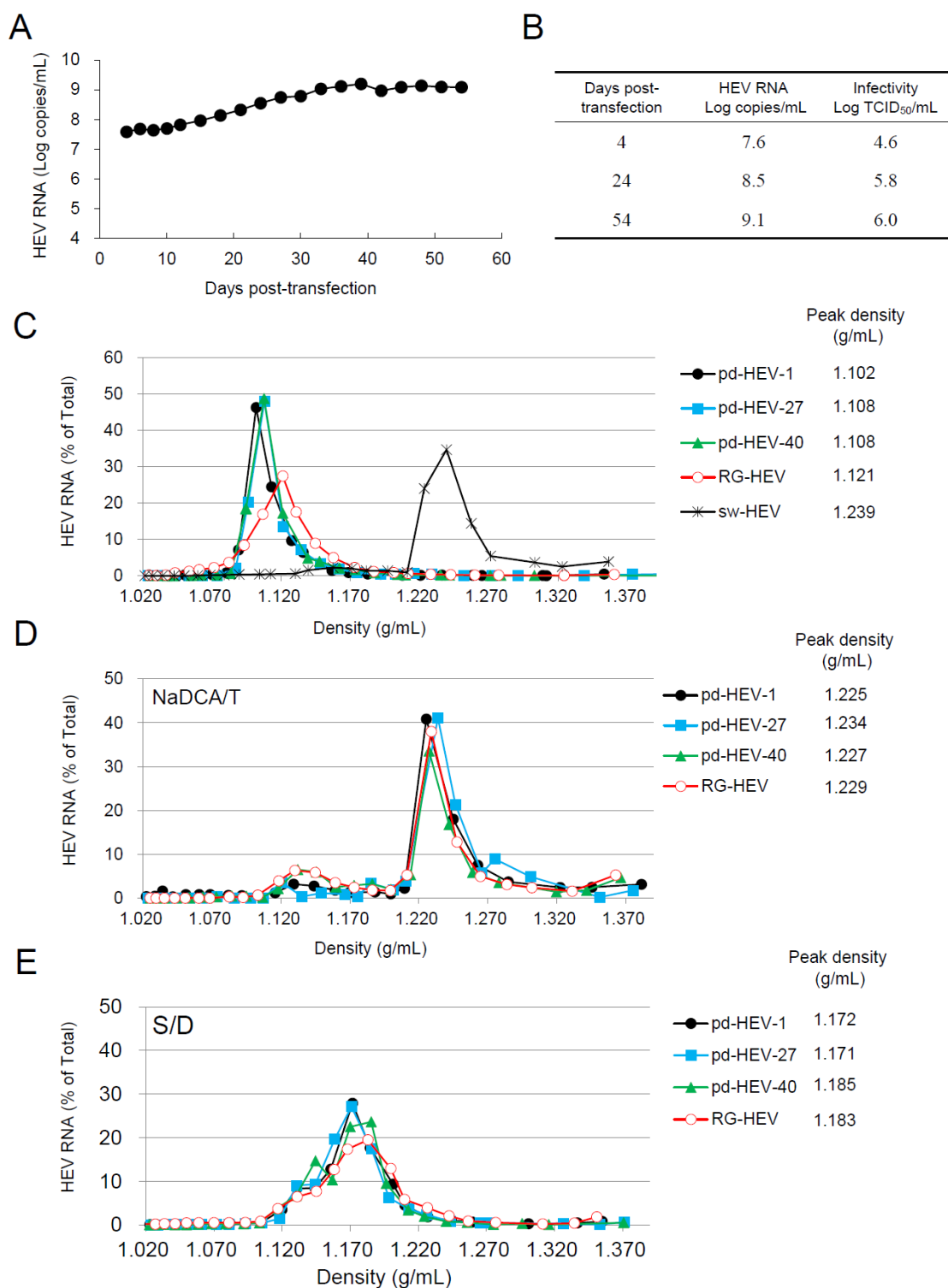


図1 RG-HEV の産生と密度勾配遠心による解析

A. sw-HEV のゲノムを鋳型に合成したゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に Transfection し、培養上清中の HEV RNA を経時的に定量した。B. 示された日に回収した培養上清中の HEV RNA を定量し、感染価 (HEV infectivity) を測定した。C. RG-HEV、3 種の異なるドナー血漿由来の HEV (pd-HEV-1、pd-HEV-27、pd-HEV-40) 及び sw-HEV を密度勾配遠心により分析した。縦軸は全フラクションの HEV RNA 量の総和に対する各フラクションの割合を示す。D. NaDCA/T 処理後の RG-HEV、pd-HEV-1、pd-HEV-27、及び pd-HEV-40 を密度勾配遠心により分析した。E. S/D 処理後の RG-HEV、pd-HEV-1、pd-HEV-27、及び pd-HEV-40 を密度勾配遠心により分析した。

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

表1 TBS に添加した HEV のプラノバ 35N ろ過実験結果

(-)は NaDCA/T 処理を行っていないこと、(+)は処理を行ったことを示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の常用対数を表す。

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

表2 TBS に添加した HEV のプラノバ 20N ろ過実験結果

(-)は NaDCA/T 処理を行っていないこと、(+)は処理を行ったことを示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の常用対数を表す。

Sample	Infectivity	
	Log TCID ₅₀	
Virus-spiked material	6.9	6.5
Filtrate	<2.1	<2.1
Post wash	<1.6	<1.6
Filtrate+ Post wash	<2.2	<2.2
Virus LRV	4.7	4.3

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

各 Sample の感染価 (TCID₅₀/mL) に液量 (mL) を乗じた数値 (総感染価) の常用対数を Infectivity LogTCID₅₀ とした。Virus-spiked material の総感染価を Filtrate と Post wash の総感染価の和で除した値の常用対数を LRV とした。

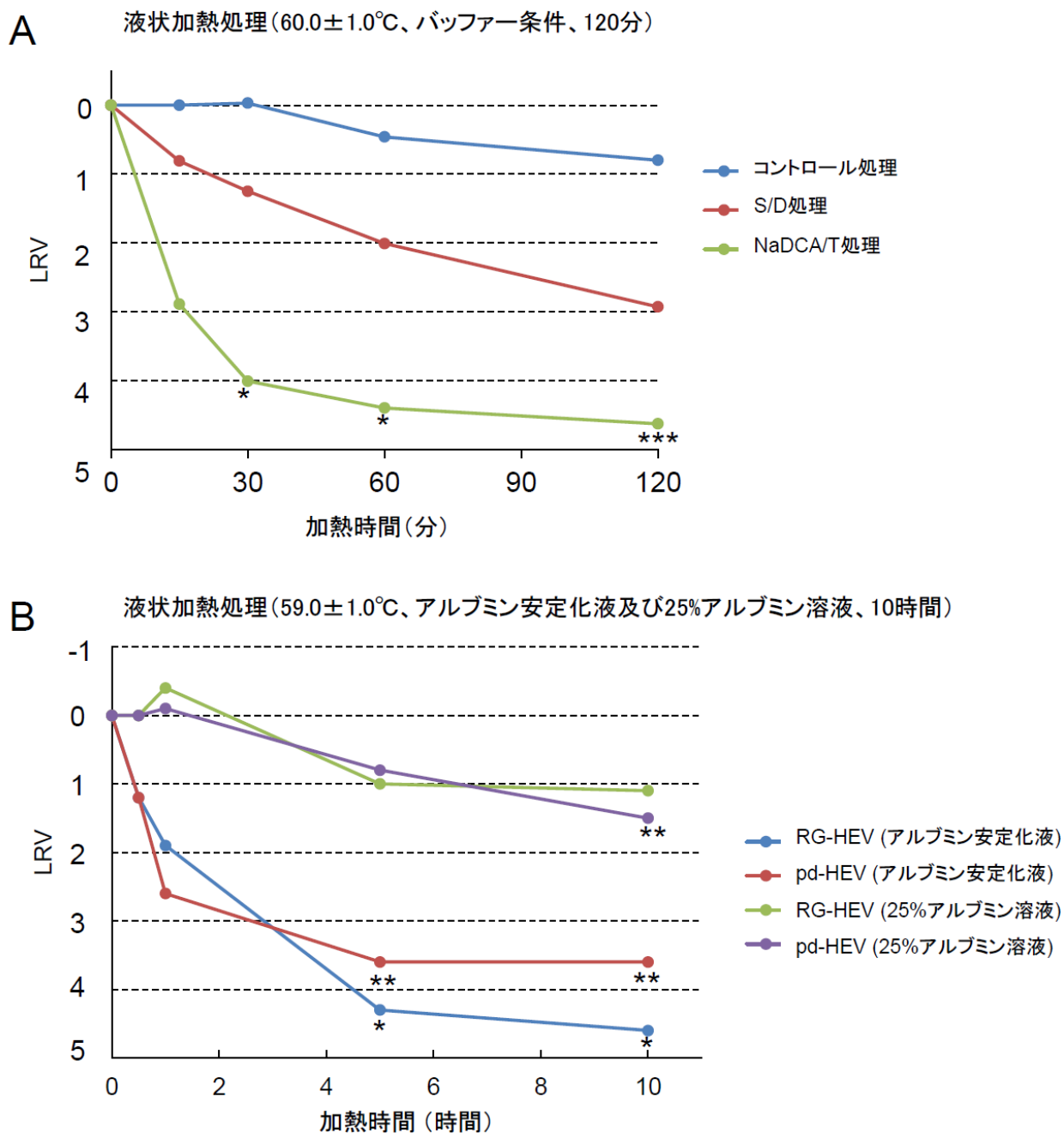


図2 液状加熱処理によるRG-HEVの不活化動態

A. 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 ($60.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、120分)処理した。加熱処理前サンプルのウイルス感染価を示された時間の加熱処理後サンプルの感染価で除した値の常用対数をLRVとし、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。

B. 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 ($59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10時間)を行った。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常用対数をLRVとし、加熱時間とLRVの関係を示した。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。