

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型肝炎ウイルスの除去/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 浦山健、井上隆昌、井手野祥次、西口優吾（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]

E型肝炎ウイルス（以下、HEV）に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEVの熱感受性の調査、及び新たにヒトへの感染が報告された動物種由来 HEV のリスク評価を実施した。

HEV の熱感受性の調査については、リバースジェネティクス法により培養細胞から産生した HEV（以下、RG-HEV）を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理（60℃, 10 時間）での不活化効果を評価した。その結果、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の不活化効果はそれぞれ、1 Log reduction value（以下、LRV）、及び 2 LRV 程度であることが明らかとなった。これらの結果はヒト血液由来の HEV を用いた実験結果とも類似しており、液状加熱処理における RG-HEV のモデルウイルスとしての適正の一端を示唆するものである。また、これらの結果から、液状加熱処理は HEV に対して有効な工程ではないものの、ウイルス除去膜処理による除去効果と併せることで、HEV に対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。

動物種由来 HEV のリスク評価については、新たにヒトへの感染が報告されたウサギ、及びラット HEV の 2 種類について実施した。ウサギ HEV は、これまでヒトへの感染の報告がある動物種（イノシシ、シカ、ブタ）の HEV と遺伝学的に近縁であり、構造タンパク質の相同性も高いことから、これまで対象としてきた HEV と同様、NAT による検出やウイルス除去・不活化処理は有効に機能する可能性が高いと考えられた。一方、ラット HEV については、これまで報告のある HEV と異なる遺伝子型に分類されるため NAT をすり抜ける可能性が高いものの、粒子サイズは他の HEV と変わらないことから、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられた。総じて、新たな動物種由来の HEV に対して、注視は必要なものの血漿分画製剤のウイルス安全性に対する追加の施策は必要ないと考察した。

略語； HEV: Hepatitis E virus

NAT: Nucleic acid amplification test

LRV: Log reduction value

S/D: Solvent/Detergent

A. 研究目的

加熱の不十分なブタ、イノシシ、及びシカの肉の摂取が国内における HEV 感染の主たる原因と

考えられている¹⁾。ウイルス血症を起こしながらもほぼ無症状の HEV 感染者も多く存在することがわかっており、2016 年に行われた HEV 感染実態調査では東京都の献血者の 1,367 人に 1 人が HEV ゲノム陽性であった²⁾。2002 年から 2020 年にかけて輸血用血液製剤による HEV 感染は計 45 件報告されている³⁾。2020 年 8 月より HEV-NAT による献血者の全数スクリーニングが導入されて以来、輸血による HEV 感染事例は報告されておらず、輸血用血液製剤の安全性は向上している。しかしながら、近年、これまで知られていない動物種に由来する HEV のヒトへの感染事例が報告されており、動物種によっては NAT をすり抜ける可能性があり注視が必要である¹⁾。一方、数千～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、製造工程中での HEV 除去・不活化効果を適切に調査することで、HEV に対する安全性の検証が可能となる。過去に厚生労働科学研究補助費をうけて実施した研究や論文報告から、ウイルス除去膜処理は HEV 除去に有効な工程であることが判明している^{4), 5)}。血漿分画製剤の製造工程中には、ウイルス除去膜処理の他にもウイルス不活化処理工程が導入されており、これらの工程での HEV 不活化能を適切に調査し、その不活化効果をウイルス除去膜処理による除去効果と合わせることで、HEV 安全性の向上が期待される。

血漿分画製剤中の HEV の除去・不活化の適切な評価には、ヒト血漿中の HEV (以下、Pd-HEV) を使用することが望ましい。しかしながら、評価に必要な高濃度の Pd-HEV を十分量確保できないことから、これまでそのような評価は困難であった。一般社団法人日本血液製剤機構では、リバースジェネ

ティクス法により培養細胞から高濃度で脂質の結合する HEV (以下、RG-HEV) を取得する方法を確立し、感染価で除去・不活化効果を評価している⁶⁾。RG-HEV のウイルス除去膜処理でのろ過特性は Pd-HEV と同等であり、評価の際のモデルウイルスとして適していることを確認した⁴⁾。一方、RG-HEV の熱感受性も Pd-HEV に類似していることを確認しているが、Pd-HEV の粒子表面には脂質が結合していることが報告されている⁶⁾。血漿分画製剤の製造過程では、エタノール分画におけるエタノールとの接触や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により、Pd-HEV 表面の脂質が除去されるため、その物理化学的性質が変化する^{4), 5), 7), 8)}。そのため、HEV の性状の違いが工程での挙動に与える影響を把握しておくことも、HEV の除去・不活化効果を評価する上で重要である。

本分担研究では、HEV に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEV の熱感受性の解析及びヒトへの感染が新たに報告された動物種由来 HEV のリスク評価を実施した。熱感受性の解析では、RG-HEV を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理による HEV 不活化効果を評価した。また、エタノールとの接触によって HEV の性状や特性が変化する可能性を踏まえて、20 vol%エタノール処理の有無が HEV の不活化効果へ与える影響も比較した。一方、ヒトへの感染が新たに報告された動物種由来 HEV のリスク評価では、ウサギ HEV とラット HEV について NAT による検出が可能であるか、血漿分画製剤に導入されているウイルス除去・不活化工程が機能するか調査した。

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。

2. 液状加熱試験用 RG-HEV の調製

RG-HEV を含む培養上清を超遠心分離 (150,000 × g, 4°C, 3 時間) し、RG-HEV を含む沈殿画分を 20 mM MOPS buffer により懸濁して得られた懸濁液を氷上で超音波処理 (4 分 × 2 回) した。次に RG-HEV を含む懸濁液にエタノールを最終濃度 20 vol% となるように加え、-6°C で 1 時間インキュベーションすることでエタノール処理を行った。またコントロールとして、エタノールの代わりに注射用水を加え、4°C で 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、RG-HEV 溶液を超遠心分離 (150,000 × g, 4°C, 3 時間) し、RG-HEV を含む沈殿画分を製剤中間工程品あるいは 10 mM MES buffer により懸濁し、エタノール処理有り RG-HEV、及びエタノール処理無し RG-HEV とした。

3. 液状加熱試験

アンチトロンビン製剤またはグロブリン製剤の中間工程品に対して、1/10 液量の RG-HEV を添加しよく混合した。加熱前サンプル、加熱処理サンプル、及び Holding サンプルとしてチューブへ分注した。加熱処理サンプルを恒温槽内にて加温し、58.0°C に達した時間を 0 タイムとして、58.0~59.0°C で 10 時間加熱した。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氷上で急速冷却し、A549 細胞用維持培地を加えた後、-80°C のフリーザー中で感染価測定まで保管した。Holding サンプ

ルは 36~37°C で 10 時間静置後、氷上で急速冷却、A549 細胞用維持培地を加えた後、-80°C のフリーザー中で保管した。

4. 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 RNA を測定し、Karber 法により感染価 (TCID₅₀) を算出した。加熱前の感染価の常用対数から加熱後の感染価の常用対数を減じた値を LRV とした。

5. 各宿主由来 HEV の塩基/アミノ酸配列比較

Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 上に登録されるウサギ HEV (Accession # JQ013793) 及びラット HEV (Accession # MK050105) の全ゲノム、並びに ORF1、ORF2、及び ORF3 の塩基配列、さらにキャプシドタンパク質をコードする ORF2 についてはアミノ酸配列についても、リバースジェネティクス法の鋳型としても使用したブタ HEV (Accession # AB481229) と Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて比較した。また、ウサギ HEV とラット HEV ゲノム配列について、遺伝子型 1~4 に属する HEV を検出することが報告されたプライマー及びプローブ配列⁹⁾ と比較し、検出が可能であるか検討した。

6. ホモロジーモデリングによるラット HEV キャプシド構造予測

構造既知の遺伝子型 4 に属するヒト由来 HEV ウイ

ルス様粒子 (VLP) (PDB # 3HAG) を鋳型として
設 定 し 、 SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org/>) のホモロジーモ
デリングによりラット HEV (Accession #
MG813927) の VLP モデルを構築した。

C. 研究結果

1. アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による HEV 不活化効果の検証

すべてのサンプルは加熱処理開始後 30 分におい
て、1 LRV 程度不活化されたが、以降の不活化はほ
んど増大しなかった (表 1 と図 1)。10 時間の液
状加熱による不活化効果は、エタノール処理有り
RG-HEV では 1.2/1.6 LRV (n1/n2)、エタノール処
理無し RG-HEV では 1.0/≥1.8 LRV (n1/n2) であり、
エタノール処理により不活化効果が増大することは
なかった (表 1 と図 1)。

2. グロブリン製剤の液状加熱処理による HEV 不活 化効果の検証

すべてのサンプルで加熱開始後 5 時間まで、不活
化効果は徐々に増大し、2 LRV 程度に達した。以降
も、エタノール処理有り RG-HEV の n2 を除き、不
活化効果は増大し、それぞれの感染価は検出限界未
満となった。10 時間の液状加熱による不活化効果は、
エタノール処理有り RG-HEV では、≥2.2/2.2 LRV
(n1/n2)、エタノール処理無し RG-HEV は ≥2.6/≥
2.4 LRV (n1/n2) であり、エタノール処理により不
活化効果が増大することはなかった。

3. 各種 HEV の配列比較及び報告 HEV プライマー/ プローブセットによる検出可能性の評価

ウサギ HEV とラット HEV に対して、これまで

リバースジェネティクスの鋳型とした用いたブタ
HEV との塩基及びアミノ酸配列の比較を行った。

その結果、ウサギ HEV とブタ HEV では、全ゲノ
ムと ORF1-3 の塩基配列で 70-90%、ORF2 のアミ
ノ酸配列も 93% と相同性が非常に高かった (表 3)。
一方、ラット HEV とブタ HEV では、全ゲノム、
ORF1、ORF2 の塩基配列が 50-60%、ORF3 の塩基
配列では 7%、ORF2 アミノ酸配列では 57% と、ブ
タ HEV との相同性は低かった (表 3)。これらの相
同性比較に一致して、遺伝子型 1~4 の HEV を検出
することが可能なプライマー/プローブの全長配列
⁹⁾ はウサギ HEV ゲノムと完全に一致しており、検
出が可能と考えられた。一方、ラット HEV とは 3'
末端部位を含む半分以上で一致していなかったこと
から、検出されない可能性が高いと考えられた (図
3)。

4. ホモロジーモデリングによるラット HEV-VLP モデルの構築

遺伝子型 4 に属する直径 27 nm のヒト由来
HEV-VLP 構造 (PDB # 3HAG) ¹⁰⁾ を鋳型にしてラ
ット HEV-VLP モデルを構築した (図 4)。構築され
たラット HEV-VLP モデルは、表面の突起構造に違
いがある可能性が高いものの、外殻の中心構造は鋳
型とした HEV-VLP と類似しており、サイズの縮小
をもたらす差異は認められなかった。以上をもとに
ラット HEV-VLP サイズは 27 nm と予想された。

D. 考察

アンチトロンビン製剤及びグロブリン製剤の液状
加熱処理における RG-HEV の不活化効果は、LRV
でそれぞれ 1~2 LRV、2 LRV 程度と見積もられた。
製造工程中の HEV の性状変化を考慮し、20vol%エ

タノールで処理をした RG-HEV も評価したが、不活化効果の違いは観察されなかった。これは、25vol%エタノールで RG-HEV を処理しても RG-HEV と pd-HEV から脂質がほとんど除去されなかったとする過去の研究結果⁴⁾とも一致し、分画 II + III までに使用されるエタノール処理が pd-HEV の熱感受性に及ぼす影響は軽微と考えられた。これらのことから、液状加熱処理は HEV の不活化に有効な工程ではないが、ウイルス除去膜処理工程と合わせることで、HEV に対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。加えて、RG-HEV は Pd-HEV の挙動をよく反映しており、液状加熱処理における RG-HEV のモデルウイルスとしての適格性の一端を示唆するものである。

近年、ヒトへの感染が報告されたウサギとラットに由来する HEV のリスク評価をおこなった。ウサギ HEV については、ブタ、イノシシ、シカに由来する HEV の遺伝子型に近縁であるとの報告と一致し¹⁾、ブタ HEV と高い相同性を示した。遺伝子型 1 ~ 4 の HEV を検出することが可能なプライマーとプローブの全長配列がウサギ HEV ゲノムと完全に一致したことから、日本赤十字社で導入されている NAT でも検出される可能性が高いと考えられた。またキャプシドタンパク質をコードする ORF2 のアミノ酸配列でもブタ HEV と相同性が高いことから、除去・不活化特性もブタ HEV に類似すると推測された。

一方、ラット HEV は遺伝学的にブタ、イノシシ、シカ HEV から離れており¹⁾、配列解析の結果からも NAT をすり抜ける可能性が高いと推測された。ウイルス除去膜処理の有効性を検討するため、ホモロジーモデリングによりラット HEV VLP を構築したところ、鋳型の HEV VLP からそのサイズは変化

しないと予想された。この鋳型に使用した HEV VLP は 60 分子の ORF2 から構成され、そのサイズは 27 nm であるが、感染性を備える HEV 粒子は 180 分子の ORF2 から構成されると考えられていることから¹⁰⁾、実際のラット HEV のサイズは 27 nm より大きいと推測される。以上をもとに、ラット HEV に対しても、平均孔径 19 nm あるいはそれ以下のウイルス除去膜は有効に機能すると判断された。

E. 結論

液状加熱処理による HEV 不活化効果は一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる ≥ 4 LRV に満たなかった。しかしながら、その機序はウイルス除去膜処理とは異なることから、ウイルス除去膜処理による「有効」な除去効果に合わせることで、血漿分画製剤の総合的な HEV 安全性の向上に寄与すると考えられる。

ラット HEV は NAT をすり抜ける可能性があるが、平均孔径 19 nm あるいはそれ以下のウイルス除去膜は HEV 除去で有効に機能すると考えられる。

(引用文献)

- 1) 病原微生物検出情報 Vol. 42 No. 12 (2021. 12)
<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/42/502.pdf>
- 2) 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>
- 3) 日本赤十字社におけるヘモビジランス 2020
薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料 (令和 3 年 10 月 26 日開催)
<https://www.mhlw.go.jp/content/11127000/000846771.pdf>
- 4) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus subjected to different chemical treatments:

- Application in virus removal via nanofiltration. J Virol Methods. 2021 Oct;296:114244. なし
- 5) Kapsch AM *et al.* Antibody-enhanced hepatitis E virus nanofiltration during the manufacture of human immunoglobulin. Transfusion. 2020 Nov;60(11):2500-2507. 2. 実用新案登録
なし
- 6) Takahashi M *et al.* 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 Apr;48(4):1112-25 3. その他
なし
- 7) Yunoki M *et al.* 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.
- 8) 2019 年度 厚生労働科学研究補助費分担研究報告書
https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2019/193041/201925001A_upload/201925001A0011.pdf
- 9) Jothikumar N *et al.* 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
- 10) Guu TS *et al.* Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12992-7

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus subjected to different chemical treatments: Application in virus removal via nanofiltration. J Virol Methods. 2021 Oct;296:114244.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

サンプル名	加熱時間 (hrs)				
	0	0.5	1	5	10
エタノール処理有り RG-HEV n1	0	1.2	1.0	1.2	1.2
エタノール処理有り RG-HEV n2	0	1.4	1.0	1.2	1.6
エタノール処理無し RG-HEV n1	0	0.8	1.0	1.6	1.0
エタノール処理無し RG-HEV n2	0	1.0	0.8	1.2	≥1.8

加熱時間 (hrs)を除き数値は LRV を示す。

表 1 アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移

エタノール処理有り RG-HEV とエタノール処理無し RG-HEV 対して、2 回試験 (n1、n2) を実施した

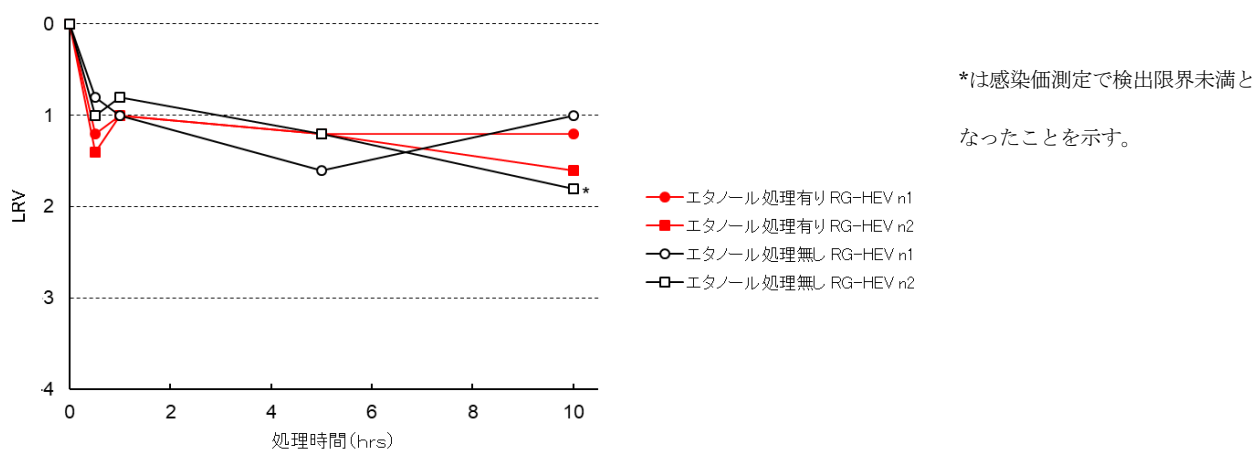


図 1 アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移 (表 1 をグラフで示した)

サンプル名	加熱時間 (hrs)				
	0	0.5	1	5	10
エタノール処理有り RG-HEV n1	0	0.4	0.4	2.0	≥2.2
エタノール処理有り RG-HEV n2	0	0.0	1.2	2.4	2.2
エタノール処理無し RG-HEV n1	0	0.8	1.2	2.4	≥2.6
エタノール処理無し RG-HEV n2	0	0.2	0.8	1.8	≥2.4

加熱時間 (hrs)を除き数値は LRV を示す。

表 2 グロブリン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移

エタノール処理有り RG-HEV とエタノール処理無し RG-HEV 対して、2 回試験 (n1、n2) を実施した。

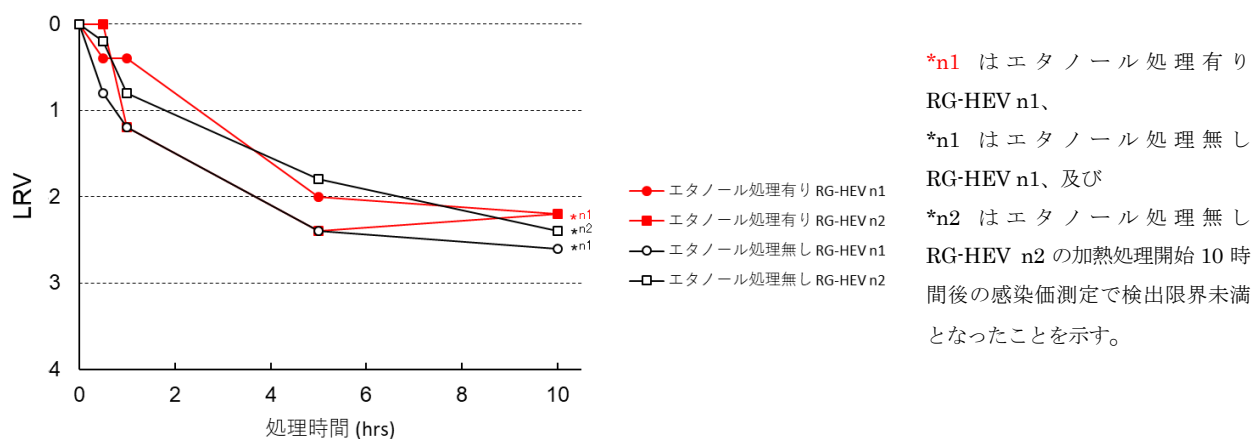


図 2 グロブリン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移 (表 2 をグラフで示した)

	ブタ HEV (AB481229) との比較 (%)				
	塩基配列				アミノ酸配列
HEV 種 (GenBank Accession#)	全ゲノム	ORF1	ORF2	ORF3	ORF2
ウサギ HEV (JQ013793)	78	77	81	87	93
ラット HEV (MG813927)	60	57	54	7	57

表 3 ウサギ HEV とラット HEV のブタ HEV に対する相同性比較
完全一致時を 100% とする

図 3 ウサギ HEV とラット HEV の遺伝子型 1~4 HEV の検出用プライマー/プローブセットとの比較

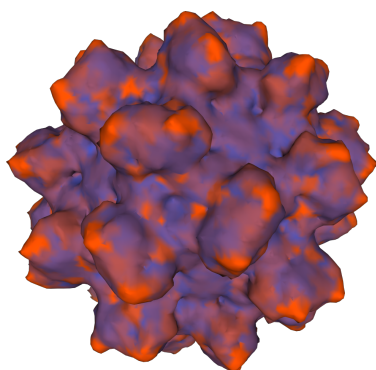


図 4 ホモロジーモデリングより予想されるラット HEV VLP 構造

鋳型として設定した HEV VLP (PDB # 3HAG) と相同性が高く同一の構造を取り得る箇所を青色で示し、相同性が低くアミノ酸配列から予測された構造については赤色で示している。