

## 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－血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去/不活化効果の評価－』

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]

本分担研究の目的は血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去/不活化効果を適切に評価することである。2020 年度は、アルブミン製剤のエタノール分画工程による除去効果とフィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程による不活化効果を評価した。

アルブミン製剤のエタノール分画工程の評価では、ヒト血漿に由来する Genotype 3 と 4 の HEV(Pd-HEV G3 と Pd-HEV G4)、さらにリバーズジェネティクス法を用いて培養細胞から産生した Genotype 3 の HEV(RG-HEV G3)の計 3 種の異なる HEV を用いた。アルブミン製剤のエタノール分画工程での総 HEV 除去効果は、対数減少率 (LRV) で 1.8~3.3 であった。

フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程の上流には有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理が存在することから、HEV に結合する脂質が除去され、乾燥加熱処理による HEV の不活化動態に影響を与えることが予想された。このため、S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV G3 をフィブリノゲン製剤の中間工程品にスパイクし、それぞれの不活化動態を調査した。その結果、S/D 処理の有無は、乾燥加熱処理による HEV の不活化効果に大きな違いを与えず、LRV はいずれも 2 程度であった。

アルブミン製剤のエタノール分画、フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程とも、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる LRV、4 に満たなかったことから、LRV 4 以上の達成が可能なウイルス除去膜工程やその他の工程を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価する必要があると考えられた。

## A. 研究目的

略語； HEV: Hepatitis E virus

NAT: Nucleic acid amplification test

LRV: Log reduction value

S/D: Solvent/Detergent

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

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<sup>1)</sup>、日本国内では輸血用血液製剤により二種の異なる遺伝子型の HEV、Genotype 3 と Genotype 4 (HEV G3 と HEV G4) の感染事例が報告されている<sup>2)</sup>。2020 年 8 月より国内すべての献血血液に対して、HEV 個別 NAT が導

入されたことから、一人のドナーに由来する献血血液から製造される輸血用血液製剤の HEV に対する安全性は向上すると期待される。一方、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検証することでさらに高い HEV 安全性を達成することが期待される。また、国外で従来の NAT 検査では検出することのできない遺伝子型に属する HEV がヒトへ感染する事例が報告されていることから<sup>3)</sup>、HEV 除去・不活化効果の適切な検証は必要と考えられた。

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)、あるいはブタ糞便由来 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、これらのウイルス表面に脂質は結合しておらず除去・不活化の挙動は Pd-HEV とは異なっていた<sup>4,6)</sup>。さらに、血漿分画製剤の製造過程で、エタノ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<sup>4,5)</sup>。これらのことより、HEV の除去・不活化の評価には、実ウイルスであるヒト血漿由来 HEV、あるいはワーストケースや製造工程の実態を正確に反映するモデルウイルスを選択することが重要である。しかしながら、高濃度の Pd-HEV を確保できないことから、定量 PCR 法による除去効果の評価しか行えず、感染価による除去・不活化効果を評価することが困難であった。この課題解決の為、リバースジェネティクス法によ

り培養細胞から約 9 Log<sub>10</sub> copies/mL の高濃度で脂質の結合する HEV Genotype 3(RG-HEV G3)を取得する方法を確立し、感染価で除去・不活化効果を評価することが可能となった<sup>6)</sup>。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<sup>6)</sup>、液状加熱における熱安定性も Pd-HEV に類似していることを確認した (2019 年度 厚生労働科学研究補助費分担研究報告書参照)。

本分担研究では、二つの工程の HEV 除去・不活化効果を評価した。一つ目は、国内外問わず多数の血漿分画製剤メーカーで分画法として採用される Cohn のエタノール分画である。遺伝子型・由来の異なる 3 種の HEV (Pd-HEV G3、Pd-HEV G4、及び RG-HEV G3) を用いて定量 PCR 法により、HEV 除去効果を評価した。二つ目はフィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程である。S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV を用いて、感染価により乾燥加熱処理工程の HEV 不活化効果を評価した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス

RG-HEV G3 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。Pd-HEV G3 は献血血漿からスクリーニングした HEV G3 RNA 陽性血漿を使用し、Pd-HEV G4 は献血血液の研究開発等での使用に関する指針に基づく公募により日本赤十字社より受領した Pd-HEV G4 陽性血漿を使用した。

### 2. エタノール分画

凍結保存された Pd-HEV G3 陽性血漿、Pd-HEV G4 陽性血漿、あるいは HEV 陰性血漿を 4℃設定のクロマトチャンバー中にオーバーナイトで静置する

ことで緩慢融解した。各血漿を含んだチューブを遠心分離 (1,500 × g、25 分間) し、沈殿 (クリオプリシピテート) を分離し、脱クリオプリシピテート血漿 (CDP) とした。HEV 陰性血漿に由来する CDP には最終濃度が 6~7Log<sub>10</sub> copies/mL となるよう RG-HEV G3 を添加した。各 CDP (3 mL) から Cohn のエタノール分画 (概要は参考文献 7) 参照) をもとに変更を加えた条件で、分画 I 工程、分画 II+III、分画 IV 工程を連続して実施した。まず、CDP を分画 I に供し、遠心分離 (400 × g、20 分間) 後、デカンテーションにより上清 I を分画沈殿 I から分離した。取得した上清 I を分画 II+III に供し、遠心分離 (1,500 × g、30 分間) 後、デカンテーションにより上清 II+III を分画沈殿 II+III から分離した。次に上清 II+III を分画 IV (分画 IV-1 と分画 IV-4 を合わせた分画法) に供し、遠心分離 (1,500 × g、30 分間) 後、デカンテーションにより上清 IV を分画沈殿 IV から分離した。

### 3. HEV RNA 濃度の測定

各分画工程の前後で分取した CDP、上清 I、上清 II+III、上清 IV から 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<sup>4)</sup>に従って HEV RNA 濃度を測定した。

### 4. HEV RNA の対数減少率 (LRV) の計算

分画 I で実際に使用した CDP 量と実際に回収した上清 I から想定される上清 II+III 量と上清 IV 量を算出した。次に、測定した HEV RNA 濃度 (Log<sub>10</sub> copies/mL) を実際の CDP 量、想定される上清 II+III 量と上清 IV 量に乘じ、各サンプルの総 HEV RNA コピー数を算出した。CDP の総 HEV RNA コピー数の常用対数から、上清 I、上清 II+III、または上

清 IV の HEV ゲノムコピー数の常用対数を減じた値を HEV RNA の LRV とした。

### 5. 乾燥加熱試験用 RG-HEV の調製

RG-HEV G3 を含む培養上清と 20 倍濃度の S/D 試薬、あるいは注射用水を 19:1 の割合で混合し、水温 28.5~29.5°C の恒温槽中で 1.5 時間インキュベーションした (前者を S/D 処理有り RG-HEV G3、後者を S/D 処理無し RG-HEV G3 とした)。インキュベーション後、各サンプル溶液を超遠心分離 (150,000 × g、3 時間) した。超遠心分離後、各チューブから上清を除去し、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。

### 6. 乾燥加熱処理 (77.0±1.0°C、72 時間)

11.5 mL の S/D 処理有り、または無し RG-HEV G3 を超遠心分離 (150,000 × g、3 時間) した。上清を除去後、沈殿画分を 2.0 mL のフィブリノゲン製剤の中間工程品 (凍結乾燥直前) により懸濁、懸濁液を氷冷しながら超音波処理してスパイクウイルスとした。13 mL のフィブリノゲン製剤の中間工程品 (凍結乾燥直前) に 1.3 mL のスパイクウイルスを添加し、バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。分注サンプルを凍結乾燥し、乾燥加熱処理まで冷蔵保存した。乾燥加熱処理時には、加熱庫が 76.0~78.0°C を維持していることを確認し、凍結乾燥後のサンプルを入れ、24、48、72 時間後に加熱庫よりサンプルを取り出し、氷上で急冷した。

### 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 RNA を測定し、Karber 法により感

染価 (TCID<sub>50</sub>) を算出した。凍結乾燥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。

(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. アルブミン製剤に対するエタノール分画による HEV 除去効果の検証

表 1 にエタノール分画による各種 HEV の LRV を示した。いずれの HEV も、分画 I で CDP から上清 I に至る過程では、ほとんど除去されなかった。分画 II+III を経て上清 II+III に至る過程では、ヒト血漿由来と培養細胞由来 HEV の間で除去程度に差が観察された。Pd-HEV G3 と Pd-HEV G4 に対する除去効果は LRV で 1 未満であったが、RG-HEV G3 は 1 以上除去された。分画 IV を経て上清 IV に至る過程では、いずれの HEV も LRV で 1 以上除去されていたが、Pd-HEV G3 の除去効果は HEV G4 及び RG-HEV G3 と比較して LRV で 1 以上高かった。結果として CDP からの総 LRV は 1.8~3.3 であった。

#### 2. フィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理による HEV 不活化効果の検証

凍結乾燥による HEV の LRV は 1 未満であったが (図 2A)、乾燥加熱処理により、S/D 処理有り無し RG-HEV G3 の不活化が観察された (図 2B)。S/D 処理無し RG-HEV G3 では、24 時間までの加熱による LRV は 2 程度であり、それ以降は緩やかに不

活化された (図 2B)。一方、S/D 処理有り RG-HEV G3 では、24 時間までの加熱による不活化効果は、S/D 処理無しの場合と比較して遅く、それ以降は同程度であった (図 2B 中の傾き参照)。最終的な LRV は S/D 処理無し RG-HEV G3 で 2.6/2.4 (n=2)、S/D 処理有り RG-HEV G3 で 1.6/1.8 (n=2) であった (表 2)。

### D. 考察

Cohn のエタノール分画は血漿タンパク質の分離のみならず、混入ウイルスに対する除去・不活化にも有することから、ウイルス安全性の観点からも重要な工程である。アルブミン製剤は原料血漿から複数のエタノール分画工程を経て製造されるが、これらの分画全工程を通じてどの程度の HEV が除去されるかは不明であった。本研究では、エタノール分画を連続して実施し、CDP から上清 IV を取得することで HEV の除去効果を検証した。連続分画中の分画 II+III では、ヒト血漿由来と培養細胞由来 HEV の間で挙動の違いが観察された。また、分画 IV ではヒト血漿由来の HEV であっても、除去効果の差が観察された。なお、分画 IV によるノンエンベロープウイルスの除去・不活化では、PPV 等のモデルウイルスでも LRV に差が生じ得ることが報告されている<sup>9)</sup>。以上より、アルブミン製剤におけるエタノール分画工程の HEV の除去効果は、Pd-HEV G4 の結果をもとに、LRV で 2 程度と推測された。

ヒト血漿中の HEV には脂質が結合しており、S/D 処理により脂質を除去すると、液状加熱による不活化効果が高くなることが報告されている<sup>45)</sup>。しかしながら、フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理では S/D 処理により不活化が向上することはなかった。以上より、乾燥加熱処理工程の不活化効果を評価す

る際は、S/D 処理有り無しでの RG-HEV を使用し、実態に即した不活化効果を検証し、総合的に判断することが妥当と考えられた。

#### E. 結論

本研究で調査したエタノール分画とフィブリノゲン製剤の製造工程の乾燥加熱処理は、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる 4 以上の LRV に満たなかった。このため、4 以上の LRV の達成が可能なウイルス除去膜処理工程とその他の工程(イオン交換クロマトグラフィ等)を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価することが必要である。

#### (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) 日本赤十字社におけるヘモビジランス 2017  
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 30 年 7 月 18 日開催)  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000336638.Pdf>
- 3) Sridhar S *et al.* Transmission of Rat Hepatitis E Virus Infection to Humans in Hong Kong: A Clinical and Epidemiological Analysis. *Hepatology*. 2021 Jan;73(1):10-22. doi: 10.1002/hep.31138. Epub 2020 Oct 12. PMID: 31960460
- 4) 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
- 5) 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.
- 6) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus

subjected to different chemical treatments: application in virus removal via nanofiltration. (under review)

- 7) 平成 22 年版血液事業報告 血漿分画製剤の製造方法  
<https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/2q/Pdf/3-9.Pdf>
- 8) 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.
- 9) Dichtelmüller HO *et al.* Contribution to safety of immunoglobulin and albumin from virus partitioning and inactivation by cold ethanol fractionation: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion*. 2011 Jul;51(7):1412-30.

#### 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  
なし

#### 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

数値はLRVを示す

	Pd-HEV G3	Pd-HEV G4	RG-HEV G3
上清I	0.2	-0.1	0.1
上清II+III	0.4	0.5	1.4
上清IV	3.3	1.8	3.0

表1 アルブミン製剤のエタノール分画工程（I、II+III、IV）における HEV 除去効果  
各 HEV を含んだ CDP を出発原料として連続的にエタノール分画を行い、最終的に上清IVを取得した。各工程品（上清）の CDP に対する LRV を示した。

A

数値は感染価 (Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>) を示す

サンプル名	凍結乾燥前	凍結乾燥後
S/D処理無し n1	5.90	5.72
S/D処理無し n2	5.50	5.52
S/D処理有り n1	4.50	4.52
S/D処理有り n2	4.90	4.32

B

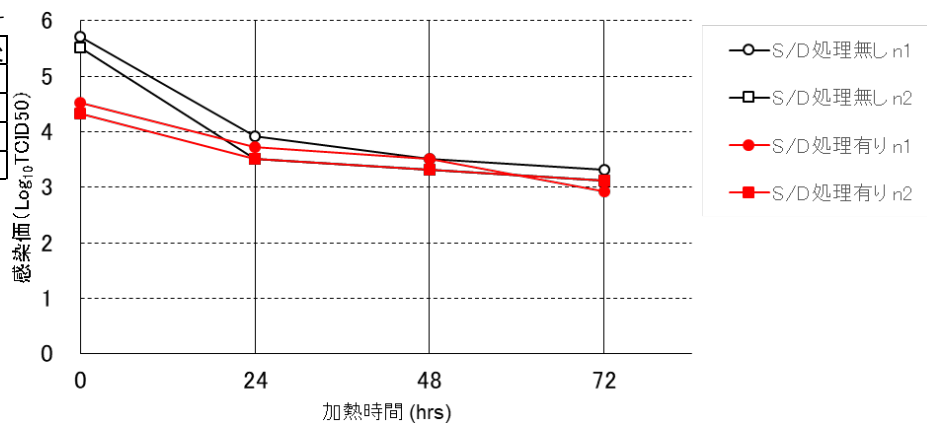


図2 フィブリノゲン製剤の製造工程中の凍結乾燥加熱工程による HEV の不活化

A 凍結乾燥前後の RG-HEV の感染価 (Log TCID<sub>50</sub>)

B 乾燥加熱処理による HEV の不活化動態

S/D 処理無しと S/D 処理有り RG-HEV G3 に対して、2 回試験 (n1、n2) を行い、測定した感染価 (Log TCID<sub>50</sub>) を表した。

サンプル名	凍結乾燥前	加熱時間 (hrs)			
		0	24	48	72
S/D処理無し n1	0	0.2	2.0	2.4	2.6
S/D処理無し n2	0	0.0	2.0	2.2	2.4
S/D処理有り n1	0	0.0	0.8	1.0	1.6
S/D処理有り n2	0	0.6	1.4	1.6	1.8

表2 凍結乾燥加熱工程による RG-HEV の LRV 推移

凍結乾燥前と各乾燥加熱時における感染価から算出した LRV を表した。