

[原著]

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

一般社団法人日本血液製剤機構¹⁾, 酪農学園大学獣医学群²⁾,大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野³⁾高橋一恵¹⁾, 大久保祐士¹⁾, 古木理恵¹⁾, 服部眞次¹⁾, 浦山 健^{1), 2)}, 坂井 薫¹⁾,柚木幹弘^{1*), 2), 3)}, 萩原克郎²⁾, 生田和良³⁾

Difference in inactivation kinetics of HEV strains derived from swine feces and human plasma during heat treatment in liquid

*Japan Blood Products Organization¹⁾,**School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University²⁾,**Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University³⁾*Kadue Takahashi¹⁾, Yuji Okubo¹⁾, Rie Furuki¹⁾, Shinji Hattori¹⁾, Takeru Urayama^{1), 2)},Kaoru Sakai¹⁾, Mikihiro Yunoki^{1*), 2), 3)}, Katsuro Hagiwara²⁾ and Kazuyoshi Ikuta³⁾

抄 録

液状加熱処理工程 (60℃・10時間) は、ヒト血漿を原料とした血漿分画製剤に導入されている効果的なウイルス不活化工程の一つである。本研究では、液状加熱処理によるE型肝炎ウイルス (以下HEV) の不活化効果について検討するとともに、その由来 (ブタ糞便、ヒト血漿) や共存するタンパク濃度の違いが熱感受性に及ぼす影響についても検討を行った。その結果、液状加熱処理によりHEVは有効に不活化されることが確認できた。またタンパク濃度がHEVの熱感受性に影響する重要な因子であることが明らかとなった。ただし、ヒト血漿由来HEVとブタ糞便由来HEVは異なる熱感受性を示し、HEVの由来によって性状に違いがあることが示唆された。したがって工程評価に用いるHEVは慎重に選択し、ウイルスの挙動をよく理解することが重要である。また工程によりさまざまな変動因子がウイルスの挙動に影響する可能性があることも考慮する必要がある。

Key words: HEV, plasma, inactivation, liquid-heating

序 文

E型肝炎ウイルス (以下HEV) は、ヘペウイルス科 (Hepeviridae)、ヘペウイルス属 (Hepevirus) に属する非エンベロープウイルスであり、E型肝炎の原因ウイルスである¹⁾。このウイルスは他のヒト肝炎ウイルスと異なり、ヒトだけでなくブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症

ウイルスであることが大きな特徴である²⁾。本邦におけるE型肝炎は衛生状態の良くない発展途上国からの輸入感染症と長く考えられてきたが、近年の調査で日本のみならず欧米を始めとする先進国においても、古くから土着していることが明らかとなった³⁾。また国内の養豚施設においても、ブタ糞便中から高頻度でHEVゲノムが検出され、

* Corresponding author: yunoki-mikihiro@jbpo.or.jp

論文受付日: 2013年3月6日

掲載決定日: 2013年7月24日

その遺伝子配列を解析したところ、日本で分離されたヒトHEVとほぼ同じであることが明らかとなっている^{4), 5)}。HEVの感染ルートは、発展途上国においては水系感染であるが、先進国においては加熱不十分なブタ・イノシシ等の内臓肉の摂取による経口感染であると考えられている²⁾。一方で、輸血によるヒト-ヒト間の感染事例が日本国内で報告されている^{6), 7)}。これらのことからE型肝炎の感染リスクは食品媒介性および医原性の両面において留意する必要がある。

血漿分画製剤は数万人分のヒト血漿を混合したプール血漿から製造されるため、個別の血漿に病原体が混入していた場合、その影響はプール血漿から製造されるすべての製剤に及ぶ。現在ではさまざまなリスク軽減対策が講じられており、とくにヒト免疫不全ウイルス (HIV)、B型肝炎ウイルス (HBV) および、C型肝炎ウイルス (HCV) などの重要な病原体に対しては抗原・抗体検査や遺伝子増幅検査が採血時に導入されており、その混入リスクは極めて低いレベルに抑えられている。加えて、血漿分画製剤にはその製造過程で複数のウイルス除去・不活化能力を有する工程が導入されており、それら工程が既知／未知の病原体に対する製剤の安全性確保に寄与している。60℃・10時間で加熱を行う液状加熱処理工程も、古くから血漿分画製剤に導入されている効果的な不活化工程の一つである⁸⁾。しかし液状加熱処理による不活化効果は、ウイルスの種類によって大きく異なり、また同じウイルスであっても加熱処理時の工程検体の溶液組成によってその効果に差が認められることが明らかになっている。さらには同じ条件でも使用するウイルス株が異なると、熱感受性が大きく異なることも明らかとなっている^{9), 10), 11)}。

我々はこれまでにGenotype 3型と4型に属するブタ糞便由来HEVを用いて液状加熱処理 (60℃・5時間) を行った。その結果、いずれも熱抵抗性を示し、ウイルスの遺伝子型による熱感受性の違いはほとんどないことを明らかにした¹²⁾。本研究では、液状加熱処理が導入されている各種製剤の加熱処理時の工程検体を用いて、60℃・10時間の処理によるHEV不活化効果について検討する

とともに、HEVの由来 (ブタ糞便、ヒト血漿) や共存するタンパクの濃度の違いが不活化効果に及ぼす影響についても検討を行った。

材料および方法

1. ウイルス

本研究ではヒト血漿およびブタ糞便由来のHEVを使用した。ヒト血漿由来HEVは、抗HEV抗体陰性、HEV-RNA陽性 (Genotype 3型、ゲノム量 $7.22\text{Log}_{10}\text{copies/mL}$) の血漿を血清化して用いた。ブタ糞便由来HEVは、実験的にGenotype 3型に属するswJR-P5株 (subgenotype 3b)^{5), 13)}を感染させたブタ糞便より調製した¹²⁾。

ヒト血漿の利用については (株) ベネシス (現一般社団法人日本血液製剤機構) のヒト組織研究倫理審査委員会、ブタへの感染実験については酪農学園大学 動物実験倫理委員会の承認のもとに行った。

2. ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの液状加熱処理

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVストックを超遠心 (150,000g, 4℃または25℃, 3時間) し、得られた沈殿をアルブミン安定化剤 (0.02mol/L アセチルトリプトファン, 0.02mol/L カプリル酸ナトリウム, 0.06mol/L 塩化ナトリウム組成) により等倍置換・懸濁したものを加熱処理前液として一部採取した。残りのウイルス含有液を0.5mLずつチューブに分注し、恒温水槽内にて加温した。チューブ内の液が58℃に達してから時間計測を開始し、0.5時間, 1時間, 5時間および10時間 (対照として37℃恒温水槽内で10時間) 後にチューブを取り出して急速冷却した後、ウイルス感染価の測定を行った。なお、加熱開始から規定温度到達までの時間は3分以内であった。

また、ヒト血漿由来HEVストックを界面活性剤 (Tween80, 終濃度1%) と有機溶剤 (TNBP: tri-n-butyl phosphate, 終濃度0.3%) で30℃・1時間処理した (以下SD処理)。これを超遠心 (150,000g, 25℃, 3時間) し、沈殿をアルブミン安定化剤にて等倍置換することで界面活性剤・有機溶剤を除去し、これを加熱処理前液とした。そ

の後、上述の通り加熱処理し、加熱前後のウイルス感染価を測定した。

3. 工程検体

アルブミン〔献血アルブミン25% 静注12.5g / 50mL, (株)ベネシス製〕, ハプトグロビン〔ハプトグロビン静注2,000単位, (株)ベネシス製〕, グロブリン〔献血ヴェノグロブリンIH5% 静注2.5g/50mL, (株)ベネシス製〕およびアンチトロニンビン〔ノイアート静注用500単位, (株)ベネシス製〕の60℃・10時間液状加熱処理工程直前液を実製造工程より採取した。5%, 1%, 0.1%および0.01%アルブミンは、25%アルブミンをアルブミン安定化剤により希釈し調製した。

4. 工程検体の液状加熱処理

ブタ糞便由来HEVストックを上述の通り超遠心し、得られた沈殿を各工程検体およびPBSにより等倍置換した。このウイルス含有液を加熱処理前液として一部採取した。残りのウイルス含有液を0.5mLずつチューブに分注し、上述の通り加熱処理を行い、残存するウイルス感染価の測定を行った。

5. ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価測定法はYunokiらの方法¹²⁾を一部改変し、96ウェルプレートを用いて行った。また加熱処理前および加熱処理後液の10倍段階希釈液を、1希釈当たり5ウェルA549細胞に感染させた。感染後7日間培養し、培養液を取り除いた96ウェルプレートを凍結融解した。自動核酸抽出装置ABI PRISM 6100のプロトコールにしたがってA549細胞中のRNAを抽出し、Applied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムによりHEV RNAを検出した。PCRに用いたプライマー、プローブはJothikumarらの報告¹⁴⁾、また反応条件はYunokiらの報告¹²⁾に従った。判定は定性的に行い、HEV RNA陽性と判定されたウェル数からウイルス感染価(TCID₅₀)をKärber法¹⁵⁾により算出した。

ウイルス不活化能はウイルス添加後液のウイルス感染価を加熱後サンプルのウイルス感染価で除

しそのLog₁₀値を対数減衰率として算出した。

結 果

1. ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの熱感受性

アルブミン安定化剤にヒト血漿およびブタ糞便由来HEVを懸濁し、加熱前のウイルス感染価を測定したところ、4.92Log₁₀ TCID₅₀/mL, 5.12Log₁₀ TCID₅₀/mL (n=2の平均値) とほぼ同じであった。両者に対して60℃・10時間の液状加熱処理を行った結果、ブタ糞便由来HEVは加熱開始から1時間目で検出限界以下まで不活化されたが、ヒト血漿由来HEVは加熱開始から5時間目で検出限界以下になった (図1 a)。

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの熱感受性に違いが生じる原因として脂質成分の関与を疑ったため、SD処理により脂質成分を除去することでHEVの熱感受性が変化するか検討した。その結果、SD処理したヒト血漿由来HEVは加熱開始から30分で検出限界以下まで不活化され、ブタ糞便由来HEVに近い挙動を示した (図1 b)。

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVを用いて25%, 5%アルブミン存在下で液状加熱処理を行った。その結果、ブタ糞便由来HEVは加熱開始から10時間目まで緩やかに不活化される傾向を示した。ヒト血漿由来HEVは加熱開始から1時間目まではほとんど不活化されないが、それ以降は10時間目まで緩やかに不活化され、ブタ糞便由来HEVよりも傾きが緩やかであった (図2)。

ブタ糞便由来HEVの10時間目の対数減衰率は、わずかに感染性が検出されたものの2.8Log₁₀, 3.1Log₁₀ (n=2の平均値) まで不活化された。一方、ヒト血漿由来HEVは $\geq 1.5\text{Log}_{10}$, $\geq 2.8\text{Log}_{10}$ (n=2の平均値) であり、検出限界以下まで不活化された。

2. タンパク濃度の違いによる熱感受性への影響

タンパク濃度が熱感受性に影響するか否かを確認するために、25%, 5%, 1%, 0.1%および0.01%アルブミンおよびアルブミン安定化剤存在下でのブタ糞便由来HEVの熱感受性を検討した。その結果、アルブミン濃度が高くなる程HEVの

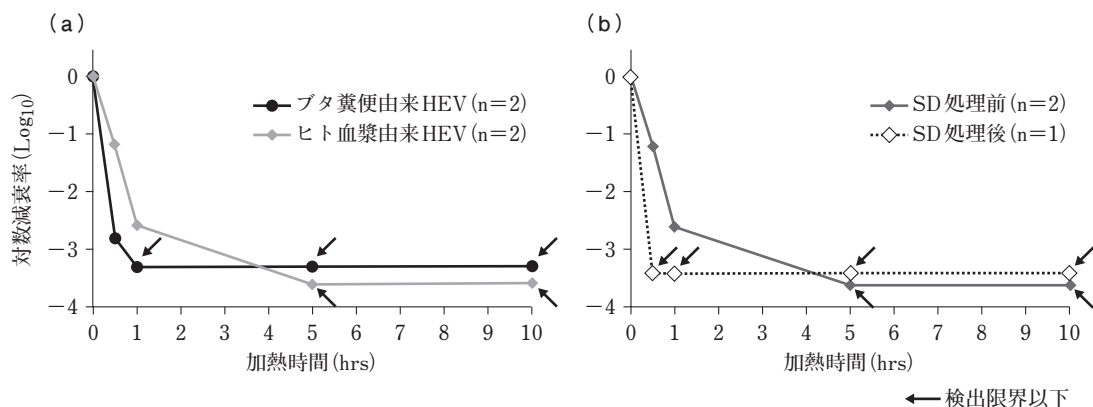


図1 a アルブミン安定化剤存在下におけるヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較
b SD処理によるヒト血漿由来HEVの熱感受性の変化

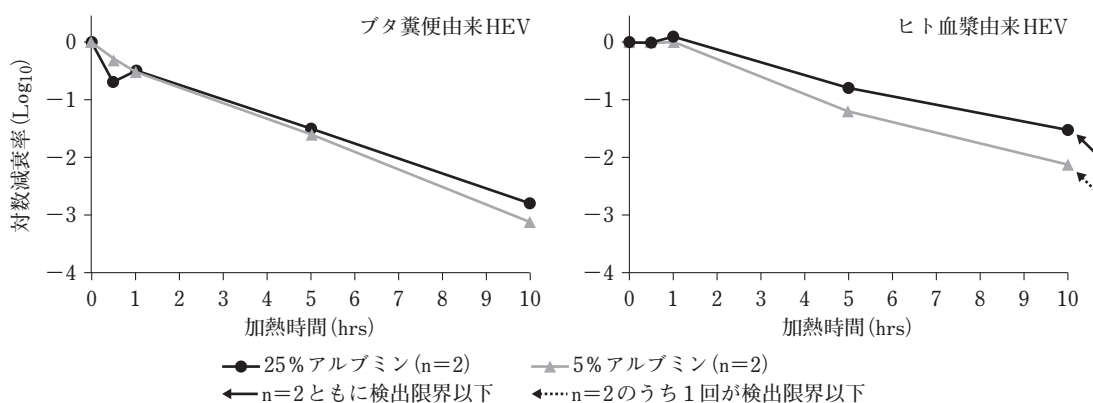


図2 25%, 5%アルブミン存在下におけるヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較

熱感受性は低くなり、とくに濃度が1%を超えると不活化されにくくなる傾向が顕著となった(図3)。

3. さまざまな製剤の工程検体におけるブタ糞便由来HEVの不活化

ハプトグロビン、グロブリン、アンチトロンビンの工程検体およびPBSにHEVを懸濁し液状加熱処理を行った結果、グロブリン以外は加熱開始から10時間で検出限界以下まで不活化された。また不活化初期段階をみると、工程検体によって不

活化曲線に違いが認められた(図4)。

考 察

これまで我々は、25%アルブミン存在下において、60℃・5時間の液状加熱処理ではHEVが不活化されにくい傾向があること、そして遺伝子型が異なってもその傾向に差がないことを明らかにした¹²⁾。この検討で用いたHEVはブタ糞便由来であることから、血漿分画製剤に混入する可能性があるヒト血漿由来HEVとの性状の違いを確認する必要があった。今回、本検討に用いること

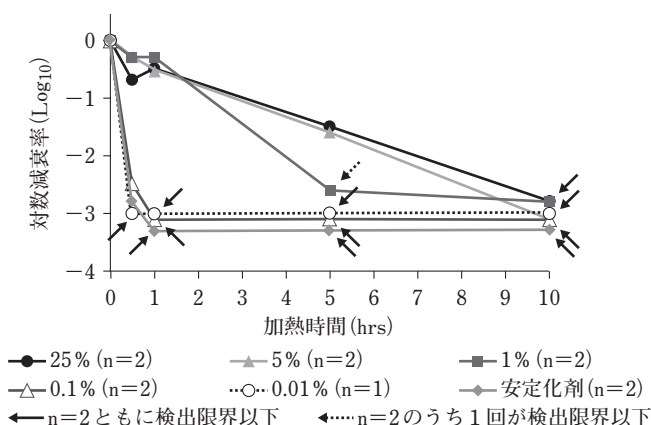


図3 アルブミン濃度によるブタ糞便由来HEVの熱感受性の違い

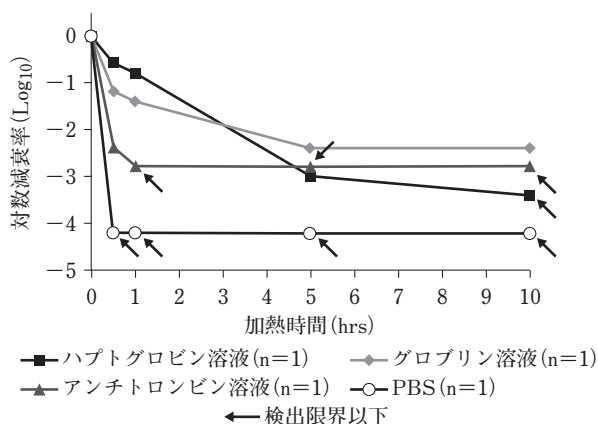


図4 各種工程検体存在下におけるブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較

が可能なHEV陽性ヒト血漿を確保できたため、比較検討を行った。その結果、いずれに由来するHEVも25%アルブミン存在下において緩やかに不活化され、加熱開始から10時間目ではほぼ検出限界以下まで不活化された。しかしながら、ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線を比較すると、その傾きに違いが認められ、ウイルスの性状に違いがあることが強く示唆された。

一部の血漿分画製剤の製造工程には、エンベロープウイルスの不活化を目的としてSD処理が導入されている。SD処理とは有機溶剤 (Solvent) と界面活性剤 (Detergent) を用いて、脂質エンベ

ロープを破壊・除去することにより感染性をなくする方法である。ヒト血漿由来HEVに対してSD処理を行ったところ、ブタ糞便由来HEVと同様の熱感受性にその性状が変化した。この結果は、ヒト血漿由来HEVのウイルス表面に付着している脂質成分がSD処理により除去されたためと考えられ、岡本らのヒト血漿由来HEVのウイルス表面に脂質成分が付着しているという報告と一致している¹⁶⁾。同じHEVでも由来や性状の違いによって熱感受性が異なることは注目すべき点である。

ヒト血漿を原料とする血漿分画製剤の工程評価では、由来の同じヒト血漿由来HEVを用いるこ

とが望ましい。しかしHEV陽性者における血中ゲノム濃度は低く、評価に十分な高感染力価のヒト血漿由来HEVを入手することは非常に困難である。そのため我々は一部の試験においてブタ糞便由来HEVをヒト血漿由来HEVの代用として用いた。血漿分画製剤の安全性評価を行う場合は、このようにウイルスの性状の違いが工程評価に与える影響に留意しなければならない。ウイルスの性状については今後更なる研究の進捗が望まれる。

またアルブミンを用いた検討から、共存するアルブミンの濃度がHEVの熱感受性に影響することが明らかになった。これはアルブミンがHEVを加熱から保護する作用を有することを示している。また種々の製剤の工程検体を用いて検討したところ、不活化曲線に差が認められ、タンパク濃度のみならず、タンパクの種類や溶液組成も60℃・10時間におけるウイルスの不活化曲線に影響していることが示唆された。なお、国内の献血者の3.4%が抗HEV抗体陽性であるとの報告もあり¹⁷⁾、グロブリンには抗HEV抗体が含まれている可能性がある。しかし、対照として行った37℃・10時間の加温でHEV感染性はほとんど変化しなかったことから、中和抗体による干渉作用はわずかであると判断した。

献血ドナーには一定の頻度でHEV RNA陽性者が存在することが報告されている¹⁸⁾。これは、プール血漿にHEVが混入する可能性を強く示唆している。欧米においてはHEVが検出される事例が報告されており¹⁹⁾、またプール血漿製剤による感染事例も報告されている²⁰⁾。しかしながら、こ

れまで血漿分画製剤を投与されたことによって、HEVに感染したという事例は報告されていない。その理由の一つとして、液状加熱処理などのウイルス不活化工程が導入されていることが考えられる。今回の結果から、液状加熱処理によってHEVは有効に不活化されることが明らかとなったが、一部製剤の液状加熱処理において感染性がわずかに残存することが確認された。このことは、二つ以上のウイルス不活化・除去工程を組み合わせることがHEVに対する安全性を確保する上で重要であることを示している。製造工程中には、加熱処理工程だけでなくHEVが除去されていると考えられるウイルス除去工程や精製工程が存在する。ウイルス除去膜処理は効果的にウイルスを除去する工程として知られており、HEVに対しては19nmよりも小さな孔径の膜であれば、検出限界以下にまで除去することが確認されている¹²⁾。ウイルス不活化工程と除去工程の組み合わせは、HEVをはじめとした既知／未知のウイルス混入に対する安全性を堅固なものにしていると考えられる。HEVに関してはいまだ十分な情報が得られていないので、ウイルスの性状解析や他の工程でのウイルス除去・不活化能力の評価等さらなる研究が必要である。

謝 辞

本研究の実施および論文作成にあたり温かいご指導を頂いた井手野祥次氏、田中宏幸氏に謝意を表します。高橋一恵、大久保祐士、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘は一般社団法人日本血液製剤機構の職員である。

文 献

- 1) Meng, X.J. *et al.*: Hepeviridae. In Virus Taxonomy, King AMQ, M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz (eds), 9th Report of the 245 ICTV, 1021-1028, Elsevier Academic Press, London, 2011
- 2) Okamoto H.: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus, *Virus Research*, 127: 216-228, 2007

- 3) Okamoto H. *et al.*: Features of hepatitis E virus infection in Japan, *Internal Medicine*, 42 (11): 1065-1071, 2003
- 4) Takahashi M. *et al.*: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus, *Journal of General Virology*, 84: 851-862, 2003
- 5) Sapsutthipas S. *et al.*: Sequence variation in

- hepatitis E virus Genotypes 3 and 4 from swine fecal samples in Japan, *The Open Veterinary Science Journal*, 3: 68-75, 2009
- 6) Matsubayashi K. *et al.*: A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route, *Transfusion*, 48: 1368-1375, 2008
- 7) 薬事・食品衛生審議会 平成17年度第4回血液事業部会運営委員会議事次第 資料D-2, 7: 「輸血用血液製剤によるHEV (E型肝炎ウイルス) 感染が疑われた事例 (12月3日報告) について」, 平成17年11月1日
URL : <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/11/s1101-4f07.html> (last accessed 2012.02.25)
- 8) McClelland D.B.L.: Safety of human albumin as a constituent of biologic therapeutic products, *Transfusion*, 38: 690-699, 1998
- 9) Hattori S. *et al.*: Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products, *Vox Sanguinis*, 92: 121-124, 2007
- 10) Shimasaki N. *et al.*: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains, *Vox Sanguinis*, 96: 14-19, 2009
- 11) Farcet Maria R. *et al.*: Inactivation of hepatitis A variants during heat treatment (pasteurization) of human serum albumin, *Transfusion*, 52: 181-187, 2012
- 12) Yunoki M. *et al.*: Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters, *Vox Sanguinis*, 95: 94-100, 2008
- 13) Urayama T. *et al.*: Full-length sequences of one Genotype 4 and three Genotype 3 hepatitis E viruses in fecal samples from domestic swine in Japan, *The Open Veterinary Science Journal*, 4: 11-19, 2010
- 14) Jothikumar N. *et al.*: A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus, *Journal of Virological Methods*, 131: 65-71, 2006
- 15) 国立予防衛生研究所学会編, ウイルス実験学 総論, 改訂2版: 480~481頁, 丸善株式会社, 東京都, 1973
- 16) Okamoto H.: Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood, *Rev. Med. Virol.* 21: 18-31, 2011
- 17) Takeda H. *et al.*: A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan, *Vox Sanguinis*, 99: 307-313, 2010
- 18) 薬事・食品衛生審議会 平成24年度第3回血液事業部会運営委員会 資料3-2, 「試行的HEV 20プールNAT実施状況について (輸血後HEV感染の予防対策)」, 23頁, 平成24年12月19日
URL : <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002rsqs-att/2r9852000002rt4i.pdf> (last accessed 2012.02.25)
- 19) Baylis S.A. *et al.*: Widespread distribution of hepatitis E virus in plasma fractionation pools, *Vox Sanguinis*, 102: 182-183, 2012
- 20) Andonov A. *et al.*: Serologic and molecular evidence of a plausible transmission of hepatitis E virus (HEV) through pooled plasma, 32nd International Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), P-367, 2012