

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390134

研究課題名 (和文) 培養系を用いた E 型肝炎ウイルスの性状分析と増殖機構解明

研究課題名 (英文) Characterization of hepatitis E virus (HEV) particles and analysis of replication mechanism by using a cell culture system for HEV

研究代表者

岡本 宏明 (OKAMOTO HIROAKI)

自治医科大学医学部・感染免疫学講座ウイルス学部門・教授

研究者番号：30177092

研究成果の概要：

本研究は、研究代表者らが世界で初めて確立することができた E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染培養系を用いた研究である。

1) E 型肝炎患者の糞便浮遊液中に含まれる HEV 野生株 (JE03-1760F\_wt、遺伝子型 3) を PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養液中に放出された子孫ウイルスを新たな細胞に感染させる継代培養を 13 回繰り返すことによって、野生株より 10 倍以上感染効率の高い馴化 HEV (JE03-1760F\_p13) を得ることができた。また、E 型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液を接種することにより、新たに 4 型 HEV (HE-JF5/15F) 株の培養系を確立することができた。JE03-1760F 株と同様に、培養液中に産生された子孫 HE-JF5/15F ウイルスは感染性を有し、6 代目の継代培養において、接種後 2 日目に培養上清中での子孫ウイルスの出現が確認され、10 日目には  $1.5 \times 10^8$  copies/ml のウイルス量に達した。HE-JF5/15F\_p6 ウイルスに認められた ORF1 領域と ORF2 領域での 10 塩基 (4 アミノ酸残基) の変異が活発な増殖能に関連があると考えられた。

2) カイコ蛹で発現した組換え HEV キャプシド (ORF2) 抗原蛋白質を免疫原として、9 種類のマウスモノクローナル抗体を作製した。そのうちの 1 つ (H6225) は、HEV 粒子との結合能を有し、強い感染阻止能 (中和活性) を有することが感染培養実験によって明らかになった。また、HEV ORF3 蛋白質の C 末端に相当する 24-mer 合成ペプチドを用い 10 種類のマウスモノクローナル抗体を作製した。これら抗 ORF2、ORF3 モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により、ORF2 抗原は細胞質、とくに小胞体とゴルジ体、ORF3 抗原は細胞質および細胞質膜に局在することがわかった。

3) 培養上清中に放出された HEV 粒子はショ糖液中での浮上密度が 1.15 g/ml と軽く、糞便中の HEV 粒子 (1.26-1.27 g/ml) と異なること、そしてその表面に細胞膜成分とともに ORF3 蛋白質を有すること、加えてそれら細胞膜成分と ORF3 蛋白質は界面活性剤と蛋白分解酵素による処理によって除かれ、糞便中 HEV 粒子と同様の浮上密度に変化しうることを明らかにした。

4) A549 細胞と PLC/PRF/5 細胞において、糞便由来野生株 (JE03-1760F) と同等の感染性と増殖能を有する感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) を構築することができた。加えて、ORF3 の ATG コドンを GCA に置換した変異ウイルス (pJE03-1760F/ΔORF3) を作製し、培養細胞に接種したところ、感染性を有していることが分かった。しかし、ORF3 欠損変異ウイルスは細胞内での HEV RNA レベルが野生株と同等でありながら、培養上清中では HEV RNA は検出されないか、極めて低いレベルであり、分泌能を欠いていることが明らかになった。

本研究により、これまで機能が不明であった ORF3 蛋白質は HEV 粒子の放出に必須であり、放出

された粒子上に細胞膜成分とともに構造蛋白の一つとして存在していることが初めて明らかになった。これらの研究成果は、HEV 感染の制御ならびに増殖機構や放出機構のさらなる解明に役立つものと考えられる。

#### 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,500,000  | 2,250,000 | 9,750,000  |
| 2008 年度 | 6,700,000  | 2,010,000 | 8,710,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子

#### 1. 研究開始当初の背景

E 型肝炎ウイルス(HEV)は 1983 年に同定され、アジア・アフリカの発展途上国での水系感染による流行性肝炎の原因ウイルスとして知られていた。しかし、近年、日本を含む先進諸国でも E 型肝炎浸淫地域からの輸入によらない、国内感染の散発性 E 型肝炎の発生が報告され、注目を集めるようになった。申請者らは、国内感染の E 型肝炎でも劇症化により死亡するケースが少なからず存在することを世界に先駆けて報告し(N Engl J Med 347:1456, 2002)、E 型肝炎がブタを始めとする各種動物を感染源とする人畜共通感染症であることを示すデータを数多く世界に向け発表してきた(J Gen Virol 84:851-862, 2003; J Clin Microbiol 42:5371-5374, 2004 など)。そして、感染状態にあるそれら動物の肉や内臓をヒトが生、あるいは生に近い状態で摂食した場合に HEV に感染し、E 型肝炎を発症する可能性があることを明らかにしてきた(J Gen Virol 84:2351-2357, 2003)。感染予防対策として、それら動物の肉や内臓を摂食する場合に十分に加熱処理することが勧められているが(厚生労働省からの健康危険情報「食肉を介する E 型肝炎ウイルス感染事例について」[<http://mhlw.go.jp/houdou/2003/08/h0819-2.html>])、HEV の熱に対する感受性のデータは皆無に等しいのが現状である。また、酵素免疫測定法(ELISA)によって検出される HEV 抗体が中和能を有するか否かについても結論が得られていない

ため、不顕性感染後の個体、ないし顕性感染から回復した個体が HEV に対して終生免疫を獲得するか否かも不明のままである。加えて、多様性に富み、4 つの遺伝子型に分類される HEV ゲノムの全塩基配列を種々の HEV 株について決定し、その特徴を明らかにしてきたが(Biochem Biophys Res Commun 289:929-936, 2001; J Gen Virol 83:1931-1940, 2002, 84:421-427, 2003, 84: 1245-1251, 2003, 86:3321-3326, 2005, 87: 2363-2369, 2006; J Med Virol 78:476-484, 2006)、感受性動物としてのサルでの感染実験は様々な制約があるため容易ではなく、これまでに HEV の培養系が確立されていなかったため、その増殖機構や物理化学的性状に関する基礎的な研究はほとんど進んでいなかった。

申請者らは、最近、HEV の培養系を確立することに成功した。HEV それ自体の研究、すなわち、ウイルスとしての物理化学的性状や増殖様式についての研究はこれまで立ち遅れていたが、培養系を用いる世界で初めての本研究は、HEV の基礎的研究の進展を推進するのに役立つだけでなく、E 型肝炎の診断、治療、予防へ幅広い分野での応用・発展が期待される。これまでの検討により、培養上清中に  $10^8$  copies/ml のウイルス粒子が 4 ヶ月間持続して産生され、高い感染価を維持しつつ 5 代に亘る継代培養も可能であることが明らかになっている。

#### 2. 研究の目的

申請者らが最近確立することができた培養系を、より効率的な系に改良しつつ、それとほぼ並行して、培養系を用いて、これまでに明らかにされていない HEV の増殖様式の解明に資するデータを得ることを本研究の主要な目的としている。加えて、①前回の科学研究費補助金研究(平成 16 年度～平成 17 年度: 基盤研究 B [課題番号 16390137])で明らかにした HEV の food-borne transmission の予防対策への科学的根拠を提示すべく、HEV の熱処理に対する抵抗性を中心とした物理化学的性状を明らかにすること、②ELISA 法で検出される HEV 抗体の中和能については長年懐疑的な意見が多くあったが、HEV 抗体陽性者が HEV に対して免疫を獲得しているのか否かを明らかにするため、確立した培養系を用いて当該患者血清の感染阻止能を検討することも今回の研究の重要な課題である。

### 3. 研究の方法

#### (1) HEV の効率的な培養系の確立

上述のように、申請者らは既に、ヒト肝癌細胞株の一つ、Alexander (PLC/PRF/5) 細胞株を通常の 37℃よりもやや低温の 35.5℃で培養し、それに E 型肝炎患者由来の糞便浮遊液を接種した場合に、効率よく HEV が増殖し、培養上清中の HEV が  $10^8$  copies/ml の高力価に達することを見出している。しかし、感染材料接種後に培養液中で HEV RNA が検出されるまでに 10 日から 14 日を要すること、またプラトーの状態の  $10^8$  copies/ml の高力価に達するまでに 30～40 日を要することから、感受性細胞株の種類、培養温度、培養液の組成、また接種材料の種類や量などを検討することにより感染成立までの時間を短縮し、より効率的な培養系の確立を目指した研究を行なう。Alexander 細胞株以外に検討を予定している細胞株は、A549, Huh7, HepG2, Chang liver cell, ICE-6, Raji, FCM, BC3H1, P-19, C2C12, Vero, RenCa, NUGC-4, LLC-MK2, HeLa, CV1, GOTO, C6, SK-N-MC, HT1080, HEK293, L929, NIH3T3 の 23 種類である。これらの細胞株は研究室で既に凍結保存されているが、さらに別の細胞株を米国 ATCC (American Type Culture Collection) あるいは国内の HSRRB (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) より入手し検討することも考えている。感染材料については、申請者が研究代表者として実施した平成 16 年度～平成 17 年度の基盤研究 B 「人畜共通感染症としての E 型肝炎の生態解明と制圧のための研究開発」(課題番号 16390137)において、同意を得て E 型肝炎患者から提供して頂いた糞便

サンプルのうち、HEV RNA titer が高いサンプルを選別し、感染実験に供する。

#### (2) HEV 関連マーカー測定系の開発

##### a. Real-time RT-PCR 法による HEV RNA の定量測定

RT-PCR 法による高感度・高精度の HEV RNA 測定法は既に開発できており (J Clin Microbiol 40:3209-3218, 2002; J Virol Methods 137:325-333, 2006)、E 型肝炎の診断、ブタやイノシシ、シカなどの動物での HEV 感染実態の調査などに応用できているが (J Gen Virol 84:421-427, 2003; J Gen Virol 84:851-862, 2003)、今回さらに real-time detection PCR 法により、接種材料、接種実験後の培養上清中および感染培養細胞内の HEV RNA を定量測定する系を確立する。本研究申請に先立って行なった予備検討では、抽出した核酸を 10 倍ずつ段階希釈して検出限界を求める、いわゆる end point dilution 法によって、半定量的に HEV RNA titer を表示したが、real-time detection PCR 法の確立によって、HEV RNA 量および経時的な推移を定量的に測定し、表示することが可能となる。

##### b. 抗 HEV マウスモノクローナル抗体作製とそれを用いた ELISA 法、Western blot 法および蛍光抗体法による HEV 抗原の定性的・定量的測定

カイコ蛹で発現した組換え HEV キャプシド (ORF2) 抗原蛋白質 (J Clin Microbiol 40:5209-5218, 2002) を免疫原としてマウスに接種し、抗 HEV ORF2 モノクローナル抗体を作製する。また、HEV ORF3 蛋白質の C 末端 24-mer の合成ペプチドを免疫原とし、抗 HEV ORF3 モノクローナル抗体を作製する。

得られた抗 HEV マウスモノクローナル抗体を用いて ELISA 法、IFA (immunofluorescence assay) 法および Western blot 法による細胞内および培養上清中の HEV 抗原の定性的・定量的測定・検出を行い、感染成立後の HEV 抗原量の経時的変化を追跡する。

#### (3) 培養系を応用した HEV の不活化条件など、基本的な生物学的性状の解析

培養系を用いた本研究において最も重要視している不活化実験は、加熱処理であり、56℃、30 分、60℃、10 分、70℃、10 分、90℃、10 分、90℃、30 分などの条件で処理したのち、培養細胞への接種実験を行い、感染成立の有無を 60 日間観察する。また、室温での長期保存による不活化への影響も検討する。蛋白質の存在下、非存在下での加熱処理の影

表 1. 野生株と 2 系列の継代株(p13/A と p10/B)の全塩基配列の比較

| 塩基<br>番号    | 領域          | 塩基       |          |          | アミノ酸       |                   |
|-------------|-------------|----------|----------|----------|------------|-------------------|
|             |             | 野生株      | p13/A 株  | p10/B 株  | アミノ酸番号     | 変異                |
| 61          | ORF1        | U        | U        | C        | 12         | -                 |
| 370         | ORF1        | C        | U        | C        | 115        | -                 |
| 445         | ORF1        | U        | U        | C        | 140        | -                 |
| 591         | ORF1        | C        | U        | C        | 189        | Ala to Val        |
| 829         | ORF1        | C        | C        | U        | 268        | -                 |
| 1378        | ORF1        | C        | C        | U        | 451        | -                 |
| 1549        | ORF1        | U        | U        | C        | 508        | -                 |
| 2191        | ORF1        | C        | C        | U        | 722        | -                 |
| 2236        | ORF1        | C        | C        | U        | 737        | -                 |
| <b>2246</b> | <b>ORF1</b> | <b>U</b> | <b>C</b> | <b>C</b> | <b>741</b> | <b>Trp to Arg</b> |
| 2704        | ORF1        | U        | C        | U        | 893        | -                 |
| 2808        | ORF1        | U        | U        | C        | 928        | Val to Ala        |
| 2913        | ORF1        | A        | A        | G        | 963        | Glu to Gly        |
| 2915        | ORF1        | G        | G        | U        | 964        | Val to Leu        |
| 2938        | ORF1        | C        | U        | C        | 971        | -                 |
| 3106        | ORF1        | A        | G        | A        | 1027       | -                 |
| 3223        | ORF1        | U        | U        | C        | 1066       | -                 |
| 3235        | ORF1        | C        | U        | C        | 1070       | -                 |
| 3453        | ORF1        | C        | U        | C        | 1143       | Ala to Val        |
| 3475        | ORF1        | C        | C        | U        |            |                   |
| 3496        | ORF1        | C        | U        | C        | 1157       | -                 |
| 3553        | ORF1        | C        | U        | C        | 1176       | -                 |
| 3620        | ORF1        | U        | C        | U        | 1199       | -                 |
| 4015        | ORF1        | C        | U        | C        | 1330       | -                 |
| 4309        | ORF1        | C        | C        | U        | 1428       | -                 |
| 4462        | ORF1        | C        | U        | C        | 1479       | -                 |
| 5312        | ORF2        | U        | U        | C        | 47         | -                 |
|             | ORF3        |          |          |          | 51         | Ile to Thr        |
| <b>5378</b> | <b>ORF2</b> | <b>A</b> | <b>G</b> | <b>G</b> | 69         | -                 |
|             | ORF3        |          |          |          | 73         | Asn to Ser        |
| <b>5456</b> | <b>ORF2</b> | <b>C</b> | <b>U</b> | <b>U</b> | 95         | -                 |
|             | ORF3        |          |          |          | 99         | Pro to Leu        |
| 6047        | ORF2        | U        | U        | C        | 292        |                   |
| 6470        | ORF2        | C        | U        | C        | 433        | -                 |
| 6578        | ORF2        | C        | U        | C        | 469        | -                 |
| 6611        | ORF2        | C        | U        | C        | 480        | -                 |
| 6626        | ORF2        | U        | C        | U        | 485        | -                 |
| 6651        | ORF2        | G        | G        | R        | 494        | Val to Ala/Thr    |
| 6652        | ORF2        | U        | U        | C        | 494        | Val to Ala/Thr    |
| 6855        | ORF2        | A        | A        | G        | 562        | Asn to Asp        |
| 6944        | ORF2        | U        | U        | C        | 591        | -                 |
| 7186        | 3'UTR       | C        | C        | U        | NA         | -                 |

響も観察し、HEV の food-borne transmission の予防に向けた具体的な対策案を提示したい。

- (4) HEV抗体陽性血清の中和能の解析  
既に申請者らが確立している ELISA 法(J

Clin Microbiol 43:49-56, 2005)により、HEV 抗体(イムノグロブリン別に IgG クラス, IgM クラス, あるいは IgA クラス)が陽性と判定された血清検体について、培養系での HEV の感染阻止能を検討する。具体的には、感染材料に被験血清を原液、あるいは段階希釈して

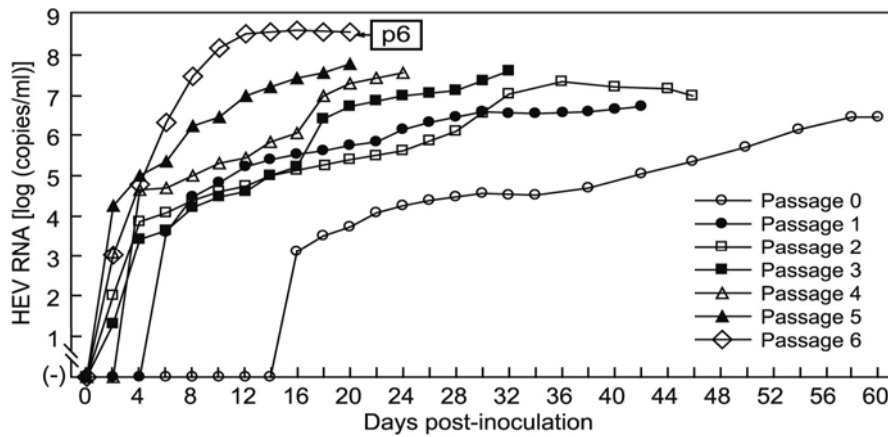


図2 遺伝子型 4HEV (HE-JF5/15F 株) の継代培養

添加したのち、培養細胞に接種して、培養上清中の HEV RNA を測定し、感染成立の有無を 60 日間観察する。E 型肝炎急性期の患者血清 (HEV RNA が陰性化し、IgM クラス HEV 抗体や IgA クラス HEV 抗体が検出される時期の血清)、過去に E 型肝炎に罹患したことがウイルス学的に証明されている患者 (HEV 遺伝子型は 1 型、3 型あるいは 4 型) の肝炎発症後 5~20 年の IgG クラス HEV 抗体陽性血清、過去の不顕性感染がウイルス学的に証明されている患者の感染回復後 5~10 年の IgG クラス HEV 抗体陽性血清、および過去の感染時期は特定できていないが、IgG クラス HEV 抗体が検出される健常人の血清などの感染阻止能を検討する。

#### (5) 継代培養中の HEV ゲノム変異の解析

接種材料中の HEV の全塩基配列と、培養細胞で継代・維持されている HEV の全塩基配列を決定し、比較解析することにより、継代培養に適した HEV ゲノムの変異を特定する。

#### (6) 感染性 cDNA クローンの作製と HEV 増殖機構解明への応用

JE03-1760F 株の完全長 cDNA を含むプラスミド (pJE03-1760F/wt) を構築し、試験管内で全長 RNA を合成したのち、PLC/PRF/5 細胞に transfect し、その後のウイルス粒子の産生、ウイルス蛋白の発現状況を経時的に評価する。あわせて、これまで機能が解明されていない ORF3 蛋白のウイルス生活環における役割を解明するため、ORF3 を欠損させた mutant (pJE03-1760F/ΔORF3) を作製し、野生株と比較・解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) HEV の効率的な培養系の確立

本研究により、遺伝子型 3 の HEV (JE03-1760F 株) と遺伝子型 4 の HEV (HE-JF5/15F 株)

について、高効率の細胞培養系を確立することができた。

a. JE03-1760 株の培養継代株の感染性の評価とゲノム変異解析

野生株 HEV の JE03-1760F 株を用いて、2 系列 (実験 A と実験 B) の継代

実験を行った。実験 A では、接種ウイルス量を約  $10^5$  copies/well として Passage 10 まで継代培養を行ったところ、前半の Passages 0-5 に比べて後半の Passages 6-10 の方が、接種後ウイルスが出現するまでの平均日数が約 1 週間短縮され (16.7 日 vs. 10.0 日)、培養上清中のウイルス量が  $10^5$  copies/ml に達する平均日数が 19 日短くなった (35.2 日 vs. 16.0 日) (図 1)。また、Passage 11、Passage 12、Passage 13 の継代実験では、接種ウイルス量をそれぞれ  $3.0 \times 10^3$  copies/well、 $1.0 \times 10^3$  copies/well、 $3.0 \times 10^2$  copies/well として行ったが、well によって増殖パターンにばらつきが見られるものの、より増殖効率の高い株を順次選別することができた。その結果、Passage 13 で得られた継代株 (p13/A) は野生株の 30 分の 1 のウイルス量で感染しうることが分かった。実験 B でも実験 A 同様、前半の Passages 0-5 に比べて、後半の Passages 6-10 の方がウイルスが出現するまでの平均日数が短くなり、2 日目に検出されるようになり、培養上清中のウイルス量が  $10^5$  copies/ml に達するまでの平均日数が約 1 週間短縮され、接種後 10 日目には  $10^5$  copies/ml を超えるようになった。

実験 A の Passage 13 の株 (p13/A 株) と実験 B の Passage 10 の株 (p10/B 株) について全塩基配列を決定したところ、野生株に比べて、7226 塩基 (ポリ A 配列を除く) 中、それぞれ 19 塩基と 23 塩基に相違が認められた (表 1)。p13/A 株に認められた 19 塩基の変異のうち、5 塩基が ORF1 あるいは ORF3 でのアミノ酸置換 (それぞれ 3 個と 2 個) を伴っていた。また、p10/B 株に認められた 23 塩基の変異のうち、9 塩基が ORF1、ORF2 および ORF3 でのアミノ酸置換 (それぞれ、4 個、3 個、2 個) を伴っていた。新たに出現したウイルス変異 (全長の 0.3%) が継代培養に伴う馴化に関与している

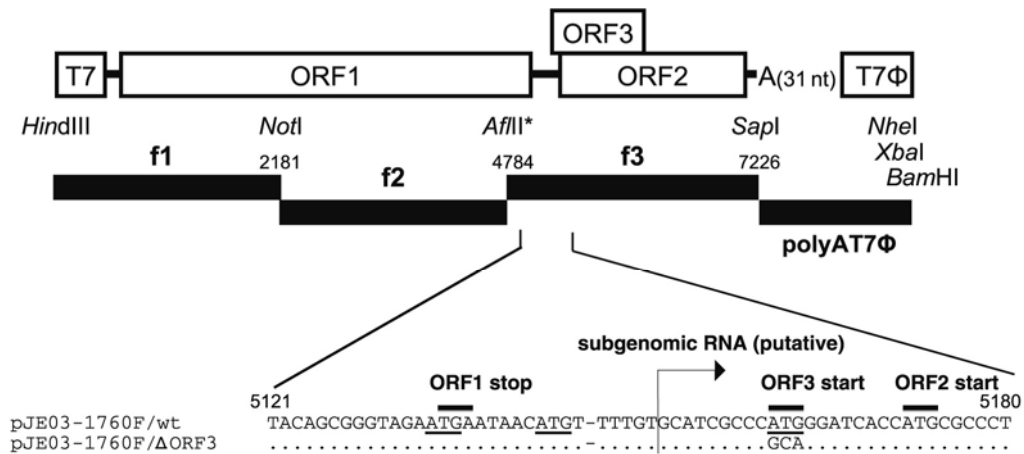


図3 野生株 HEV とその ORF3 欠損変異株の cDNA クローンの構築

ものと考えられる。特に、2 系列の継代培養において p13/A 株と p10/B 株に共通に認められた変異 (いずれもアミノ酸置換を伴う変異) は馴化に伴う HEV ゲノム変異の再現性を示すものであり、効率的な増殖能や感染性に密接な関連がある、特に重要な変異として注目された。

b. 4 型 HEV (HE-JF5/15F) 株による培養系の確立

E 型劇症肝炎患者から得られた糞便浮遊液を接種することにより、新たに 4 型 HEV (HE-JF5/15F) 株の培養系を確立することができた。JE03-1760F 株と同様に、培養上清を用いた cell-free virus の継代培養が可能であるだけでなく、6 代目の継代培養において、接種後 2 日目に培養上清中で子孫ウイルス (HE-JF5/15F\_p6) の出現が確認され、ウイルスタイターは 10 日目に  $1.5 \times 10^8$  copies/ml に達した。3 型の JE03-1760F 株に比べてより活発な増殖能を示した (図 2)。HE-JF5/15F\_p6 には野生株と比べて、10 塩基、4 アミノ酸残基に変異が認められ、特に ORF1 領域と ORF2 領域に認められたそれぞれ 1 アミノ酸、2 アミノ酸への置換が馴化に大きく関わっていることが示唆された。

(2) HEV 関連測定系の開発とその応用

a. Real-time RT-PCR 法による HEV RNA の定量測定

ORF2/ORF3 overlapping 領域をターゲットとする real-time RT-PCR 法を確立した。この方法では、全長 genomic RNA のみならず、subgenomic RNA も同時に検出されることから、genomic RNA のみを検出しよう ORF1 領域を標的領域とする real-time RT-PCR 法を確立した。その結果、細胞内での genomic RNA と subgenomic RNA の量比も検討できるようにな

った。

b. 抗 ORF2、抗 ORF3 マウスモノクローナル抗体 (mAb) の作製

抗 ORF2 mAb として 9 種類、抗 ORF3 mAb として 10 種類の抗体が得られ、いずれも Western blotting による HEV 抗原の特異的な検出に有用であることが分かった。また、これら抗 ORF2、ORF3 モノクローナル抗体を用いた IFA 法により、ORF2 抗原は細胞質、とくに小胞体とゴルジ体、ORF3 抗原は細胞質および細胞質膜に局在することがわかった。さらに、抗 ORF2 mAb の H6225 抗体は、遺伝子型の違いによらず、糞便中 HEV 粒子を効率よく捕捉できることが分かった。

(3) HEV 粒子の性状分析

a. HEV の加熱処理による不活化

HEV 含有糞便浮遊液を 25°C, 30 分、56°C, 30 分、70°C, 10 分、95°C, 1 分、および 95°C, 10 分の 5 種類の条件で熱処理し、感染性の有無を 50 日間の維持培養により評価した。その結果、70°C, 10 分、95°C, 1 分、および 95°C, 10 分の 3 条件では培養上清中で全く HEV RNA が検出されず、感染性が消失したと看做された。一方、25°C, 30 分では未処理のコントロールと変わらず、56°C, 30 分の条件でも効率は低下しているも感染性がまだ残っていることが分かった。すなわち、熱処理による HEV の不活化の条件としては、56°C で 30 分の熱処理では不十分であることが分かった。

b. ショ糖液中での浮上密度

糞便中の HEV 粒子は既報のごとく、ショ糖液中での浮上密度が 1.26-1.27 g/ml と重いものに対して、培養上清中の HEV 粒子は浮上密度が 1.15 g/ml と軽いことが分かった。また、血清中 HEV 粒子についてこれまで浮上密度が測定されたことがなかったが、今回糞便サン

プルおよび培養上清と同時に測定した結果、血清中の HEV 粒子の浮上密度は培養上清中粒子と同等であることが分かった。

c. HEV 粒子の界面活性剤および蛋白分解酵素による処理

デオキシコール酸ナトリウム (DOC-Na) とトリプシンで処理する前には、抗 ORF2 mAb (H6225) と抗 ORF3 mAb (TA0536) の 2 種類の mAbs による培養上清中 HEV 粒子の捕捉率は共に約 3% に過ぎなかったが、DOC-Na で処理することによって 2 種類の mAbs の捕捉率はそれぞれ 97%、66% まで上昇した。トリプシン処理を行うと、DOC-Na 処理の有無に拘わらず、抗 ORF3 mAb は HEV 粒子を捕捉できなくなった。さらに、DOC-Na とトリプシンによる処理を受けた培養上清中 HEV 粒子の浮上密度は 1.15 g/mL から 1.24-1.25 g/mL へとシフトした。血清中の HEV 粒子も、DOC-Na とトリプシンによる処理に対して培養上清中 HEV 粒子と同様の挙動を示した。それに対して、糞便中の HEV 粒子には処理前後での違いは全く認められなかった。

したがって、培養上清中の HEV 粒子および循環血液中の HEV 粒子は細胞膜成分と ORF3 蛋白を表面に有し、“enveloped” ウイルスとして存在しており、界面活性剤と蛋白分解酵素の処理を受けることによって、それらが除かれ、“non-enveloped” ウイルスとしての糞便中 HEV 粒子と同様の状態になると考えられた。

#### (4) HEV の感染阻止

IgM クラス HEV 抗体が高力価で検出される E 型肝炎患者回復期血清が糞便中 HEV の感染を阻止しうるか否かを培養系を用いて検討したところ、患者に感染した HEV の遺伝子型が 1 型、3 型、4 型のいずれであっても、その回復期血清は、糞便浮遊液中 HEV (JE03-1760F: 3 型) の感染を阻止しうるということが分かった。HEV の血清型が 1 種類であるというこれまでの考えを支持する結果であった。また、9 年前、および 24 年前に HEV に感染し E 型肝炎を発症したことがウイルス学的に検証されている患者の血清 (IgG クラス HEV 抗体のみ陽性) の中和能についても検討した。その結果、感染後 9 年、あるいは 24 年経過した時点の血清であっても、中和能を保持していることが分かった。これまで、HEV 感染によって終生免疫が成立するか否かは不明であるとされていたが、この実験結果は肝炎治癒後に感染防御免疫が成立することを明瞭に示している。また、感染時期は不明であるが、ELISA 法によって IgG クラス HEV 抗体

が陽性と判定された血清 (OD 値=1.000) についても中和能の有無を検討したところ、感染を阻止しうるということが分かった。E 型肝炎の発生頻度に比べて、ELISA 法による IgG クラス HEV 抗体陽性頻度が桁違いに高いことから、抗体測定系の特異性を疑問視する報告もあるが、以上の結果は、研究代表者らが用いている in-house ELISA による HEV 抗体測定系の特異性を支持するものである。

また、培養系を用いた感染中和実験によって、H6225 には糞便中 HEV 粒子の感染を阻止する中和活性があることを確認することができた。感染 HEV の遺伝子型が 1 型、3 型、あるいは 4 型のいずれであっても感染を阻止しうることから、H6225 抗体は ORF2 蛋白の中和エピトープを認識する抗体であると考えられた。

#### (5) HEV の感染性 cDNA クロンの作製と HEV 放出機構解明への応用

##### a. 野生株 HEV の感染性 cDNA クロンの構築

図 3 に示すように、野生株 JE03-1760F の全長 cDNA を含むプラスミド (pJE03-1760F/wt) 構築し、in vitro で合成した完全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入したところ、培養上清中へのウイルス粒子の放出が認められた。この cDNA 由来 HEV は PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞で継代可能であり、それぞれの細胞において糞便由来野生株 JE03-1760F と同等の増殖性を示すことが分かった。

##### b. ORF3 欠損変異クロンの構築

ORF3 の ATG コドンを GCA に置換した変異ウイルス (pJE03-1760F/ΔORF3) を作製し、培養細胞に接種したところ、IFA 法や Western blot 法により細胞内で ORF3 蛋白が検出されないにも拘わらず、cell lysate 内には HEV RNA を含有する浮上密度 1.26-1.27 g/ml の粒子が存在していることが分かった。しかも、細胞内での HEV RNA レベルは野生株と同等であった。しかしながら、A549 細胞の培養上清中では接種後 30 日まで観察したが HEV RNA は終始検出されなかった。PLC/PRF/5 細胞の培養上清中では、低レベルの HEV RNA が検出されたが、野生株の 100 分の 1 以下であった。培養中の細胞の剥離・浮遊が PLC/PRF/5 細胞においてより多く認められる傾向にあったことから、培養上清中で検出された微量の ΔORF3 RNA は培養細胞の破壊によるものと推測され、ORF3 欠損変異ウイルスは分泌能を欠いているものと考えられた。

本研究により、これまで機能が不明であった ORF3 蛋白が HEV 粒子の放出に必須であり、

放出された粒子上に細胞膜成分とともに構造蛋白の一つとして存在していることが初めて明らかになった。

これまで、ORF3 蛋白が粒子形成に与っているか否かについては不明であった。しかし、抗 ORF3 mAbs を用いた immuno-capture PCR 法によって検討した結果、ORF3 蛋白が培養上清中や患者血清中の HEV 粒子の表面上に存在していることが明らかになった。界面活性剤非存在下での捕捉率は数%に過ぎず、種々の界面活性剤による処理によって捕捉率は約 100%に達することから、ORF3 蛋白は HEV 粒子上で膜にほぼ覆われた状態で存在しているものと考えられた。また、糞便中の HEV 粒子を抗 ORF3 mAbs で捕捉できないのは、肝臓から胆管に放出され、腸管に排泄される過程で胆汁中のデオキシコール酸と腭液中の蛋白分解酵素（トリプシン）に曝され、細胞膜とともに ORF3 蛋白が除去されることに起因するものと考えられた。

以上の研究成果は、HEV 感染の制御ならびに HEV の増殖機構のさらなる解明に役立つものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol*, 2009 (In press). doi:10.1099/Vir.0.010561-0. Epub ahead of print on 1 April 2009. 査読有り
2. Tanaka T, Takahashi M, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuo H, Okamoto H: Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using the HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47:1906-1910, 2009. 査読あり
3. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 90(2):457-462, 2009 査読有り
4. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Akahane T, Fukushima K, Kogure T, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Kido O, Nakagome Y, Ninomiya M, Obara N, Wakui Y, Takahashi M, Okamoto H, Shimosegawa T: Sporadic acute hepatitis E

occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol* 44:329-337 2009 査読有り

5. Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H: Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol* 153:657-666, 2008 査読有り
6. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 153:1703-1713, 2008 査読有り
7. Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Yamada K, Inoue J, Takahashi M, Okamoto H: Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* 137:86-96, 2008 査読有り
8. Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, Yoshikawa A, Mizoguchi H, Endo K, Takahashi M, Okamoto H: Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 79:734-742, 2007 査読有り
9. Lorenzo FR, Tsatsralt-Od B, Ganbat S, Takahashi M, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J Med Virol* 79:1128-1137, 2007 査読有り
10. Wibawa IDN, Suryadarma IGA, Mulyanto, Tsuda F, Matsumoto Y, Ninomiya M, Takahashi M, Okamoto H: Identification of genotype 4 hepatitis E virus strains from a patient with acute hepatitis E and farm pigs in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 79:1138-1146, 2007 査読有り
11. Okamoto H: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127(2):216-228, 2007 査読有り
12. Fukuda S, Ishikawa M, Ochiai N, Suzuki Y, Sunaga J, Shinohara N, Nozawa K, Tsuda F, Takahashi M, Okamoto H: Unchanged high prevalence of antibodies to hepatitis E virus (HEV) and HEV RNA among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan during 1991-2006. *Arch Virol* 152: 1623-1635, 2007 査読有り
13. Takahashi M, Tanaka T, Azuma M, Kusano E, Aikawa T, Shibayama T, Yazaki Y, Mizuo H, Inoue J, Okamoto H: Prolonged fecal



shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system. J Clin Microbiol 45(11):3671-3679, 2007 査読有り

14. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for *Hepatitis E virus*. J Gen Virol 88:903-911, 2007 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 岡本宏明: 肝炎ウイルス研究のカッティングエッジ 基礎から臨床への贈り物 E 型肝炎ウイルス研究の進歩. 第 12 回日本肝臓学会大会、2008 年 10 月 1 日、東京、肝臓 49 Suppl. (2), A419 (2008.09)
- 2) 井上淳, 上野義之, 岡本宏明: Viral genotyping/sequencing の臨床的意義 Genotype 4 の E 型肝炎ウイルスの全長塩基配列の解析による劇症化に関連する塩基の同定. 第 12 回日本肝臓学会大会、2008 年 10 月 1 日、東京、肝臓 49 Suppl. (2), A509 (2008.09)
- 3) 水尾仁志, 姜貞憲, 狩野吉康, 本城信吾, 松居剛志, 荒川智宏, 岡本宏明, 三代俊治: 札幌市内 3 医療機関に於ける最近 10 年間の急性 E 型肝炎の変遷. 第 44 回日本肝臓学会総会、2008 年 6 月 5 日、松山、肝臓 49 Suppl. (1), A155 (2008.04)
- 4) 岡野 宏, 西村 晃, 村田一素, 岡本宏明: 当院で経験した急性 E 型肝炎の 2 症例. 第 37 回日本肝臓学会西部会、2007 年 12 月 7 日、長崎、肝臓 48 Suppl. (3), A649 (2007.12).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 宏明 (OKAMOTO HIROAKI)  
自治医科大学医学部・感染免疫学講座ウイルス学部門・教授  
研究者番号: 30177092

(2) 研究分担者

田中 利典 (TANAKA TOSHINORI)  
自治医科大学医学部・感染免疫学講座ウイルス学部門・講師  
研究者番号: 30146154  
高橋 雅春 (TAKAHASHI MASAHARU)  
自治医科大学医学部・感染免疫学講座ウイルス学部門・講師  
研究者番号: 70326841