

3. C型肝炎ウイルスの感染機構

松浦 善治

はじめに

輸血ならびに血液製剤は近代医療に不可欠なものである反面、患者は常に感染症や免疫反応等の問題に曝される事になる。この様な感染症の典型がHCV感染であったが、高感度なスクリーニング系の導入により、輸血や血液製剤に起因するHCV感染はほぼ制圧された。しかしながら、既に全世界で2億人、本邦だけでも2百万ものHCVキャリアーが存在している¹⁾。HCV感染の最も深刻な問題点は、惹起した肝炎が高率に慢性化し、さらに持続感染したまま肝硬変、肝癌へと移行する点である。本邦の癌死の第3位は肝癌であり、その8割以上がHCV感染に起因しており、年間約3万人が死亡している。現在、多くのC型慢性肝炎患者に対してインターフェロン療法が施行されているものの、治療後に肝機能が持続的に正常化する著効例は3割程度である。この様にHCVは今や我が国の国民病であり、キャリアーの発症予防やウイルスの生体からの排除を目的とした抗ウイルス剤や治療用ワクチンの開発が急務である。しかしながら、現時点でHCVを効率よく増殖できる培養細胞系や感受性を示す実験動物もチンパンジー以外には見つかっておらず、ワクチンや治療薬の開発は困難を極めている。

HCVの性状

HCVはプラスの極性をもつ約9.4kbの一本鎖RNAをゲノムとしてもち、約3000アミノ酸からなる大きな前駆体蛋白をコードできる一本の蛋白読枠を持っている²⁾。ゲノムの両端に存在する非翻訳領域は二次構造に富み、5'末端にはキャップ構造はなく、キャップ非依存的にリボゾー

ムが翻訳を開始できるIRES (Internal Ribosomal Entry Site) が存在する。ウイルス蛋白は前駆体蛋白として翻訳された後、宿主細胞由来のシグナラーゼにより構造蛋白であるコア蛋白と2つのエンベロープ蛋白 (E1とE2蛋白) に、また、非構造蛋白はNS2とNS3がコードするプロテアーゼによってプロセスされる (図1)。HCVには数種の遺伝子型があることが知られているが、コア蛋白をコードする遺伝子領域の塩基配列はこれらの型間でよく保存されている。さらに、コア蛋白に対する抗体が非構造蛋白を含めた他のHCV蛋白よりも感染早期に誘導されるため、発見されたコア蛋白はHCV感染症に伴う抗体測定に極めて有用であった^{3,4)}。

HCV感染による宿主応答

HCVは血液や血液製剤を介して体内に侵入し、最終的に肝細胞に感染し増殖すると考えられる。感染早期に惹起される宿主応答はインターフェロン (IFN) α や β などのtype I IFNの誘導である。Type I IFNは多くのウイルス感染における自然免疫応答としてウイルスの増殖を阻害することが知られており、HCV RNAが細胞内で複製するRNAレプリコンの系でもその活性が証明されている⁵⁾。また、HCVの生体からの排除におけるこれら自然免疫応答の重要性は、実験感染させたチンパンジーの肝組織における各種遺伝子発現をDNAチップで調べた成績からも支持されている⁶⁾。HCV研究の最大の障害は蛋白レベルで複製を検出できる細胞培養系が未だに確立されていないことであり、誘導された抗体の中和活性を *in vitro* で評価できないことであったが、カイロン社のグループは哺乳動物細胞で発現させたE2蛋白がヒト細胞表面に存在するCD81に結合することを見出し、この結合を阻止する抗体 (NOB抗体) を検出するアッセイ法を開発した⁷⁾。感染防御が認められたチンパンジーだけでなく、実際に慢性C型肝炎から自然治癒した症例では、NOB抗体が高率に検出されることから⁸⁾、HCVの生体からの排除にこの抗体が重要な役割を果たしているものと考えられる。感染個体における中和抗体の誘導は、血清とウイルスを *in vitro* で反応後、チンパンジーへ接種した実験から証明されている。また、E2蛋白のN末側に存在する超可変領域 (HVR-1) が主

大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター (〒565-0871 吹田市山田丘3-1)

Infection mechanisms of hepatitis C virus

Yoshiharu Matsuura

Research Center for Emerging Infectious Diseases

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

TEL: 06-6879-8340

FAX: 06-6879-8269

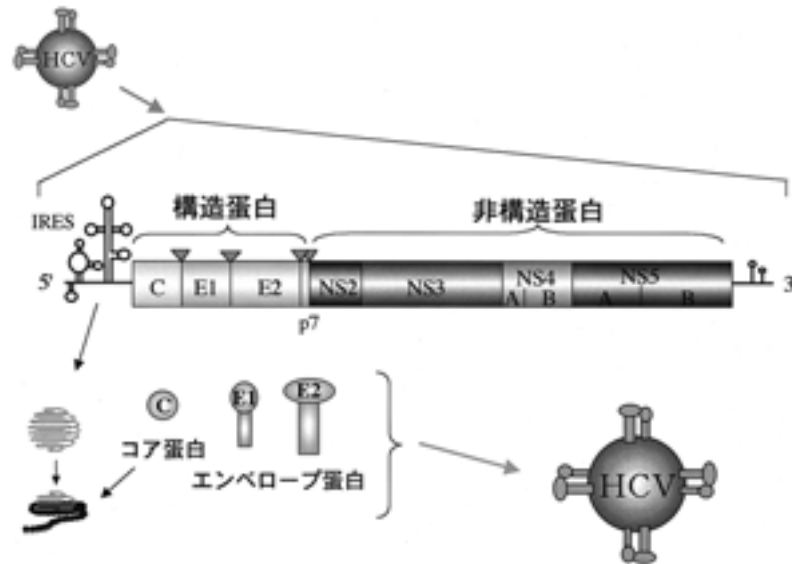


図1 HCVの遺伝子構造とウイルス蛋白

HCVは一本の大きな前駆体蛋白をコードするプラス鎖の一本鎖RNAを遺伝子として持っている。遺伝子の5'末端にはキャップ構造はなく、キャップ非依存的にリボソームが翻訳を開始できるIRESが存在する。前駆体蛋白は細胞のシグナラーゼ(▽)とウイルス由来のプロテアーゼによって各ウイルス蛋白にプロセスされる。キャプシド(C)と二つのエンベロープ蛋白(E1とE2)はウイルス粒子を構成している。また残りの蛋白は粒子に取り込まれない非構造蛋白で、ウイルスの複製に必須なものと考えられる。

要な中和抗原であるとの報告もあるが⁹⁾、HVR-1には物理化学的性状や構造がよく保存されている領域も存在しており¹⁰⁾、さらに、HVR-1の変異は必ずしも持続感染の成立に必要なとの成績もあり¹¹⁾、持続感染の成立におけるHVRの役割に関してコンセンサスは得られていない。急性期のウイルス排除には細胞性免疫の関与が報告されている。CD4⁺T細胞は貪食しプロセスした抗原をMHC class II分子に提示することが知られているが、急性C型肝炎からの回復にはTh2よりTh1細胞の重要性が指摘されている。また、CD8⁺細胞傷害性T細胞はウイルス抗原を細胞表面のclass I分子上に提示している感染細胞を見つけだし、増殖したウイルスが細胞外へ放出される前に排除することから、HCVのような細胞変性を惹起しないウイルスに対する防御に重要な働きを演じている。スタンフォード大学のグループは6頭のチンパンジーにHCVを接種したところ、2頭が急性肝炎を発症したものの寛解し、HCVが血液中から排除された。慢性化した4頭は感染早期に於ける肝組織中の細胞傷害性T細胞の活性がほとんどみられないか、ごく一部のHCV蛋白に活性を示したのみであった。一方、寛解した2頭では接種後早期より4-5個のHCV蛋白に広く反応する細胞傷害性T細胞が肝組織中に観察された。これら2頭のチンパンジーでは有意なHCV抗体の上昇は認められなかったことから、HCV感染の慢性化を妨げる機構として感染早期からの広範囲な抗原

と反応できる細胞傷害性T細胞の誘導が重要であると報告している¹²⁾。

持続感染に関するウイルス因子

HCVに感染するとその約7割は持続感染し、残りの3割は自然治癒する。HCVの自然免疫あるいは獲得免疫からの逃避機構は明らかではないが、免疫を誘導させない、あるいは、積極的に回避する何らかの手段を講じていると考えられる。HCVの様に細胞傷害活性が弱く持続感染が容易に成立するウイルス感染症では、強い宿主の免疫応答を惹起しにくいことが一般的に考えられる。また、重要な要因の一つはウイルスポリメラーゼの不正確さに起因するHCVの多様性(quasispecies)で、ウイルス抗原への持続的な変異の導入は、宿主の免疫機構から逃避に重要な働きを演じていると思われる。実際、細胞傷害性T細胞やTh細胞に対するアンタゴニストの出現が報告されており¹³⁾、HCV特異的なCD4⁺/Th1⁺T細胞が維持できるとウイルスが排除され、維持できない症例では再燃あるいは慢性化することが観察されている¹⁴⁾。CD4⁺T細胞はB細胞の分化や中和抗体の産生、CTLの誘導・維持、さらにCD40を介した樹状細胞の刺激や活性化等の獲得免疫において中心的な役割を演じていることから、CD4⁺T細胞からのエスケープミュータントの出現は宿主の免疫機構からの逃避と慢性持続感染の成立に関与しているものと思われる。

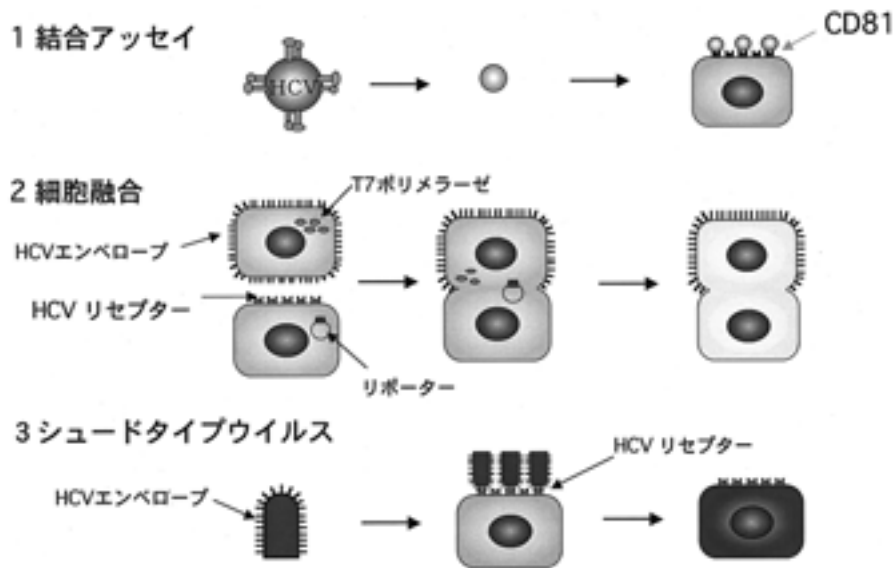


図2 HCV 感染機構の解析法

培養系のないウイルスの感染機構のアッセイ系として、i) 精製エンベロープ蛋白と細胞との結合アッセイ、ii) エンベロープ蛋白を発現した細胞と受容細胞との細胞融合アッセイ、iii) 調べたいウイルスのエンベロープを持ったシュードタイプウイルスなどが考えられる。

また、HCV 蛋白が直接宿主の自然免疫の回避に働くこともいくつか報告されている。HCV の粒子を構成するコア蛋白が T 細胞表面に発現している補体 (gC1q) のリセプターに結合し、T 細胞の増殖や IL 2 や IFN- γ の産生を阻害することが明らかにされている¹⁵⁾。また、IFN で誘導される蛋白リン酸化酵素 (PKR) は翻訳開始因子の eIF 2 α の α -subunit をリン酸化し蛋白合成を阻害することが知られているが、Lai らはエンベロープ蛋白の E2 蛋白に PKR と eIF 2 α のリン酸化部位と相同なアミノ酸配列 (PePHD) が存在し、E2 蛋白が PKR に PePHD を介して結合し、その活性を阻害することを証明した。さらに、PePHD が IFN に耐性な genotype 1 ではよく保存されており、感受性の genotype 2 や 3 では保存されていないことから、IFN の感受性と PePHD の相関を提唱している¹⁶⁾。また、NS5A 蛋白には IFN の感受性を規定する領域 (ISDR) が存在し、この領域が PKR のダイマー形成を阻害することにより IFN の活性を抑制していると考えられている¹⁷⁾。

HCV のワクチン開発の現状

上述の如く HCV はその多様性や可変性と巧妙な手段によって、宿主の免疫監視機構から逃避し持続感染を成立させると考えられる。また、蛋白レベルでウイルスの複製を検出できる細胞培養系や十分な感受性を示す小型な実験動物もチンパンジー以外には見つかっておらず、仮にワクチン候補ができたとしても、それを評価できるアッセイ系を欠くことがワクチン開発をいっそう困難にしている。この

ような厳しい状況下で、米国カイロン社は組換え遺伝子技術により産生した HCV のエンベロープ蛋白のワクチン効果をチンパンジーで実験し、7 頭中 5 頭に感染防御活性が認められた。しかしながら、攻撃ウイルス量をあげると防御活性は認められなくなり、さらに、同じ遺伝子型でも別のウイルスで攻撃した場合には防御活性は低かった¹⁸⁾。一方、HCV の感染性 RNA クローンを肝臓内に接種して感染させたチンパンジーに、1 年半後に同じ遺伝子型、あるいは異なる遺伝子型のウイルスで攻撃するとウイルスは速やかに排除され感染防御効果が観察された。この成績は完全な感染防御は無理としても、慢性感染を阻止できる HCV ワクチンの可能性を示唆するものである¹⁹⁾。また、米国 NIH のグループは HCV の粒子を構成する蛋白を昆虫ウイルスで大量に発現させて、ウイルス様の構造を持った粒子の産生に成功した。この HCV 様粒子をマウスに免疫したところ、コア蛋白およびエンベロープ蛋白に対する抗体が誘導された²⁰⁾。

HCV の感染機構の *in vitro* アッセイ系の開発

エンベロープを持ったウイルスの感染では、宿主細胞の受容体にエンベロープ蛋白が結合後、ウイルス膜と細胞膜が融合してウイルス遺伝子を細胞内に注入する。NOB アッセイは E2 蛋白と CD81 との結合を解析するもので、それ以降の感染に重要な細胞融合や細胞内の侵入プロセスを解析することはできない。さらに、現時点でヒト CD81 が HCV のリセプターであるとの確証は得られておらず、ヒト CD81 を発現するトランスジェニックマウスに HCV 陽

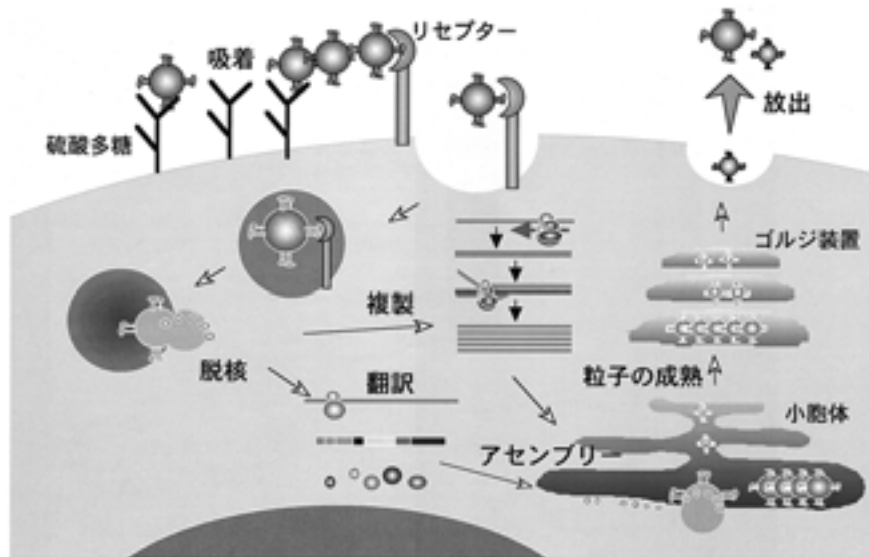


図3 HCVの生活環のモデル

これまでに得られた成績を総合して、HCVの生活環を推測した。まず、HCVはエンベロープ蛋白を介して細胞表面の蛋白リセプターに結合し、エンドサイトーシスによってエンドゾームに取り込まれる。エンドゾーム内の低pH環境下でエンベロープ蛋白の構造が変化し、エンベロープ蛋白に存在する細胞融合活性を持ったペプチドが露出して細胞膜とウイルスが融合し、ウイルスのヌクレオキャプシドが細胞質へ放出される。リセプターへの吸着そして細胞内への侵入にはE1とE2の両方の蛋白が必要である。脱核後、ウイルス遺伝子から前駆体蛋白が合成され、細胞のシグナラーゼ、あるいはウイルス自身のプロテアーゼによって各ウイルス蛋白にプロセスされる。ウイルスの非構造蛋白はポリメラーゼ複合体を構成し、ウイルス遺伝子を鋳型にして複製中間体が形成され、これを基にしてウイルスRNAの複製が開始する。複製されたウイルスRNAはコア蛋白と結合してヌクレオキャプシドを形成し、小胞体でエンベロープ蛋白と集合して小胞体内腔へ出芽するものと考えられる。出芽したウイルスはゴルジ装置を通り、各種の翻訳後修飾を受けた後、細胞膜に達して細胞外へ放出されるものと考えられる。

性血漿を接種しても感染は成立しない。そこで、未だ効率のよい細胞培養系のないHCVの感染機構を解析するため、我々はHCVの細胞への侵入機構を解析できる二つのアッセイ系を開発した(図2)。一つはエンベロープ蛋白を発現している細胞と感受性細胞との細胞融合アッセイ法²¹⁾、もう一つは水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープ蛋白を欠損させ、代わりにHCVのエンベロープを持ったシュドタイプウイルスの感染性を調べる方法である²²⁾。細胞融合にはE1とE2の両方の蛋白が必要であり、酸性処理によって融合活性の上昇が認められたことから、HCVが宿主細胞に侵入するにはHCVの二つのエンベロープ蛋白が宿主細胞表面のリセプターと結合し、エンドサイトーシスによってエンドゾーム内に取り込まれ、その酸性条件下でエンベロープ蛋白が構造変換をきたし、細胞融合能を獲得して細胞内へ侵入することが示唆された。また、シュドタイプウイルスの感染でも同様に、E1とE2の両蛋白が感染に必須であった。さらに標的細胞をプロナーゼ、ヘパリナーゼあるいはヘパリチナーゼで処理したところ、両アッセイともに阻害効果が認められたことか

ら、HCVの感染には何らかの蛋白分子ならびに硫酸多糖の関与が示唆された。また、両アッセイ系で最も高い感受性を示したHepG2細胞にはCD81の発現は全く認められないことから、HCVリセプターとしてはCD81以外に他の補助因子を必要とするのか、あるいは全く別のリセプターが存在することが示唆された。以上得られた成績を基にして、推測されるHCVの感染様式を図3に示す。

ヒト型中和抗体の開発

HCVを生体から排除する方法としては、抗ウイルス剤や治療用ワクチンの他に、HCVを中和できるヒト抗体が考えられる。上述のNOB抗体の様な中和活性を持ったヒト抗体を遺伝子組換え技術で大量に供給できれば、HCVキャリアーの肝癌進展阻止に有効な治療薬になる可能性が考えられ、欧米を中心にヒト型NOB抗体の開発が進められている。イタリアのグループは慢性C型肝炎患者の骨髓リンパ球から抗体遺伝子のライブラリーを作成し、ファージディスプレイ法を用いて高いNOB活性を示す5つの抗E2ヒト型Fab抗体を作製している²³⁾。また、米国のグ

グループもC型肝炎患者の末梢Bリンパ球からハイブリドーマを作製し、10個の抗E2ヒト型モノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は遺伝子型1a, 1b, 2a, そして2bのE2蛋白とも反応し、そのうちの6つはNOB活性を有していた²⁴⁾。この様な慢性C型肝炎からの自然治癒例からファージディスプレイ法で抗HCVヒト抗体を分離する方法とは別に、マウスの抗体遺伝子座をノックアウトし、さらにヒト抗体遺伝子座を導入したトランスジェニックマウス(ゼノマウス)を用いてヒト型抗体を産生することも可能である²⁵⁾。我々はこのゼノマウスを組換えHCVエンベロップ蛋白で免疫し、ヒト型抗HCVエンベロップ抗体を作製した。これらの抗体は上記のシュドタイプウイルスの感染を阻害しなかったが、HCVエンベロップの細胞融合活性を阻害するクローンが得られた。これまでに報告されているヒト抗体は全てE2蛋白とCD81との結合を阻害する活性、即ちNOB活性を指標にして作製されたため、得られた抗体は全て抗E2抗体であった。一方、我々が作製したヒト型モノクローナル抗体の中には細胞融合を阻止できる抗E1抗体が4クローン含まれていた。また、細胞融合阻害活性を示した抗E2抗体はNOB活性を全く示さなかった。このことからCD81以外の感染に重要な宿主因子の存在が強く示唆される。

おわりに

HCVの研究で最も重要なのは、信頼できる細胞培養系の開発である。これまでに多くのグループからHCVに感受性を示す細胞培養系が報告されているが、いずれも高感度ではあるが信頼性を欠く遺伝子増幅法によりウイルスの複製を証明したもののばかりである。最近、ドイツのグループはHCVの非構造蛋白遺伝子の上位に薬剤耐性遺伝子を組み込んだキメラRNAが持続的に複製できる“RNA replicon”の作製に成功し、HCVの複製機構の解明に新しい糸口を見いだした²⁶⁾。さらに全HCV遺伝子が複製出来るRepliconの作製にも成功したが、感染性のウイルス粒子の産生には至っていない²⁷⁾。HCVの細胞培養系の確立には、ウイルスの吸着、侵入、脱核、翻訳、複製、アセンブリー、そして出芽の各ステップを詳細に解析し、それらを丹念に再構築して行く地道な作業が必要と思われる。また、これまでに報告されているヒト型抗体の中和活性を*in vivo*で証明できれば、慢性C型肝炎に対する治療薬としての可能性は十分に期待できると思われ、さらにこの様な中和抗体と反応できる抗原をデザインすることにより、慢性C型肝炎に対する治療用ワクチンの開発も可能と思われる。

文 献

- 1) Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, Choo Q.-L., Houghton M., Kuo G.(1990). Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA, **87** : 6547-6549.
- 2) Houghton M.(1996). Hepatitis C viruses. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM editors. Fields Virology 3rd ed Lippincott-Raven, Philadelphia : 1035-1058.
- 3) Chiba J, Ohba H, Matsuura Y, Watanabe Y, Katayama T, Kikuchi S, Saito I, Miyamura T.(1991). Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. Proc Natl Acad Sci USA, **88** : 4641-4645.
- 4) Miyamura T, Matsuura Y.(1993). Structural proteins of hepatitis C. Trends in Microbiol, **1** : 229-231.
- 5) Blight K., Kolykhalov A., Rice C.(2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science, **290** : 1972-1974.
- 6) Bigger C., Brasky K., Lanford R.(2001). DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. J Virol, **75** : 7059-7066.
- 7) Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., Guenzi E., Cousens L, Chin M., Dong C., Weiner A. J., Lau J. Y., Choo Q. L., Chien D., Pileri P., Houghton M., Abrignani S.(1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus : cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. Proc Natl Acad Sci USA, **93** : 1759-1763.
- 8) Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Wyatt C., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., Miyamura T.(1998). High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. Hepatology, **28** : 1117-1120.
- 9) Farci P., Alter H. J., Wong D. C., Miller R. H., Govindarajan S., Engle R., Shapiro M., Purcell R. H.(1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzee-safer antibody-mediated *in vitro* neutralization. Proc Natl Acad Sci USA, **91** : 7792-7796.
- 10) Penin F., Combet C., Germanidis G., Frainais P. O., Deleage G., Pawlotsky J. M.(2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. J Virol, **75** : 5703-5710.
- 11) Major M. E., Mihalik K., Fernandez J., Seidman J., Kleiner D., Kolykhalov A. A., Rice C. M., Feinstone S. M.(1999). Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. J Virol, **73** : 3317-3325.
- 12) Cooper S., Erickson A. L., Adams E. J., Kansopon J., Weiner A. J., Chien D. Y., Houghton M., Parham P., Walker C. M.(1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. Immunity, **10** : 439-449.
- 13) Frasca L., Del Porto P., Tuosto L., Marinari B., Scotta C., Carbonari M., Nicosia A., Piccolella E.(1999). Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4⁺T cells. J Immu-

- nol, **163** : 650-658.
- 14) Gerlach J. T., Diepolder H. M., Jung M. C., Gruener N. H., Schraut W. W., Zachoval R., Hoffmann R., Schirren C. A., Santantonio T., Pape G. R. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD 4 (+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, **117** : 933-941.
 - 15) Kittlesen D. J., Chianese-Bullock K. A., Yao Z. Q., Bra-ciale T. J., Hahn Y. S. (2000). Interaction between complement receptor gC 1 qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest*, **106** : 1239-1249.
 - 16) Taylor D. R., Shi S. T., Romano P. R., Barber G. N., Lai M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E 2 protein. *Science*, **285** : 107-110.
 - 17) Gale M. Jr., Blakely C. M., Kwieciszewski B., Tan S. L., Dossett M., Tang N. M., Korth M. J., Polyak S. J., Gretch D. R., Katze M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5 A protein : molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*, **18** : 5208-5218.
 - 18) Choo Q.-L., Kuo G., Ralston R., Weiner A., Chien D., Nest G. V., Han J., Berger K., Thudium K., Kuo C., Kansopon J., McFarland J., Tabrizi A., Ching K., Moss B., Cummins L. B., Houghton M., Muchmore E. (1994). Vaccination of Chimpanzees Against Infection by the Hepatitis C Virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91** : 1294-1298.
 - 19) Weiner A. J., Paliard X., Selby M. J., Medina-Selby A., Coit D., Nguyen S., Kansopon J., Arian C. L., Ng P., Tucker J., Lee C. T., Polakos N. K., Han J., Wong S., Lu H. H., Rosenberg S., Brasky K. M., Chien D., Kuo G., Houghton M. (2001). Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *J Virol*, **75** : 7142-7148.
 - 20) Baumert T. F., Vergalla J., Sato J., Thomson M., Lechmann M., Herion D., Greenberg H. B., Ito S., Liang T. J. (1999). Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology*, **117** : 1397-1407.
 - 21) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Suzuki T., Asakura H., Matsuura Y., Miyamura T. (2000). Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*, **74** : 5066-5074.
 - 22) Matsuura Y., Tani H., Suzuki K., Kimura-Someya T., Suzuki R., Aizaki H., Ishii K., Moriishi K., Robison C.S., Whitt M.A., Miyamura T. (2001). Characterization of Pseudotype VSV Possessing HCV Envelope Proteins. *Virology*, **286** : 263-275.
 - 23) Burioni R., Plaisant P., Manzin A., Rosa D., Delli Carri V., Bugli F., Solforosi L., Abrignani S., Varaldo P. E., Fadda G., Clementi M. (1998). Dissection of human humoral immune response against hepatitis C virus E 2 glycoprotein by repertoire cloning and generation of recombinant Fab fragments. *Hepatology*, **28** : 810-814.
 - 24) Hadlock K. G., Lanford R. E., Perkins S., Rowe J., Yang Q., Levy S., Pileri P., Abrignani S., Fong S. K. (2000). Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E 2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J. Virol*, **74** : 10407-10416.
 - 25) Mendez M. J., Green L. L., Corvalan J. R., Jia X. C., Maynard-Currie C. E., Yang X. D., Gallo M. L., Louie D. M., Lee D. V., Erickson K. L., Luna J., Roy C. M., Abderrahim H., Kirschenbaum F., Noguchi M., Smith D. H., Fukushima A., Hales J. F., Klapholz S., Finer M. H., Davis C. G., Zsebo K. M., Jakobovits A. (1997). Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet*, **15** : 146-156.
 - 26) Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. (1999). Replication of sub-genomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285** : 110-113.
 - 27) Pietschmann T., Lohmann V., Kaul A., Krieger N., Rinck G., Rutter G., Strand D., Bartenschlager R. (2002). Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *J. Virol*, **76** : 4008-4021.