

6. E型肝炎ウイルスの感染培養系

岡本 宏明

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門

これまでに、E型肝炎ウイルス(HEV)の初代肝細胞や種々の株化細胞での培養が試みられてきたが、いずれも増殖レベルは極めて低かった。最近、著者らは高力価のHEV(JE03-1760F株[遺伝子型3型]、あるいはHE-JF5/15F株[4型])を含む糞便浮遊液を用い、肝癌細胞株PLC/PRF/5と肺癌細胞株A549での効率的なHEVの培養系を確立することに成功した。培養上清中のHEV RNA量は 10^8 copies/mlに達し、新たな細胞への継代培養も可能であった。野生株JE03-1760Fと同等の増殖能を持つ感染性cDNAクローンを作製することができ、ORF3欠損変異クローンを用いて解析した結果、ORF3蛋白は感染細胞からのHEV粒子の放出に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、E型肝炎患者に由来する急性期血清中のHEVも、ウイルス量が多いほど、効率よくPLC/PRF/5細胞やA549細胞に感染し増殖しうることが分かった。効率的なHEVの感染培養系が確立されたことで、これまで未解明であったHEVに関する多方面の数々の疑問に一つ一つ答えを出すことが可能になったと言える。

はじめに

E型肝炎ウイルス(HEV)は急性あるいは劇症E型肝炎の原因ウイルスである。HEVはエンベロープに覆われていない小型球状粒子(直径27~34 nm:平均30 nm)であり、ヘペウイルス科(family *Hepeviridae*)のヘペウイルス属(genus *hepevirus*)に分類されている¹⁾。ゲノムは5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA配列をもつ、約7,200塩基長の1本鎖(プラス鎖)RNAであり(図1)、3つのopen reading frame(ORFs: ORF1, ORF2, ORF3)を有する²⁾。ORF1はhelicaseやRNA polymeraseなどの非構造蛋白を、ORF2はcapsid蛋白をコードしている。ORF3は113ないし114アミノ酸残基からなる短いリン酸化蛋白をコードしている。ORF1蛋白はゲノムRNAから、ORF2蛋白とORF3蛋白は2.2-kbのサブゲノムRNAから

翻訳される^{3,4)}。

HEVは主として肝臓で増殖し、胆管を經由して腸管に排出され、糞便とともに体外に放出される。そのため、不備な衛生環境下では糞口(fecal-oral)ルートによるHEV感染が起こり易く、アジア、アフリカおよび中米の熱帯・亜熱帯地域に位置する発展途上国は高い浸淫率を示している。一方、従前、日米欧等の先進諸国でのE型肝炎は、稀な「輸入感染症」の一つと理解され、殆ど注目されていなかった。ところが、1990年代末になって、流行地への渡航歴がない欧米の急性肝炎患者から新種のHEVが発見され、先進国には輸入感染症としてのE型肝炎のみならず、国内感染型のE型肝炎も存在することが次第に認識されるようになった。わが国でも2001年以降、海外渡航によらない散发性E型肝炎症例の存在が明らかになり⁵⁻⁷⁾、国内の養豚場のブタでHEV感染が蔓延している事実が周知になった^{8,9)}。加えて、ブタや野生動物の肉・内臓摂食後のE型肝炎発症事例が相次いで報告され^{10,11)}、かつ重症化例や劇症肝炎による死亡例の存在も認識されるようになって¹²⁾、E型肝炎がにわかに注目を集め、診断や疫学に関する研究も急速に進展した。その結果、本症における動物由来感染(zoonosis)の重要性が、わが国において、世界に先駆けて認知された。HEVの血清型は1種類であるが、1型から4型までの4種類の遺伝子型に大別されている¹³⁾。それらは全塩基配列が互いに約25%異なっている。1型と2型がヒトのみに感染

連絡先

〒329-0498

栃木県下野市薬師寺3311-1

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座ウイルス学部門

TEL: 0285-58-7404

FAX: 0285-44-1557

E-mail: hokamoto@jichi.ac.jp

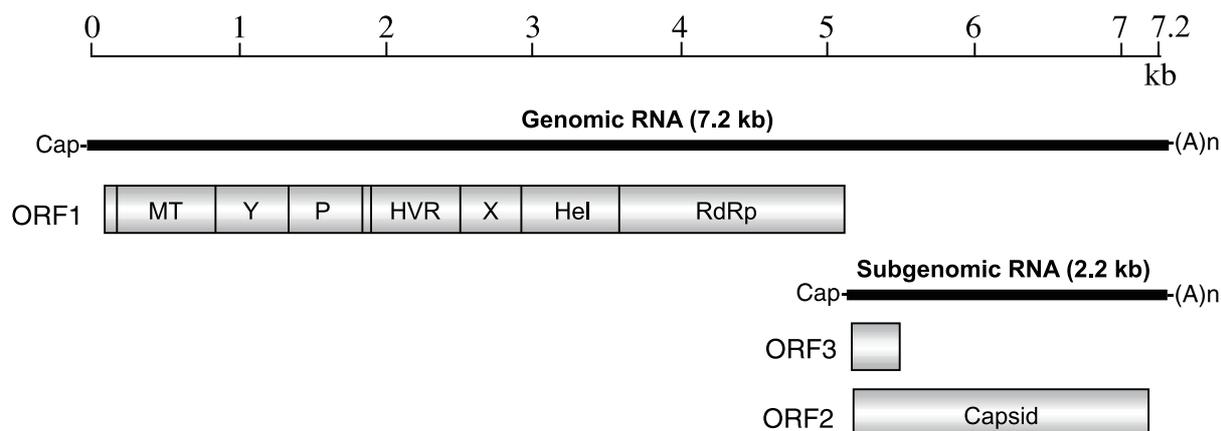


図1 HEVの遺伝子構造

MT, methyltransferase; Y, Y domain; P, papain-like protease; HVR, hypervariable region; X, X domain; Hel, helicase; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase

表1 HEV 遺伝子型と E 型肝炎の特徴

遺伝子型	主な分布地域	主な感染様式	発展途上国	先進国	特徴
1	アジア アフリカ	水系感染 (流行性)	主	稀 (輸入感染)	<ul style="list-style-type: none"> ● 若年成人に多い ● 妊婦での重症化
2	メキシコ アフリカ*				
3	アフリカを除く 世界各地	食感染 (散発性)	稀	主	<ul style="list-style-type: none"> ● 人獣共通感染症(ブタやイノシシ、シカなどにも感染) ● 中高年男性に多い ● 重症化・劇症化例は中高年男性 ● 臓器移植患者では慢性化もある
4	中国、台湾、 日本(北海道) ベトナム、インド、 インドネシア				

*エジプト、チャド、ナミビア、ナイジェリア、中央アフリカ共和国、コンゴ民主共和国など。

し浸淫地域での流行性肝炎に関係しているのに対して、3型と4型はヒトのみならずブタやイノシシなどの動物にも感染し、人獣共通感染症としての散発性E型肝炎の原因となっている(表1)¹³⁾。

つい最近まで、HEVの培養系が無いことがウイルス学的研究を展開するうえでの大きな障壁となっていたが、著者らはHEVの効率的な感染培養系を確立することに成功し、これまでに未解明であったウイルス本態の解析が急速に進展しつつある。本稿ではHEVの感染培養系の確立およびそれによって得られた新しい知見を紹介したい。

1. HEVの感染培養系の確立

5種類の既知の肝炎ウイルスのうち、A型肝炎ウイルス(HAV)については、1979年にProvostら¹⁴⁾によって培養系が確立され、国内でも不活化HAワクチンの製造に活用されている。また、C型肝炎ウイルス(HCV)については、2005年に脇田ら¹⁵⁾によって劇症C型肝炎患者から分離された

遺伝子型2aのJFH-1ウイルスを用いたin vitro系が樹立され、HCVの感染・複製・粒子形成機構の解析に大きな進展が見られている。しかし、HEVの培養系については1990年代初頭から多くの研究者によって試みられてきたが¹⁶⁻²²⁾、増殖効率が極めて低く、継代培養も困難であり、HEVの物理化学的性状の解析やウイルス学的研究に供することは出来なかった。

2003年に1人の国内感染のE型肝炎患者から高力価のHEV(JE03-1760F株[遺伝子型3型]: 2.0×10^7 copies/ml)を含む糞便サンプルが得られたことが、これから述べるHEVの培養系樹立の契機となった。その患者に由来する糞便浮遊液を接種材料として、ヒトやサル、ウシ、イヌ、ラット、マウスに由来する21種類の株化細胞株でそのHEV株が増殖可能かどうかを検討した結果、肝癌細胞株PLC/PRF/5(Alexander)と肺癌細胞株A549の2種類の細胞株でJE03-1760F株が効率よく増殖しうることが分かった²³⁾。接種ウイルス量に依存して効率よく培養上清中に

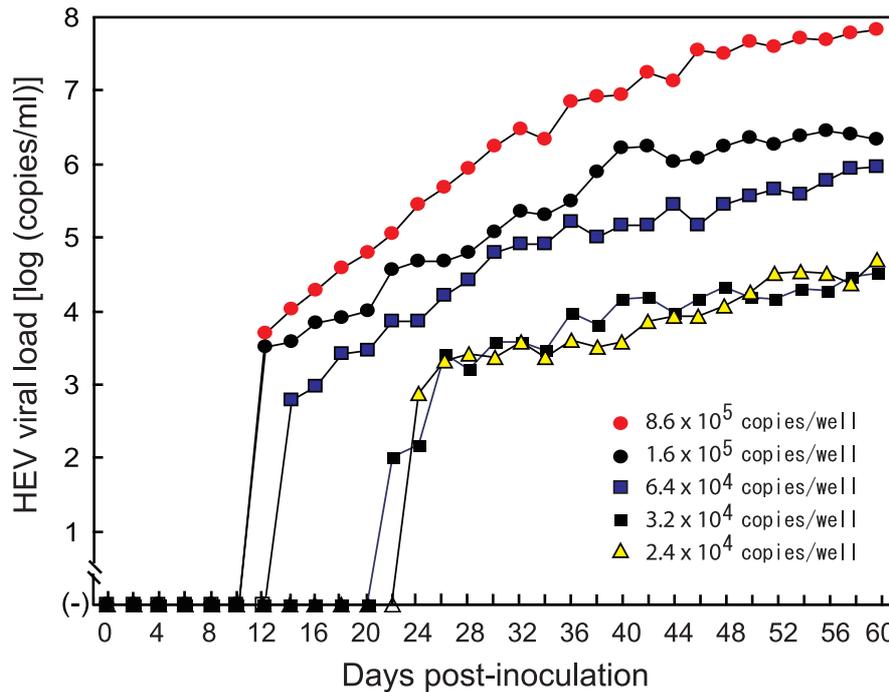


図2 肝癌細胞株 PLC/PRF/5 における HEV の増殖

種々のウイルス量の HEV(JE03-1760F 株)を含む糞便浮遊液を接種したあとの 60 日目までの培養上清中の HEV RNA titer を示す。

子ウイルスが産出され、6-well plate の 1 well 当たりの copy 数を 8.6×10^5 (MOI \approx 0.9) として JE03-1760F 株を接種したところ、60 日目には培養上清中のウイルス量が 10^8 copies/ml に達した (図 2)。また、1 well 当たりの copy 数を 2.4×10^4 (MOI=0.03) に減らしても増殖を確認することができた。さらに、培養上清中に放出された子ウイルスは新たな PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞でも効率良く増え、かつ連続的な継代培養も可能であることが分かった。高いウイルス量の接種材料が得られたこと、そしてその HEV 株が既知の 3 型 HEV 株には認められないユニークな変異を 29 ヶ所の塩基 (そのうち、6 塩基はアミノ酸置換を伴う非同義変異) を有していたことが、世界で初めての効率的な感染培養系の確立に繋がったものと推測される²⁴⁾。

続いて、別の E 型肝炎患者 (劇症型) から得られた高力価の HEV (HE-JF5/15F 株 [遺伝子型 4 型]: 1.3×10^7 copies/ml) を含む糞便浮遊液を接種することにより、新たに 4 型 HEV 株の培養系を確立することができた²⁵⁾。JE03-1760F 株と同様に、培養上清中の HEV を用いた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ウイルス (HE-JF5/15F_p6) の産出が確認され、ウイルスタイターは 10 日目に 1.5×10^8 copies/ml に達した (図 3)。疫学データから、遺伝子型 4 と肝炎重症化との密接な関連性が示唆されているが²⁶⁾、劇症肝炎患者から分離された 4 型 HEV 株の活発な増殖能が本培養系で再現されたことは劇症肝炎発症のウイルス因

子を解明するうえで興味深い。

2. 細胞培養に伴う HEV の馴化と遺伝子変異

培養細胞への HEV の馴化にどのような遺伝子変異が関わっているかを明らかにすることを目的として、野生株である糞便中の JE03-1760F 株を出発材料として、2 系列 (実験 A と実験 B) の継代実験を行った²⁷⁾。実験 A では、接種ウイルス量を約 10^5 copies/well として Passage 10 まで継代実験を行ったところ、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)、平均で 19 日も早く培養上清中のウイルス量が 10^5 copies/ml に達した (35.2 日 vs. 16.0 日)。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 3.0×10^3 copies/well, 1.0×10^3 copies/well, 3.0×10^2 copies/well として行い、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 においても実験 A 同様、前半の Passages 0-5 に比べて、後半の Passages 6-10 の方がウイルス出現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²⁷⁾。

実験 A での Passage 13 の株 (p13/A 株) と実験 B での

表2 野生株 JE03-1760F と2系列の継代株(p13/A と p10/B)の全塩基配列の比較

Nt no.	Region	Nucleotides			Amino acids	
		Wild-type	p13/A	p10/B	Residue no.	Mutation
61	ORF1	U	U	C	12	-
370	ORF1(MT)	C	U	C	115	-
445	ORF1(MT)	U	U	C	140	-
591	ORF1(MT)	C	U	C	189	Ala to Val
829	ORF1(Y)	C	C	U	268	-
1378	ORF1(P)	C	C	U	451	-
1549	ORF1(P)	U	U	C	508	-
2191	ORF1(HVR)	C	C	U	722	-
2236	ORF1(HVR)	C	C	U	737	-
2246	ORF1(HVR)	U	C	C	741	Trp to Arg
2704	ORF1(X)	U	C	U	893	-
2808	ORF1(X)	U	U	C	928	Val to Ala
2913	ORF1(Hel)	A	A	G	963	Glu to Gly
2915	ORF1(Hel)	G	G	U	964	Val to Leu
2938	ORF1(Hel)	C	U	C	971	-
3106	ORF1(Hel)	A	G	A	1027	-
3223	ORF1(Hel)	U	U	C	1066	-
3235	ORF1(Hel)	C	U	C	1070	-
3453	ORF1(Hel)	C	U	C	1143	Ala to Val
3475	ORF1(Hel)	C	C	U		
3496	ORF1(Hel)	C	U	C	1157	-
3553	ORF1(Hel)	C	U	C	1176	-
3620	ORF1(Hel)	U	C	U	1199	-
4015	ORF1(RdRp)	C	U	C	1330	-
4309	ORF1(RdRp)	C	C	U	1428	-
4462	ORF1(RdRp)	C	U	C	1479	-
5312	ORF2	U	U	C	47	-
	ORF3				51	Ile to Thr
5378	ORF2	A	G	G	69	-
	ORF3				73	Asn to Ser
5456	ORF2	C	U	U	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	-

註：MT, methyltransferase; Y, Ydomain; P, papain-like protease; HVR, hypervariable region; X, X domain; Hel, helicase; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase.

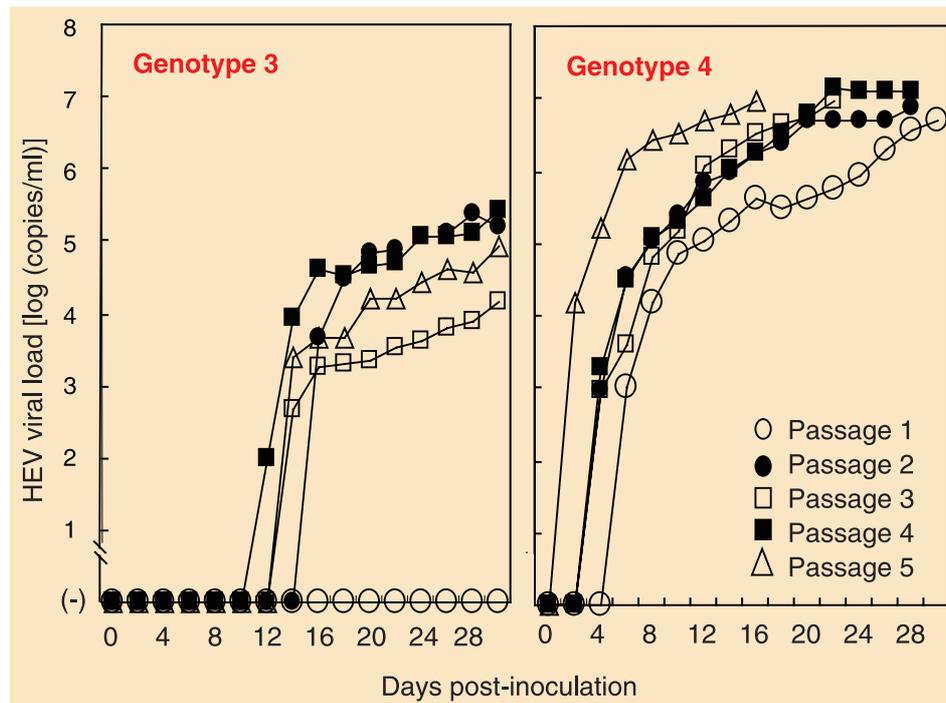


図3 急性E型肝炎患者に由来する3型HEV(JE03-1760F)と劇症E型肝炎患者に由来する4型HEV(HE-JF5/15F)の肝癌細胞株PLC/PRF/5における増殖パターンの比較

培養上清中HEVを接種したあとの、5回の継代培養(Passages 1-5)における接種後30日目までの培養上清中のHEV RNA titerを示す。

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2)。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。ウイルスゲノム全長の0.3%に相当する様々な遺伝子変異が培養系へのHEVの馴化に関連があることが示唆された。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る。

3. HEVのreverse genetics systemの確立

HEVの感染性cDNAクローンを作製するため、JE03-1760F株のゲノムRNAを鋳型にして、RT-PCR法によりゲノム全長をカバーするcDNA断片を増幅し、そのcDNA断片をT7プロモーターとpoly(A)配列との間に挿入したゲノムプラスミドを構築した(図4A)²⁸⁾。このゲノムプラスミドからin vitro transcriptionによりゲノム全長のRNA

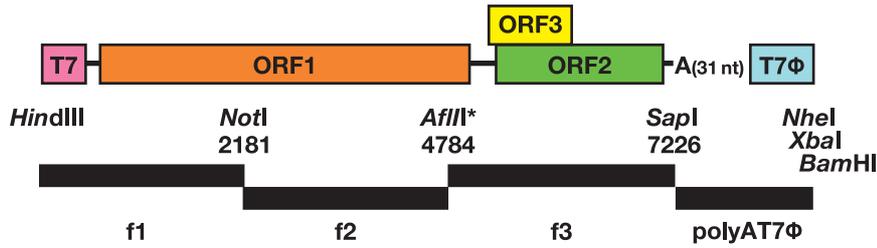
を合成し、5'末端にキャップを付加したのち、PLC/PRF/5細胞に導入したところ、培養上清中に 10^7 copies/ml以上の高いレベルでのHEV産生が認められた(図4B)。 Δ ORF1はORF1にframeshift mutationを持ったdefectiveクローンであり、negative controlとして用いた。抗ORF2マウスモノクローナル抗体(mAb)(H6225)を用い、immunofluorescent assay (IFA)法により細胞内のORF2蛋白を検出した結果、ORF2陽性細胞数はトランスフェクション後、5日、7日、11日、15日と日を追って増加し、HEV感染が拡大している像が観察された(図4C)。このcDNA由来HEV(pJE03-1760F/wt)は新たなPLC/PRF/5細胞やA549細胞に感染し効率よく増殖できるだけでなく、継代培養も可能であり、糞便由来野生株JE03-1760Fと同等の増殖能を持つことが明らかになった。

4. 変異HEVクローンの作製とORF3蛋白の機能解析

HEV ORF3蛋白の過剰発現系での実験結果から、このウイルス蛋白が細胞内で様々な機能を持った蛋白として存在していることは報告されているが²⁹⁾、生理的な条件下での機能は不明であり、粒子形成に与っているか否かについても分かっていなかった。そこで、ORF3のATGコドンをGCAに変異させたORF3欠損cDNAクローン(Δ ORF3)を作製し、その全長RNAをPLC/PRF/5細胞にtransfect

A

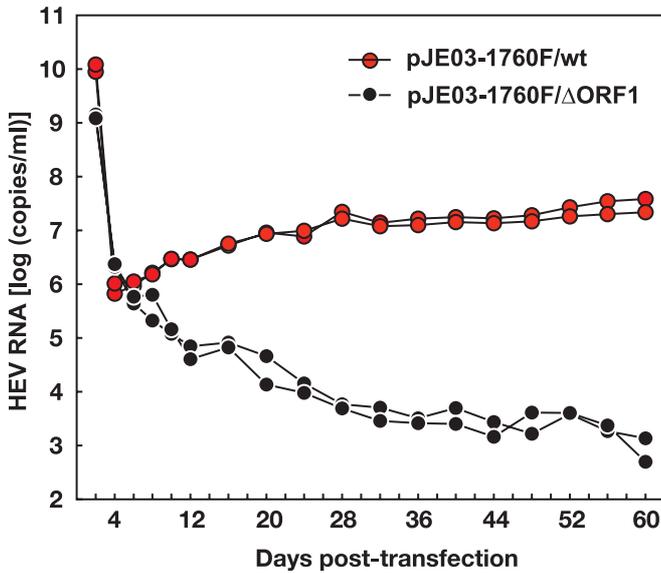
pJE03-1760F/wt



pJE03-1760F/ΔORF1



B



C

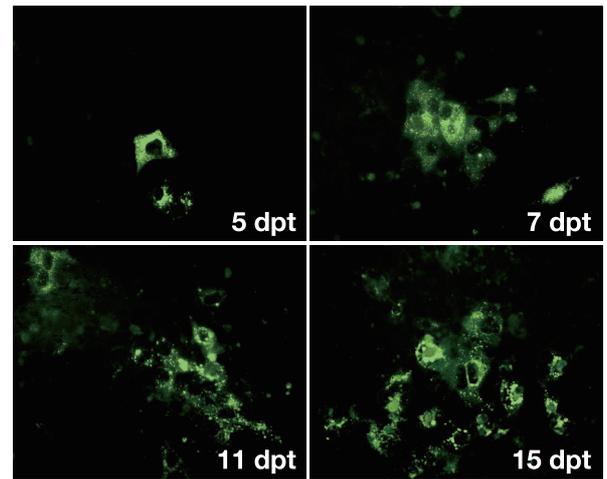


図4 HEVの感染性cDNAクローンの作製と評価

- (A) 野生株 JE03-1760F の cDNA クローンおよび negative control としての ORF1 欠損変異クローン(Δ ORF1)の構築
- (B) 全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞に transfect したあとの培養上清中の HEV RNA titer の推移を示す。野生株と Δ ORF1 のそれぞれについて 2 wells のデータを示す。
- (C) IFA: 抗 ORF2 mAb (H6225)および Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG を用いて細胞内の ORF2 抗原を検出した。

した³⁰⁾。その結果、Δ ORF3 ウイルスでは細胞内で野生株 pJE03-1760F/wt と同等レベルの HEV RNA が検出されたにも拘わらず、培養上清中への子ウイルスの放出は認められなかった (図 5)。したがって、ORF3 欠損ウイルスは細胞内では増殖できても分泌能を欠いていることが明らかになった。

加えて、抗 ORF3 mAb (TA0536) を用いた immuno-

capture PCR 法によって検討した結果、糞便中の HEV 粒子と異なり、培養上清中の HEV 粒子上に ORF3 蛋白が存在していることが明らかになった^{30,31)}。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 蛋白は培養上清中の HEV 粒子上でリポドを含んだ膜にほぼ覆われた状態で存在しているものと考えられる。また、糞

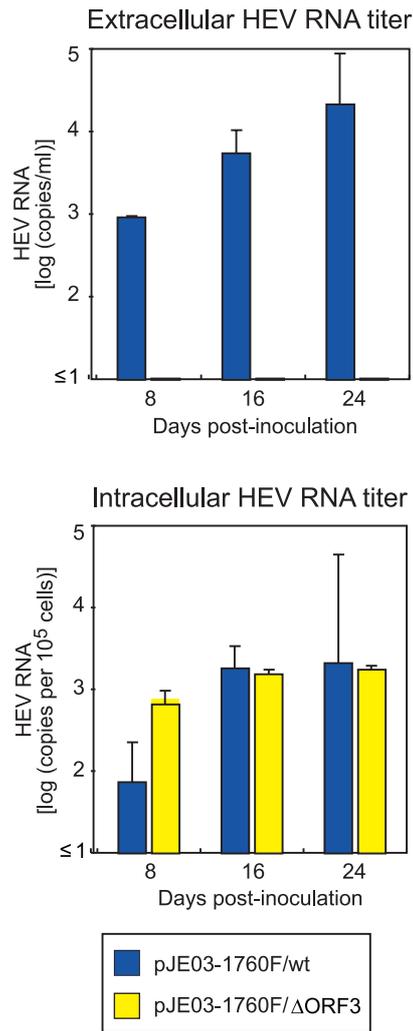


図5 野生株と ORF3 欠損株(Δ ORF3)での培養上清中および細胞内の HEV RNA titer の比較

便中の HEV 粒子を抗 ORF3 mAb で捕捉できなかったのは、HEV 粒子が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膵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。実際、培養上清中の HEV 粒子をデオキシコール酸とトリプシンで処理することにより、抗 ORF2 mAb によってほぼ完全に捕捉されるのに対して、抗 ORF3 mAb によっては全く捕捉されなくなり、シヨ糖液中での浮上密度も処理前の 1.15-1.16 g/ml から糞便中 HEV 粒子と同等の 1.27-1.28 g/ml にシフトした。

したがって、ORF3 蛋白は粒子上に存在すると言う点で構造蛋白でもあり、感染細胞からの放出に重要な役割を果たしていると考えられる。そして、培養上清中の HEV が細胞膜に覆われ、ORF3 蛋白を担った状態で細胞から放出され、恰も “enveloped” ウイルスとして存在しているのに対して、糞便中ではこれまでの教科書に記載されているよ

うに “non-enveloped” ウイルスとして存在しており、HEV 粒子として 2 種類の存在形態があることが分かった。

5. 患者血清由来 HEV の感染培養系の確立

E 型肝炎患者血清中の HEV 粒子の浮上密度を測定すると、培養上清中の HEV 粒子と同じように、シヨ糖液中で 1.15-1.16 g/ml にピークを形成する。培養上清中の HEV 粒子は糞便中の HEV 粒子と異なり、“enveloped” ウイルスの形態をとりながら、新たな培養細胞に感染し、効率よく増えうる。そして、輸血後 E 型肝炎の発生も国内外から報告がある^{32,33)}。このような事実から、血清中 HEV 粒子の感染培養系も確立できるのではないかと考え、以下のような接種実験を試みた。

輸入感染あるいは国内感染の E 型肝炎患者に由来する急性期血清 (n=32) を 6-well plate の各 well 当たり 10⁶ copies のオーダー (1.5-3.0 x 10⁶ copies/well, n=4)、あるいは 10⁵ copies のオーダー (1.5-5.8 x 10⁵ copies/well, n=9)

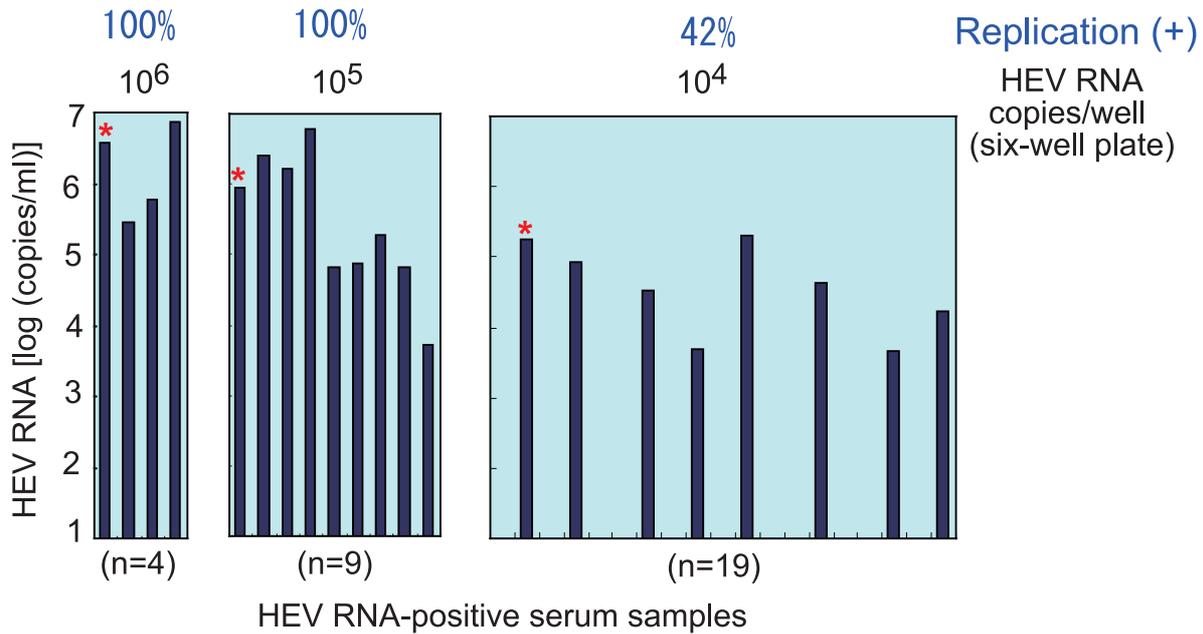


図6 血清中 HEV を PLC/PRF/5 細胞に接種したあとの 30 日目の培養上清中の HEV RNA titer

6-well plate の 1 well 当たり 10^6 copies, 10^5 copies, あるいは 10^4 copies で血清中 HEV を接種した場合の感染が認められた検体は、それぞれ 100% (4/4), 100% (9/9), 42% (8/19) であった。*印は HEV 抗体が陰性の検体であることを示す。

で接種したところ、全 well で HEV の増殖が認められ、接種後 30 日目の培養上清中の HEV RNA titer は 10^6 オーダーの接種では 2.1×10^6 copies/ml (中央値), 10^5 オーダーの接種では 1.9×10^5 copies/ml (中央値) に達し、接種ウイルス量が多いほど活発な増殖を示すことが分かった(図 6)³⁴⁾。また、 10^4 オーダー ($2.0\text{--}7.2 \times 10^4$ copies/well) の接種では 19 検体中 8 検体 (42%) で増殖が観察され、それら 8 検体での接種後 30 日目の培養上清中の HEV RNA titer は 3.9×10^4 copies/ml (中央値) であった(図 6)。ORF2 領域の 412 塩基長の配列を決定し、inoculum として用いた血清中 HEV と培養上清中 HEV (30 日目) を比較した結果、それぞれのサンプルについて、inoculum と 100% 一致するウイルスが培養細胞で産生されたことを確認できた。

また、培養上清中の HEV を A549 細胞に接種したところ、どの HEV 株も効率よく増殖することが観察され、培養上清中には感染性を有する子ウイルスが産出されていることが分かった³⁴⁾。

増殖が確認された 21 検体のうち、3 検体(図 6 のなかで *印の付いた検体)のみ血清中 HEV 抗体が陰性であり、残りの 18 検体は感染性 HEV 粒子が存在しながら HEV 抗体が共存していた。シヨ糖液中での浮上密度を調べると、血清中の HEV 粒子は HEV 抗体の存否に関わらず、培養上清中の HEV 粒子と同様、比重 1.15-1.16 g/ml の分画にピークを形成した(図 7)。また、HEV 抗体が陰性の 3 検体、

HEV 抗体が陽性の 4 検体について、ヤギ抗ヒト IgG/IgM/IgA 抗体を添加し、免疫沈降実験を行なった結果、予め回復期血清を加えてあった糞便中 HEV 粒子はほぼ 100% 沈殿物として回収されたのに対して、血清中 HEV 粒子は HEV 抗体の共存に関わらず、殆ど上清中で回収され、沈殿物中で回収された HEV 粒子はわずか 8.1% 以下であった。すなわち、血清中の HEV 粒子の殆どは HEV 抗体共存下でも immune complex を形成せず、“free” の状態で存在していることが分かった³⁴⁾。

Tween 20 や NP-40 などの界面活性剤で予め処理を行なうことにより、血清中の HEV 粒子は培養上清中の HEV 粒子と同様に、抗 ORF2 抗体および抗 ORF3 抗体で部分的に捕捉されるようになったが、予め界面活性剤と蛋白分解酵素の両者を添加し処理を行なうと、血清中 HEV 粒子と培養上清中 HEV 粒子は糞便中 HEV 粒子と同様に、1.27-1.28 g/ml の浮上密度となり(図 7)、抗 ORF2 抗体によってほぼ 100% 捕捉され、抗 ORF3 抗体によっては全く捕捉されなくなった。界面活性剤や蛋白分解酵素による処理に対して血清中 HEV 粒子は培養上清中 HEV 粒子と同等の挙動を示すことが明らかになったことから、より高いウイルスタイターのサンプルが入手可能な培養上清中の HEV 粒子を用い、処理後の HEV 粒子の培養細胞への感染性を検討した。その結果、界面活性剤単独処理の粒子もさらに界面活性剤と蛋白分解酵素の処理を受けた粒子も未処理の粒子と同等の感染性を有することが分かった³⁴⁾。

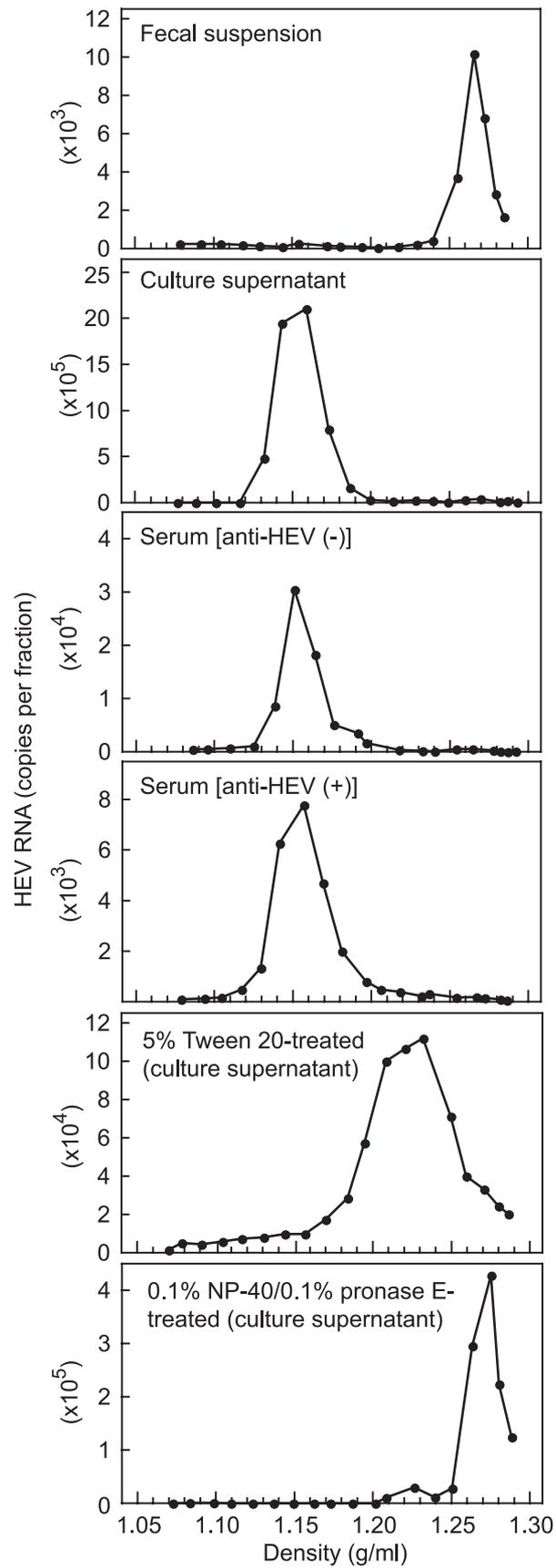


図7 HEV 粒子のシヨ糖液中での浮上密度

本研究を通じて、E型肝炎患者に由来する急性期糞便中のHEV (JE03-1760F株[3型]とHE-JF5/15F株[4型])のみならず、血清中のHEVもHEV抗体の有無に関わらず、ウイルスタイトーが高いほど、効率よくPLC/PRF/5細胞やA549細胞に感染し増殖しうることが分かった。原血清中のHEV RNA タイトーが概ね 5.0×10^5 copies/ml以上であれば、これらの細胞内で効率よく増殖しうる。培養上清中に放出されたHEV粒子が細胞膜成分に覆われ、糞便中のHEV粒子と異なって浮上密度が軽いことは上述の通りであるが、血清中のHEV粒子も細胞膜成分に覆われ、“enveloped virus”様の粒子構造をとっており、HEV抗体が共存していても、その抗体が中和抗体として粒子に結合していないことが明らかになった。そのため、HEV抗体の存否は培養細胞への感染性には影響していないことが明らかになった。しかし、現時点では何故、糞便中のHEV粒子のような“non-enveloped”ウイルスと、血清中や培養上清中のHEV粒子のように“enveloped”ウイルス様の構造を持った粒子が同等の感染性を示しうるのかを明らかに出来ていない。これらの粒子がどのような機序で感受性細胞に吸着し侵入しうるのか、その解明はHEVの生活環を理解するうえで極めて重要であると思われる。

おわりに

本稿で紹介したような、培養上清中に高濃度のHEV粒子が産生分泌される培養系が確立されたのは、世界で初めてである。JE03-1760F株のみならず、他の複数の株でも同等、あるいはそれ以上の効率で増殖が可能で、かつ連続的な継代培養を行うことができています。また、感染性cDNAクローンの構築にも成功している。これらの培養系およびreverse genetics systemを用いることにより、これまで未解明であったHEVに関する多方面の数々の疑問に一つ一つ答えを出すことが可能になったと言える。

さらに、PLC/PRF/5細胞やA549細胞を用いたHEVの感染培養系は、糞便中HEVのみならず、血清中の多くのstrainsの感染増殖を効率よくsupportしうることが分かった。このことで、本培養系の応用の幅が大きく広がったと言える。また、血清中のHEV粒子は培養上清中のHEV粒子と同様に、“enveloped”ウイルス様の粒子構造をとっていることが分かった。HAVについても、培養上清中の一部の粒子が細胞膜成分に覆われていることは知られているが^{33,34)}、HEVの場合は培養上清中および循環血液中の殆どすべての粒子が細胞膜成分に覆われている点でHAVと異なる。このように、血清中や培養上清中のHEV粒子が細胞膜成分に覆われていながら、何故、“non-enveloped”ウイルスの糞便中HEV粒子と同等の感染性を有するのかが分かっていない。そのmysteriousな現象の解明がHEVの感受性細胞への吸着・侵入のメカニズムを明らかにする上で重要である。

文 献

- 1) Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Purdy M, Schlauder G.G, Tsarev, SA. (2004). *Hepevirus*. In *Virus Taxonomy*: VIIIth report of the ICTV, pp. 853-855. Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball, LA. Elsevier/Academic Press, London.
- 2) Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120-131, 1991.
- 3) Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80:5919-5926, 2006.
- 4) Ichiyama K, Yamada K, Tanaka T, Nagashima S, Jirintai, Takahashi M, Okamoto H. Determination of the 5'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. *Arch Virol* 154:1945-1951, 2009.
- 5) Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishihiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 287:9-12, 2001.
- 6) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 40:3209-3218, 2002.
- 7) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T. Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 42:1065-1071, 2003.
- 8) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289:929-936, 2001.
- 9) Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84:851-862, 2003.
- 10) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishihiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371-373, 2003.
- 11) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84:2351-2357, 2003.
- 12) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 347:1456, 2002.
- 13) Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127:216-228, 2007.
- 14) Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 160:213-21, 1979.

- 15) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796, 2005.
- 16) Kazachkov Yu. A, Balayan MS, Ivannikova TA, Panina LI, Orlova TM, Zamyatina NA, Kusov Yu. Yu. Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 127, 399-402, 1992.
- 17) Huang R, Nakazono N, Ishii K, Li D, Kawamata O, Kawaguchi R, Tsukada Y. I. Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol* 47:299-302, 1995.
- 18) Tam AW, White R, Reed E, Short M, Zhang Y, Fuerst TR, Lanford RE. (1996). In Vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vitro-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215, 1-9, 1996.
- 19) Meng J, Dubreuil P, Pillot J. A new PCR-based seroneutralization assay in cell culture for diagnosis of hepatitis E. *J Clin Microbiol* 35:1373-1377, 1997.
- 20) Huang R, Li D, Wei S, Li Q, Yuan X, Geng L, Li X, Liu M. Cell culture of sporadic hepatitis E virus in China. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 729-733, 1999.
- 21) Wei T, Walsh P, Huang R, To SST. 93G, a novel sporadic strain of hepatitis E virus in south China isolated by cell culture. *J Med Virol* 61:311-318, 2000.
- 22) Emerson SU, Clemente-Casares P, Moiduddin N, Arankalle VA, Torian U, Purcell RH. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol* 87:697-704, 2006.
- 23) 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.
- 24) 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* 45:3671-3679, 2007.
- 25) 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 a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47:1906-1910, 2009.
- 26) Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76:341-349, 2005.
- 27) 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.
- 28) 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* 90:457-462, 2009.
- 29) Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 33:451-464, 2008.
- 30) Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90:1880-1891, 2009.
- 31) 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.
- 32) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishihiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44:934-940, 2004.
- 33) Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* 74:563-572, 2004.
- 34) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Jirintai, Mizuo H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. 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* 48:1112-11125, 2010.
- 35) Provost PJ, Wolanski BS, Miller WJ, Ittensohn OL, McAleer WJ, Hilleman MR. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* 148:532-539, 1975.
- 36) Lemon SM, Binn LN. Incomplete neutralization of hepatitis A virus in vitro due to lipid-associated virions. *J Gen Virol* 66:2501-2505, 1985.

Cell culture system for hepatitis E virus

Hiroaki OKAMOTO

Division of Virology, Department of Infection and Immunity
Jichi Medical University School of Medicine
3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi
Tochigi-ken 329-0498, Japan

Early studies reported propagation of hepatitis E virus (HEV) in primary hepatocytes or several established cell lines, but replication was inefficient. Recently, using inocula comprised of fecal suspensions with high loads of HEV, originally obtained from Japanese patients who contracted domestic infection of genotype 3 HEV (the JE03-1760F strain, 2.0×10^7 copies/ml) or genotype 4 HEV (the HE-JF5/15F strain, 1.3×10^7 copies/ml), we developed an efficient cell culture system for HEV in PLC/PRF/5 and A549 cells, which yielded the highest HEV load of 10^8 copies/ml in the culture supernatant, and we successfully propagated six or more generations in serial passages of culture supernatant. In addition, we constructed a full-length infectious cDNA clone (pJE03-1760F/wt) of the JE03-1760F strain, which can replicate efficiently in PLC/PRF/5 and A549 cells. Using a derivative ORF3-deficient (Δ ORF3) mutant, we demonstrated that the ORF3 protein of HEV is responsible for virion egress from infected cells and is present on the surface of released HEV particles, which is associated with lipids. Various HEV strains in blood circulation were also propagated efficiently in PLC/PRF/5 and A549 cells. Our in vitro cell culture system can be used for propagation of a wide variety of HEV strains in feces and sera from various infected patients, allowing extended studies on viral replication specific to different HEV strains.