

シリーズ・目で見る感染症 (82)



図1 HEV粒子の電子顕微鏡像

直径は約30nmである。この図では抗体によってウイルス粒子が凝集しているように見える。
(日本大学医学部・内田俊和氏提供)

E型肝炎

李 天成*¹⁾ 武田 直和*²⁾ 宮村 達男*³⁾

E型肝炎はE型肝炎ウイルス(HEV)によって引き起こされる急性肝炎である¹⁾。HEVが発見されるまでは非A非B型肝炎とよばれてきた。E型肝炎は主に発展途上国で散発的に発生している疾患であるが、汚染された飲料水によって大規模に流行することもよ

くある。1955年ニューデリーで29,000人、1986～88年中国の新疆で120,000人のE型肝炎の大流行が記録されている^{2, 3)}。またわが国では輸入感染症として近年発生がみられている。

*Tian Cheng Li, Naokazu Takeda, Tatsuo Miyamura

国立感染症研究所ウイルス第二部 ¹⁾協力研究員 ²⁾室長 ³⁾部長

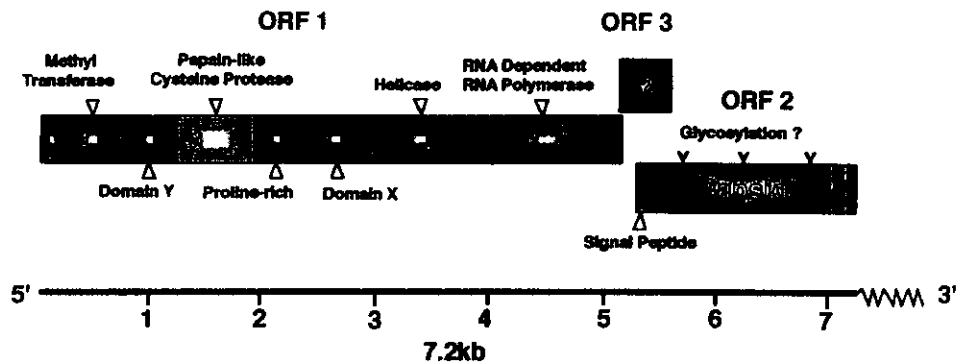


図2 HEVの遺伝子構造

HEVは約7.2kbのプラス一本鎖RNAを遺伝子にもつ。ORF1は非構造蛋白を、ORF2は構造蛋白をコードする。ORF3がコードする蛋白の機能は不明である。

[疫学と臨床経過]

E型肝炎の患者発生はA型肝炎と同じく秋にピークに達するが、東南アジアでは雨期に、特に広範囲の洪水の後に発生する。伝播は糞口経路、主に水系感染で引き起こされる。

E型肝炎の臨床症状はA型肝炎と似ており黄疸、悪心、食欲不振、腹痛等の消化器症状を伴う急性肝炎を呈する。E型肝炎の潜伏期間は15～50日、平均6週間でこれは平均4週間といわれるA型肝炎ウイルス(HAV)感染の潜伏期に比べ、幾分長い。通常発症から1カ月を経て完治する。A型肝炎と同様、E型肝炎は慢性化しない。E型肝炎の特徴の1つは妊婦で劇症肝炎の割合が高く、死亡率が20%にも達することがある¹⁾。母子感染に関してははっきり分かっていないが、治療した妊婦の胎児発育には影響がないとする報告がある⁴⁾。

HEV感染による死亡率は1～2%であるが、これもHAVに比べ10倍の高さである。E型肝炎の罹患率は大流行でも散发例でも青年と大人(15～40歳)で高く、小児で低い。流行が子供に起こるA型肝炎と対照的である⁵⁾。胆汁のうっ滞性の肝炎像は1つの特徴である³⁾。

[E型肝炎ウイルス粒子と遺伝子構造]

HEVは直径は27nm、エンベロープを持たない小型球形ウイルスである。患者糞便あるいは感染サル糞便と患者回復期の血清を用いた免疫電子顕微鏡で、27～34nmの粒子が観察される⁶⁾。HEVはかつてカリシウイルス科(Caliciviridae)に分類されていたが、はっきりした位置づけはまだ定まっていない^{7, 8)}。HEVが効率よく増殖する培養細胞系は確立されておらず、その複製機構は明らかではないが、チンパンジ、タマリン、ミドリザルのほか、アカゲザル、カニクイザルなどMacaca属のサルが感受性を示す。これら感染サルの胆汁中には多量のウイルスが排泄され、研究の出発材料として有用である。精製ウイルスの塩化セシウム平衡密度勾配遠心法での比重は1.35g/cm³、ショ糖密度勾配遠心法での沈降定数は176s～183sである^{9, 10)}(図1)。

HEVは約7.2Kbのプラス一本鎖RNAをゲノムもつ。5末端からORF1, ORF3, ORF2の順に3つのオープンリーディングフレーム(ORF)が一部重複しながら配列している^{11, 12)}。ORF1は非構造蛋白をコードし、N末端側からメチルトランスフェラーゼ、システインプロテアーゼ、RNAヘ

リカーゼ, RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのモチーフが並ぶ。3 末端にある ORF2 は 660 アミノ酸の構造蛋白をコードする。ORF3 は ORF1 と ORF2 の間に位置し, ORF1 と 1 塩基, ORF2 とは 328 塩基重複し, 123 アミノ酸をコードする。蛋白としての機能は不明であるが, 少なくとも 1 つの B 細胞エピトープが存在する¹³⁻¹⁵⁾ (図 2)。

[E型肝炎の診断]

1989 年, HEV の遺伝子がはじめてクローン化され, それを基礎に RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法による HEV 遺伝子検出が可能になった。また, 合成ペプチド抗原, 各種の発現系によって産生されたウイルス構造蛋白を用いた ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 法等の診断系が開発され¹⁶⁻²⁰⁾, 診断も容易になっている。特に筆者らは N 末端から 111 アミノ酸を欠失した構造蛋白遺伝子を発現する組換えバキュロウイルスをつくり, これが感染した昆虫細胞 Tn5 細胞の培養上清から, 平均密度は 1.285g/cm³, 直径約 23 ~ 24nm の

ウイルス様中空粒子 (VLP) を大量に得た (図 3)²¹⁾。この粒子を用いた ELISA 方法によって急性期の患者血清と感染サル血清から特異的抗 HEV-IgM, IgG 抗体が検出できた²¹⁾。さらに, 日

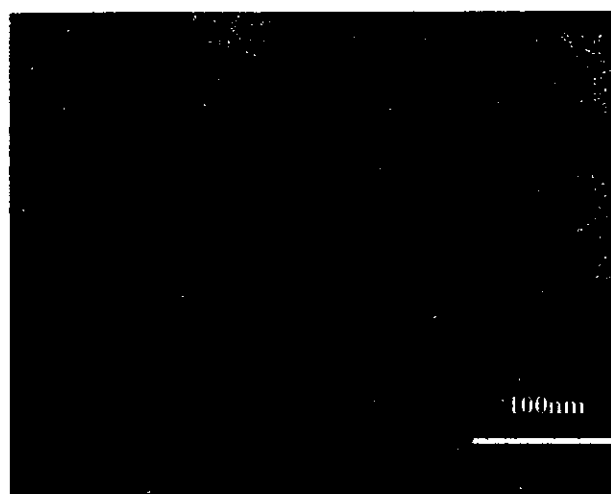


図 3 HEV のウイルス様中空粒子 (VLP) 組換えバキュロウイルスでウイルス構造蛋白 (ORF2) を発現することによって VLP を産生する。直径は約 24nm である。

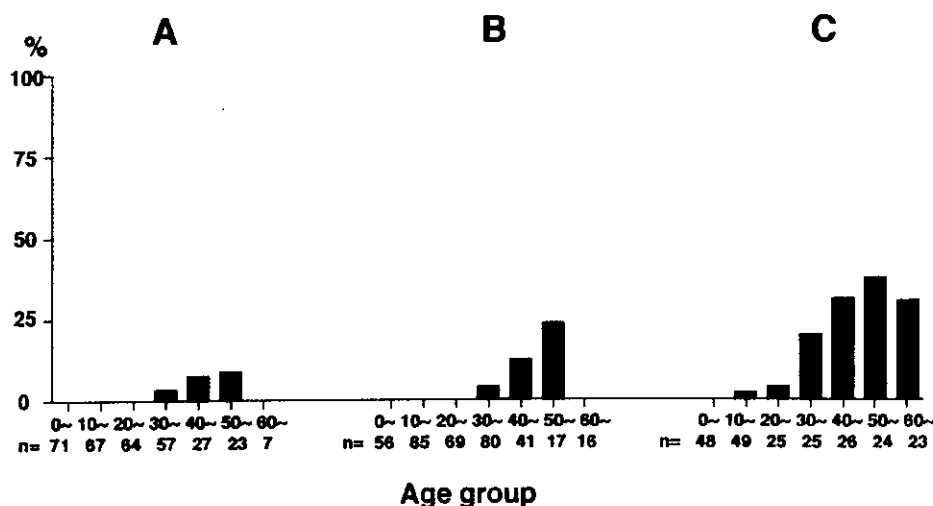


図 4 A, B, C 3 県の年齢別抗体調査から見た日本人の抗体保有率 日本人の抗体保有率を調査し, 日本人の平均保有率は 4.5%, また, 地域と年齢で保有率に差があることを示した。

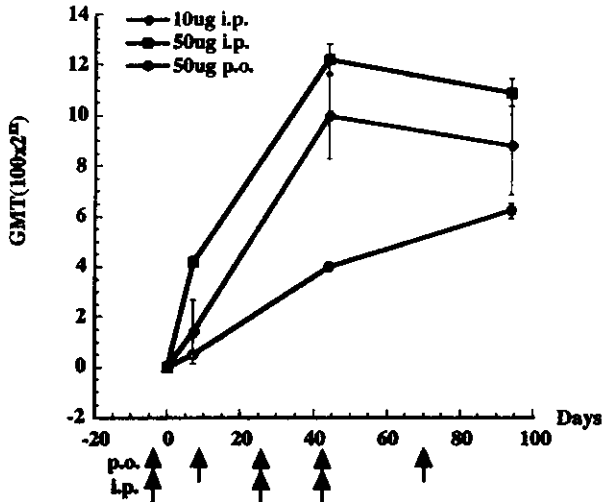


図5 VLP投与によって誘導される血中IgG抗体
マウス一匹あたり10および50 μ gのVLPを3回腹腔内に接種,あるいは50 μ gのVLPを5回経口投与した。経時的に血中IgG抗体価をVLPを抗原にしたELISAで測定した。

本人の抗体保有率を調査し,日本人の平均保有率は4.5%,また,地域と年齢で保有率に差があることを示した(図4)。

[ワクチンの開発]

E型肝炎は主に発展途上で多発すると言われているが,近年,わが国でも輸入感染例としてしばしばみられる疾患である。ワクチンの開発は発展途上国だけの問題でなく,日本を始め先進各国にとっても必要になりつつある。筆者らは発現したウイルス様中空粒子を4週齢の雌のBALB/cマウスに経口および腹腔投与し,血中のIgG, IgM, 便中のIgA抗体を測定し,ワクチンとして使う可能性を検討してみた。その結果HEVのVLPsは投与ルートに関わらず特異的にマウスの免疫反応を誘導した。特筆すべきは,経口投与において腹腔投与では認められなかった腸管IgAの産生を誘導したことである。腸管IgA抗体は粘膜免疫に重要な役割を果たすことが知られてお

8 (172)

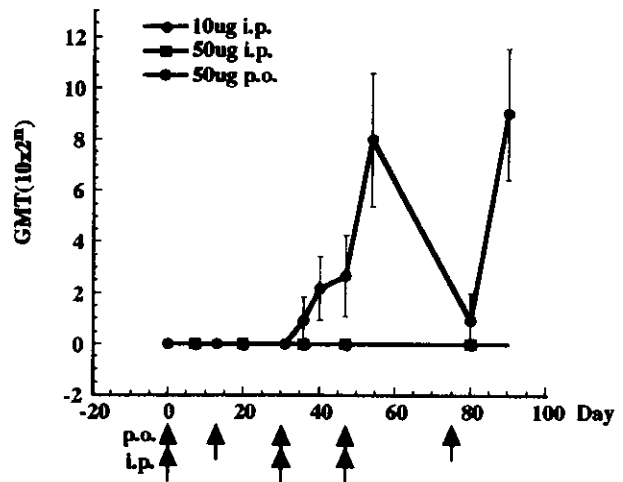


図6 VLP投与によって誘導される腸管IgA抗体
経口投与の場合にのみIgA抗体の上昇が認められた。

り, HEV感染に対する防御も期待できそうである。(図5, 図6)。

また,最近筆者らは食用植物として流通しているジャガイモをHEVの構造蛋白を発現するトランスジェニック植物に形質転換することにより,安価な経口ワクチンの研究も試みている。

文 献

- 1) Jameel S., et al.: Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 37 (4): 263-270 (1992)
- 2) Khuroo M.S.: Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 68: 818-824 (1980)
- 3) Zhuang H., et al.: Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl.3): S135-S138 (1991)
- 4) Khuroo M.S., et al.: Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 70: 252-255 (1981)

- 5) Purcell R.H., Ticehurst J.R. : Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis : epidemiology and clinical characteristics. In : *Viral hepatitis and liver disease* (Zuckerman A. J., ed.), Alan R. Liss, New York Inc. (1998) p131-137
- 6) Bradley D., et al. : Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J Gen Virol* 69 : 731-738 (1988)
- 7) Pringle C.R. : *Virus taxonomy-San Diego 1998*. *Arch Virol* 143 : 1449-1459 (1998)
- 8) Jiang X.J., Wang M., Estes M.K. : Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195 : 51-61 (1993)
- 9) Melnick J.L., Howard C.R. : Classification and taxonomy of hepatitis viruses : summary of a workshop. *Viral Hepatitis and Liver Disease* : 47-49 (1994)
- 10) Balayan M.S., et al. : Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20 : 23-31 (1983)
- 11) Bradley D.W., Beach M.J., Purdy M.A. : Molecular characterization of hepatitis C and E viruses. *Arch Virol* 7 : S1-S14 (1993)
- 12) Reyes G.R., et al. : Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV) . *Arch Virol* 7 : S15-S25 (1993)
- 13) Yarbough P.O., et al. : Hepatitis E virus : identification of type-common epitopes. *J Virol* 65:5790-5797 (1991)
- 14) Khudyakov Y.E., et al. : Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology* 194 : 89-96 (1993)
- 15) Khudyakov Yu E., et al. : Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J Gen Virol* 75 (Pt 3) : 641-646 (1994)
- 16) Purcell R.H. : Hepatitis E virus. In : *Fields Virology*. (Fields B.N. et al., ed.) Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, (1996) p2831-2843
- 17) Reyes G.R., et al. : Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247 : 1335-1339 (1990)
- 18) Reyes G.R., Kim, J.P. : Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol Cell Probes* 5 : 473-481 (1991)
- 19) Tsarev S.A., et al. : ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells : identification of HEV infection in primates. *J Infect Dis* 168 : 369-378 (1993)
- 20) Purdy M.A., et al. : Expression of a hepatitis E virus (HEV)-trpE fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Microbiol Immunol* 36 : 615-621 (1992)
- 21) Li T.C., et al. : Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 71 : 7207-7213 (1997)

ヒトカリシウイルスの多様性

染谷 雄一, 名取 克郎, 武田 直和, 宮村 達男 国立感染症研究所ウイルス第二部

1. はじめに

ヒトカリシウイルス (Human Caliciviruses, HuCVs) は冬季に多く発生をみるウイルス性食中毒や乳幼児, 小児に集団発生するウイルス性急性胃腸炎の原因ウイルスである¹⁻⁵⁾. 夏期にピークを迎える細菌性下痢症とは異なり冬季に頻発するのが特徴である. わが国では生ガキによる食中毒の病因ウイルスとして小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus, SRSV) がよく話題にのぼるが, この SRSV も HuCV の範疇にあるウイルスである. 患者糞便から下痢をおこすような病原性細菌は分離されず, 電子顕微鏡による検索によって直径38nm の被膜を持たない小型の球形ウイルスが共通の因子として観察される (図1).

近年, ウイルスの遺伝子解析技術の進展に伴って, 原因ウイルスの遺伝子を増幅し塩基配列を極めて短時間で解読することが可能になった. さらに, GenBank, EMBL, DDBJデータベースに登録される HuCV の塩基配列数も飛躍的に増加し, 遺伝学的な系統解析のための資源も整備されてきた. その結果, HuCV は当初の予想とは桁違いに遺伝学的に多様な集団を形成していることが明らかになってきた. 本稿では HuCV の多様性について我々の研究を紹介しながら解説する.

2. ヒトカリシウイルス

カリシはコップを意味するラテン語である

Genetic and antigenic diversities of human caliciviruses

Yuichi SOMEYA, Katsuro NATORI, Naokazu TAKEDA, Tatsuo MIYAMURA, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, 1-23-1, Shinjyuku-ku, Tokyo

別刷請求先: 染谷雄一 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所ウイルス第二部

Tel: 03-5285-1111 Fax: 03-5285-1161

が, ウイルス粒子を電子顕微鏡で見たときに, その表面にコップ状のくぼんだ構造が観察されることが命名の由来となっている⁶⁾. プロトタイプは1968年に米国オハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎から検出され, 1972年に免疫電子顕微鏡下でその形態が明らかになったノーウォークウイルス (Norwalk virus, NWV) である⁷⁻⁸⁾. 以来, 形態学的に NWV と区別できないが抗原的に異なる HuCV は発見された地名を冠して, たとえばスノーマウンテン因子 (Snow Mountain agent, SMA), サザンプトンウイルス (Southampton virus, SAV), メキシコウイルス (Mexico virus, MXV), ハワイ因子 (Hawaii agent, HWA), トロントウイルス (Toronto virus, TRV), わが国でも音更 (おとふけ) 因子, サッポロウイルス (Sapporo virus, SPV), チバウイルス (Chiba virus, CBV) などと命名されてきた⁹⁻¹⁶⁾. こうした命名法にならざるを得なかったのは, 物理化学的あるいは免疫学的に性状を比較し HuCV が持つ共通の特徴を抽出してウイルス名とするほどウイルス粒子が得られなかったためであろう. HuCV はいまだに増殖を可能にさせる手段はなく, ヒトが実質的には唯一の感受性動物である¹⁷⁾. 後で述べるように HuCV の遺伝子構造が明らかになり, それに基づく分類法が可能になるにつれて, 個々の株の命名もより詳細かつ具体的に特定できるようになってきた. 表1に HuCV の特徴を示した.



図1 精製濃縮した Genogroup I HuCV の電子顕微鏡像

生カキを食べた後、ウイルス性急性胃腸炎をおこした患者の糞便を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で分画し、およそ比重 $1.40\text{g}/\text{cm}^3$ 付近を電子顕微鏡で観察した。ウイルス粒子の直径は 38nm である。粒子の内部に 7.7kb のプラス一本鎖RNAがたたみこまれている。全体に白い粒子が完全粒子、内部が黒くみえる粒子はRNAが抜け落ちた中空粒子である。図4にあるChiba virusで撮られた像である。

表1 HuCVの特徴

1. 非細菌性急性胃腸炎患者糞便からしばしば検出される。
2. 血清学的に異なるHuCVが多く存在するが、形態学的に区別出来ない。
3. 増殖のための培養細胞系も実験動物系もない。ヒトが唯一の感受性動物である。
4. ウイルス粒子は塩化セシウム勾配遠心法で $1.33\sim 1.41\text{g}/\text{cm}^3$ の密度をもつ。
5. ウイルス粒子の直径は 38nm である。約 $7.5\sim 7.8\text{kb}$ のプラス一本鎖RNAを遺伝子にもつ。

遺伝子構造

HuCVは、プラス一本鎖RNA分子をゲノムとして持ち、その周りを180分子の構造蛋白(capsid)が規則的に集合して正二十面体構造のウイルス粒子を形成している¹⁸⁾。このウイル

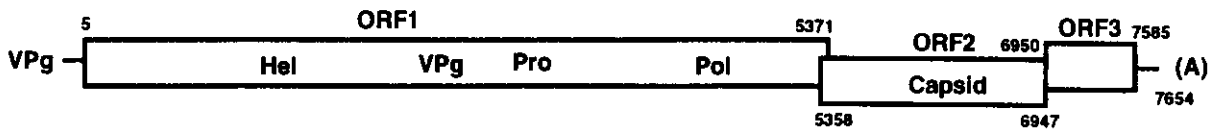
スは脂質二重膜から成るenvelopeを持たない。1993年、ヒトカリシウイルスに属するNorwalk virus、および、Southampton virus 遺伝子の全塩基配列が決定された^{19,19)}。その後、1995年にLordsdale virusとManchester virusが、1998年にBS5株、1999年に入ってCamberwell virusの全塩基配列が決定されデータベースに登録された^{20,21)} (Accession No. X86560, No. AF145896)。また、最近、我々もChiba virusの全塩基配列を決定した(未発表データ)。これにより、HuCVのゲノムが明らかにされたのは全部で7例となる。表2には全塩基配列が決定されたウイルスの全塩基数、および、コードされるタンパク質のアミノ酸残基数が示されている。Manchester virusのゲノムの長さがおおよそ 7.4k であるのを除いて、そのほかのウイルスのゲノムは 7.6k から 7.7k の長さである。いずれのウイルスも、Helicase,

表2 全塩基配列が決定されたヒトカリシウイルス

Genogroup	ウイルスの名称	アクセスナンバー	全塩基数 ¹⁾	推定アミノ酸残基数		
				ORF1	ORF2	ORF3
I	Norwalk	M87661	7654	1789	530	209
	Southampton	L07418	7708	1788	546	211
	BS5	AF093797	7598	1784	540	209
	Chiba	AB022679 および D38547 ²⁾	7698	1785	544	208
	Jena ³⁾	AJ011099	7338	1680	519	223
II	Lordsdale	X86557	7555	1699	539	268
	Camberwell	AF145896	7555	1699	539	268
III	Manchester	X86560	7431	2280 ⁴⁾		165

- 1) polyA を除く。
- 2) ORF2, ORF3をコードする領域と3' 非翻訳領域が登録されている。
- 3) ヒトカリシウイルス G I に近縁のウシカリシウイルス。
- 4) Manchester virus の capsid は ORF1 とともにひとつのポリペプチドとして翻訳され, protease により消化される。

“Norwalk-like viruses”



“Sapporo-like viruses”

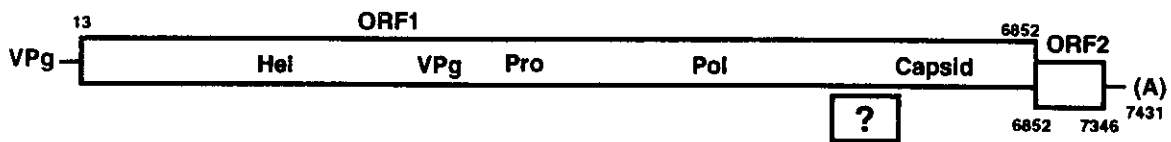


図2 HuCV の遺伝子構造

HuCV は7.7kb のプラス一本鎖 RNA を遺伝子にもつ、カリシウイルス科に属するウイルスである。Genogroup I と II を構成する Norwalk-like viruses は3つのORF (open reading frame, 読み取り枠) をもつ。一方、Genogroup III を構成する Sapporo-like viruses では構造蛋白がORF1の直後に同じ読み取り枠でつながっている。この図では、Norwalk-like viruses のORF3に相当するORFをSapporo-like viruses ではORF2と示してある。Manchester virus には更にひとつのORFが存在するとも言われているが(図中に?で示されている)、真偽は明らかでない。

VPg, Protease, RNA polymerase を含む Polyprotein をコードするORF1, Capsid をコードするORF2, 機能未知のタンパク質をコードするORF3と3つのORFを持っているが、Manchester virus では、ORF1 と ORF2 が

in-frame で融合し、ひとつのポリペプチドとして翻訳されるという特徴を持っている(図2)。また、Manchester virus には更にひとつのORFが存在するとも言われているが(図2中に?で示されている)、真偽は明らかでない。

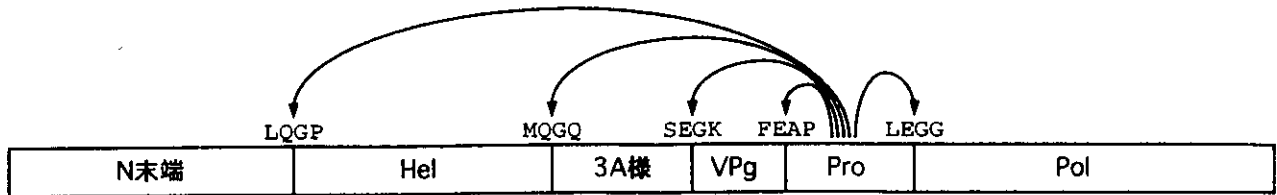


図3 プロテアーゼによる ORF1 polyprotein の Processing

Southampton virus で示された ORF1 の切断部位のアミノ酸配列を示した。切断部位の両わきの配列は Genogroup I および II でよく保存されている。ここでは Chiba virus のものを示した。

ORF1 polyprotein は、その内部にある Protease 活性により特定の部位で消化され、N 末端領域、Helicase、3A 様領域、VPg、Protease、RNA 依存 RNA polymerase とに切断されることが、Southampton virus 遺伝子の大腸菌での発現系を用いた実験から示唆されている^{22,23)} (図3)。Manchester virus では更に一カ所切断部位があり、Capsid が生成されることになる。Protease による消化部位付近のアミノ酸配列はよく保存されており、ほとんどの場合、Gln-Gly、Glu-Gly、Glu-Ala の間で切断される。Helicase はウイルス RNA の複製時に機能すると考えられる。そのアミノ酸配列中にはヌクレオチド結合蛋白に頻繁に見いだされるモチーフ (一般に、GXXXXGKT (/S) と表される) が存在し、GXPGIGKT としてきわめてよく保存されている。このモチーフの存在により、Helicase 活性の発現にはヌクレオチド三リン酸の加水分解により生じるエネルギーが必要であることが容易に推測できる。VPg は Picornaviridae に属する Poliovirus で示されているように、ウイルスゲノム RNA の 5' 末端に共有結合していると推測される。Poliovirus では RNA 複製に関与することが示唆されているが、HuCV の VPg は Poliovirus のものよりも分子量がかなり大きく、相同のアミノ酸配列もないなど相違点があり、HuCV での機能は明らかでない。Protease は Cys 残基を活性中心に持つシステインプロテアーゼの一種である。活性中心 Cys 残基を含むモチーフ、GDCG は非常によく保存されている。そのほか、保存性 Glu 残基、His 残基も存在し、酵素活性への関与が示唆される。RNA 依存 RNA polymerase には、酵素活性に重要とされる GLPSG モチーフ、YGDD モチーフが保存されている。また、小胞

体内腔へのターゲッティングシグナルである KDEL モチーフも保存されている。これにより、細胞質で合成された RNA 依存 RNA polymerase がゴルジ膜上に存在する KDEL 受容体との相互作用を介して小胞体内に輸送されることが示唆されるが、ウイルスの生活環においてどのような意味があるのかは明らかでない。ORF2 の翻訳産物である Capsid は、ウイルスゲノム RNA を包む殻であり、構造蛋白とも呼ばれる。初めにも記したように、ウイルス粒子は、この Capsid が規則正しく集合、配置することで正二十面体構造をとっている。Manchester virus が属するウイルスと Norwalk virus が属するウイルスとの間でアミノ酸配列を比較すると、N 末側半分では低いながらも顕著な相同性がみられるのに対し、カルボキシ末側半分ではほとんど相同性が認められない。これがウイルス粒子の電子顕微鏡像にみられる差異の原因になっているのかもしれない。ORF3 産物は、N 末端のすぐあとにおよそ 20 残基から成る疎水性領域があり、それに続いて塩基性アミノ酸残基に富む親水性領域となる。この性状はアミノ酸配列の相同性は低いものの、HuCV のウイルスに共通している。現時点でこのタンパク質の機能は未知である。ウイルス粒子の電子顕微鏡像に Capsid 以外のタンパク質と思われるものが存在すると言われており、それが ORF3 産物ではないかと考えられている。このタンパク質が塩基性残基に富んでいることを考えあわせると、ORF3 産物はウイルス粒子内部にあって、ゲノム RNA 分子と結合している可能性が高い。

4. 遺伝学的多様性

全塩基配列が決定されたウイルスに加えて、

1999年5月の時点で、150を越えるウイルスゲノムの一部の塩基配列が決定され、登録されている。ヒトカリシウイルスの分子多様性を如実に示すもので、その数は今後更に増加すると予想される。部分配列が決定されている種々のウイルスの情報をもとに、現在、ヒトカリシウイルスは主としてRNA polymerase 領域の塩基配列を比較することにより、3つの遺伝子型に分類されている^{3,30)}。Genogroup I (G I) は以前、狭義の意味で、Norwalk-like virus ともよばれ、このなかにはプロトタイプの Norwalk virus (NWV) をはじめ、Southampton virus (SAV)、BS5株 (SB5)、Chiba virus (CBV) 等が含まれる。Genogroup II (G II) は以前、Snow Mountain-like virus ともいわれたもので、Snow Mountain agent (SMA)、Lordsdale virus (LDV)、Camberwell virus (CWV)、Mexico virus (MXV) 等がメンバーである。残る一つは Genogroup III (G III) あるいは classical human calicivirus とも呼ばれ、Sapporo virus (SPV)、Manchester virus (MAV)、Parkville virus (PVV) 等が含まれる。図4に capsid 全領域の塩基配列を基に作成した系統樹を示した。

そもそも電子顕微鏡下に観察されたウイルス粒子の形態学的な差異から、典型的な“Star of David”とよばれる像を示す G III は G I、G II と区別されてきた^{21,25,26)}。命名も G III は「(狭義の)ヒトカリシウイルス」、G I と G II が「SRSV」と呼ばれてきたように思う。G I と G II を指すのに英国とわが国の研究者では「SRSV」が、米国では「Norwalk-like virus」(前述の Norwalk-like virus より広い意味で用いられ G I、G II を含む) が好んで用いられ多少の混乱が生じてきているように思われる。おそらくこうした背景と、遺伝子解析から明らかになった遺伝子構造の差異を踏まえ、第7回ウイルス国際命名委員会で審議を経て新しい分類法が近々発表される予定である。上記 G I と G II は統合されてひとつの属に(一時的に Genus “Norwalk-like viruses” が当てられている)、G III も独立した属に(一時的に Genus “Sapporo-like viruses” が当てられている)分類されるようである^{3,37)}。株の命名法もインフルエンザのそれに倣い、種/属/株名/分離年/分離地、

例えば NWV では Hu/NLV/NV/1968/US のような記述法が提唱されるはずである。HuCV は G I、G II および G III に含まれる全てのヒト由来カリシウイルスを統一的に示す名称といえる。

それぞれの塩基配列を比較してみると、当然ながら同一グループ内で最も同一性が高く、70%前後あるいはそれ以上にもなる。G I と G II の間で50%前後、G I と G III、G II と G III の間では45%程度となる。一方、アミノ酸配列を比較してみると、同一グループ内で、70%以上の同一性が認められる。G I と G II の間では、ORF1 および ORF2 に関しては50%前後と比較的高い同一性がみられるが、ORF3 に関しては、部分的にしか相同性が認められない。また、G I と G III、G II と G III の比較では、ORF1 に関しては全体を通して相同であるが、アミノ酸の同一性は20%程度である。ORF2 および ORF3 では、同一性は更に低い。以上のように、G I と G II とは比較的近い関係にあるが、G III とは大きな隔たりがあるといえる。動物のカリシウイルスゲノムも加えて比較してみると、G III はヒトカリシウイルスでありながら、むしろ動物カリシウイルスに近い一群である。その一方で、最近全塩基配列が決定されたウシの Jena virus のようにヒトカリシウイルスに近縁関係にあるとされる動物カリシウイルスも存在する³⁸⁾。これは塩基配列、アミノ酸配列の相同性から、G I に属するとされている。しかし、グループ内の他のウイルスとの同一性は若干低く、塩基配列は50%程度である。アミノ酸配列では、ORF2 および ORF3 で50%程度であるが、ORF1 では約60%と比較的高い。また、全塩基数や各 ORF のアミノ酸残基数も他のウイルスに近い。G II、G III、他の動物カリシウイルスとの比較でも、Jena virus が遺伝学的にヒトカリシウイルス G I に近い関係にあることがわかる。

5. 血清学的多様性

前述のように、ある流行で HuCV が検出されたとき、その流行がおこった地名を株名として用いてきた。米国において1970年代の初期には NWV、HWA、Montgomery County virus (MCV)、SMA、Taunton virus (TAV) 等のウイルスがみつかり、それぞれの患

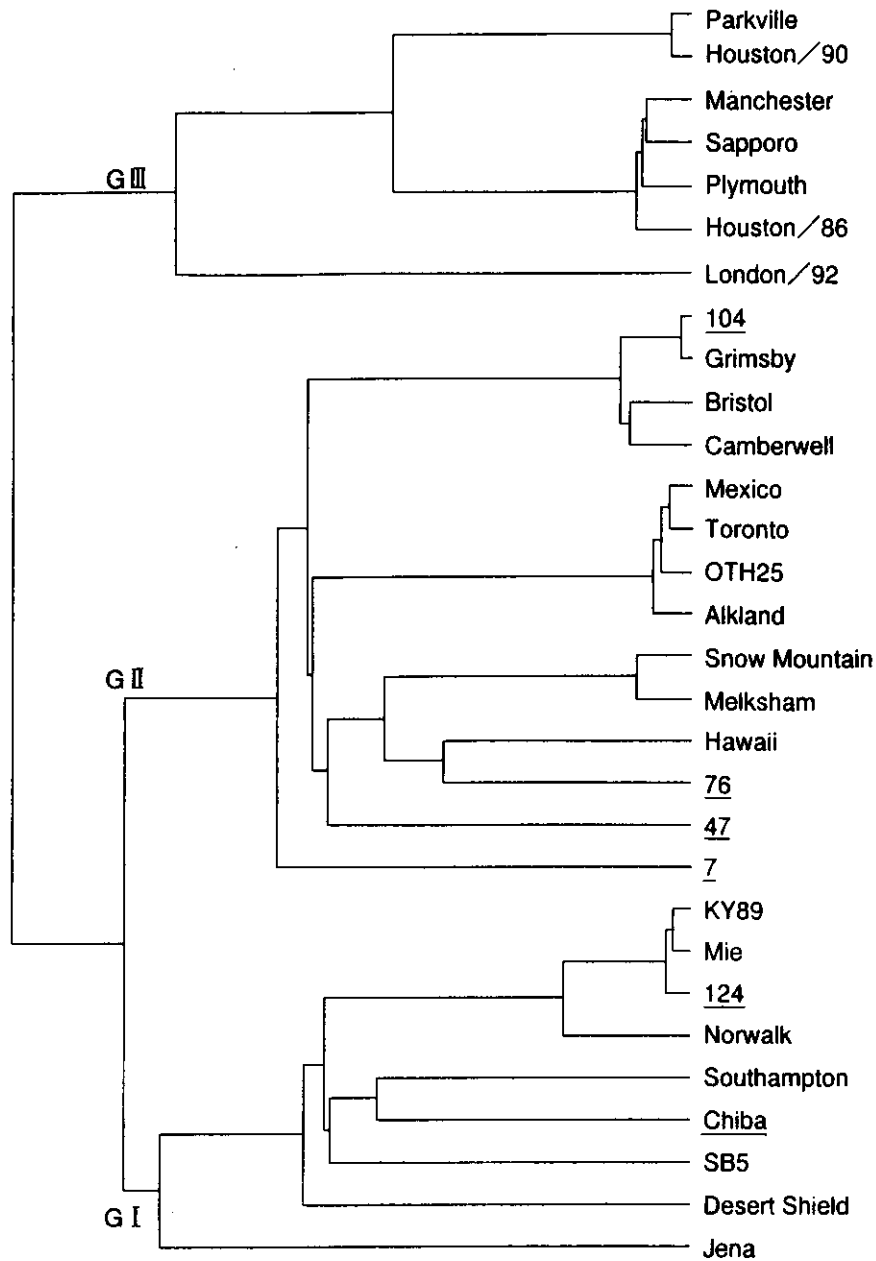


図4 HuCVの構造蛋白全領域に基づく系統樹

GCGのPileupプログラムで作成した。各株は一般的に用いられている名称で示してある。アンダーラインで示した株は現在我々が解析中の株で、まだデータベースには登録されていない。

者の回復期血清による免疫電子顕微鏡法 (Immune electron microscopy, IEM あるいは Solid-phase immune electron microscopy, SPIEM) でこれらのウイルスが血清学的に異なるウイルスであることも明らかになってい

た^{29,30}。また、ボランティアによる cross-challenge* の研究から、NWVとHWVが抗原的に異なっていること、NWVとMCVは血清学的に類似のウイルスであることが示され¹²⁾、NWV、HWV、SMA、TAVをそれぞれ Serotype 1~4

*注 Cross-challenge は一般にボランティアを使った中和交差試験を意味する。始めにボランティアを三つのグループに分けてそれぞれにNWV、HWV、MCVを経口投与した。臨床経過などを観察し、発症したヒトが完全に回復した後にこれらのウイルスをいろいろな組み合わせで再度経口投与 (challenge するという) して感染、発症の有無を調べた。3×3、合計9種類の組み合わせで交差反応 (cross という) をみる事が出来たわけである。血清学的に同一のウイルスであれば、最初の経口投与の結果産生される抗体によって中和されて発症がおさえられるが、異種のウイルスであれば再度感染して発症に至る。

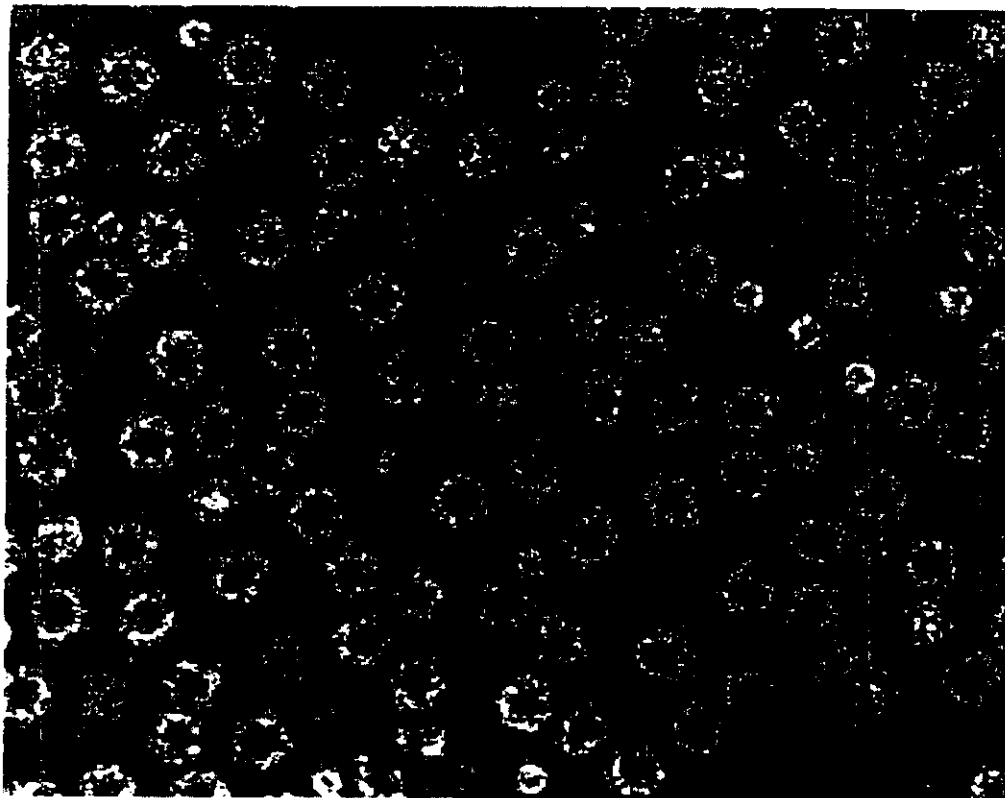


図5 組換えバキュロウイルスで発現した HuCV 中空粒子
直径は native な粒子と同じ38nm である。血清反応の抗原、高力価血清作製のための免疫原として無限に産生することができる。これは組換え Chiba virus である。

のプロトタイプとする報告もなされた¹⁰⁾。英国においても同様に SRSV UK1~4の株が得られていて、SRSV UK1は TAV と、SRSV UK2は NWV と、SRSV UK3は HWV と、SRSV UK4は SMA と同じ血清型であることも示された¹¹⁾。わが国においても少なくとも9種類の血清型 (SRSV Japan 1~9) があり¹²⁾、このうちの SRSV Japan 9が SMA に似ているとする報告がある¹³⁾。Lewis らは1987年から1992年に米国で発生した10の流行を解析して6種類の抗原性があることを示している³⁶⁾。IEM あるいは PSiem は血清型特異的である。一方、ボランティアの回復期血清を用いた ELISA 法では、HWV と SMA の間では one-way cross**が、NWV と SMA の組み合わせでは two-way cross***が検出され

明確な特異性を示すにはいたらなかった¹⁴⁾。

HuCV を血清学的に区別することが困難である最大の理由はこのウイルスを *in vitro* で培養する系がいまだになく、血清反応の抗原が確保できないことであった。しかし、近年 HuCV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現して形態的にも免疫学的にもネイティブな HuCV と区別出来ないウイルス様中空粒子 (Virus-like particles, VLPs) が産生できるようになった (図5)。また、VLPs を抗原として免疫血清を作製し、ELISA 法によって抗原性の差異を明らかにしようとする報告もではじめている^{20,35-38)}。我々も GI に属する3株、G II に属する6株、計9株の血清学的に異なる中空粒子を作出した^{39,40)}。これを用いた特異抗体

**注 SMA を経口投与されたボランティアの投与前と回復期の血清中を抗体を EIA で調べたところ、SMA に対しては当然上昇していたが、血清型が異なる HWV に対しては上昇を示した人は全くいなかった。しかしながら、逆に HWV を経口投与されたボランティアで調べたら、血清型が異なる SMA に対しても40%の人で抗体上昇がみられた。つまり、一方方向にだけ (one-way) 交差反応 (cross) がみられた。

***注 SMA を経口投与されたボランティアの投与前と回復期の血清中の抗体を EIA で調べたところ、SMA に対しては勿論のこと、血清型が異なる HWV に対しても50%の人で抗体上昇がみられた。同様に、HWV を経口投与されたボランティアで調べたら、SMA に対しても62%の人に抗体上昇がみられた。つまり、相互に (two-way) 交差反応 (cross) がみられた。

検出 ELISA を構築し、懸案事項であった各株間の交差反応性を慎重に試験つつ血清疫学や血清診断への応用を試みている。この粒子でウサギを免疫して高度免疫血清を得て HuCV 抗原検出 ELISA も構築され、来シーズンに向け評価がいろいろな方面で進行中である。現時点では電子顕微鏡での検出感度と同程度であるから使用が便材料の限られる、血清型特異性が高く多種類の血清型を持つ HuCV の検出にはさらに5～6種類の中空粒子抗原を準備しなければならない等課題は多いが、多数の検体のスクリーニングに有利である ELISA 法のメリットは大きい。今後電子顕微鏡法に替わる方法として期待されている。

6. おわりに

プロトタイプとして有名な NWV は1968年の流行の際に分離されたウイルスであるが、その全塩基配列が決定されたのは25年後の1993年であった。現在においても HuCV の培養細胞系は確立されていない。実験動物もない。つまり、ウイルス粒子を人工的に増殖させることができない。従って、ウイルスの供給はヒトの糞便に頼らざるを得ず、わが国では多くの場合、限られた量のウイルスしか入手することができない。これはウイルスの全ゲノムの解読に、ひいては、ウイルスの感染から複製、増殖に至る過程をたどる分子生物学的研究、個々の酵素の生化学的、酵素学的研究の進展に大きな障壁となっている。

HuCV 研究初期の米国のボランティアによる感染実験は、下痢の病理、臨床経過、臨床症状、免疫応答、抗原性の解析等 HuCV 研究において計りしれない役割を果たしてきた。しかしながら、HuCV の複製機構をはじめ、in vitro で増殖可能なウイルスでなされたような研究はいまだに手付かずの状態にある。宿主細胞におけるウイルスレセプターとなるものは何なのか、ウイルスはどのようにして細胞内に取り込まれるのか、ウイルス RNA は細胞内でどのように露出されるのか、ゲノム RNA はどのように複製されるのか、ORF1 polyprotein はどのように翻訳され、Protease による消化を受けるのか、subgenomic RNA はどのような機構で転写され

るのか、ORF2やORF3はどのように翻訳されるのか、ORF3が果たしている機能はなにか、どこでどのようにしてウイルス粒子が再生されるのか、など解明すべき課題は多い。ヒトカリシウイルスは興味深い研究対象といえる。

文 献

- 1) Kapikian AZ : Norwalk and Norwalk-like viruses. *In* Viral infections of the gastrointestinal tract. ed. Kapikian AZ. New York, Marcel Dekker, Inc., 1994, pp. 471-518
- 2) Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM : Norwalk group of viruses. *In* Fields Virology, Third Edition, vol 1, eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B and Straus SE. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996, pp. 783-810
- 3) Estes MK, Atmar RL, Hardy ME : Norwalk and related diarrhea viruses. *In* Clinical Virology, eds. Richmann DD, Whitley RJ and Hayden FG New York, Churchill Livingstone Inc., 1997, pp. 1073-1095
- 4) 食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査研究班 (1995) 最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査総合報告書。
- 5) 病原微生物検出情報：〈特集〉小児のウイルス性胃腸炎, 1993-1998. 病原微生物検出情報(月報) 19(11): 248-254, 1998
- 6) Cubitt WD, Bradley D, Carter M, Chiba S, Estes MK, Saif L, Schaffer FL, Smith AW, Studdert MJ, Thiel HJ : Voral taxonomy. Classification and nomenclature : sixth report of international committee on the taxonomy of viruses. *Arch Virol, Suppl.* 10 : 359-363, 1995
- 7) Adler JL, Zickl R : Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 119 : 668-673, 1969
- 8) Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Hornick R, Chanock RM : Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 123 : 307-312, 1971
- 9) Morens DM, Zweighaft RM, Vernon TM, Gary GW, Eslien JJ, Wood BT, Holman RC, Dolin R :

- A waterborne outbreak of gastroenteritis with secondary person-to-person spread. Association with a viral agent. *Lancet* i : 964-966, 1979
- 10) Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN : Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259 : 516-519, 1993
 - 11) Jiang X, Matson DO, Velazquez FR, Calva JJ, Zhong WM, Hu J, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK : Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *J Med Virol* 47 : 386-391, 1995
 - 12) Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, Chanock RM : Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 129 : 709-714, 1974
 - 13) Middleton PJ, Szymanski MT, Petric M : Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Am J Dis Child* 131 : 733-737, 1977
 - 14) Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T : Virus-like particle, 35 to 40 nm, associated with an institutional outbreak of acute gastroenteritis in adults. *J Clin Microbiol* 10 : 730-736, 1979
 - 15) Nakata S, Chiba S, Terashima H, Yokoyama T, Nakao T : Humoral immunity in infants with gastroenteritis caused by human calicivirus. *J Infect Dis* 152 : 274-279, 1985
 - 16) Kasuga K, Tokieda M, Ohtawara M, Utagawa E, Yamazaki S : Small round structured virus associated with an outbreak of acute gastroenteritis in Chiba, Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 43 : 111-121, 1990
 - 17) Wyatt RG, Greenberg HB, Dalgard DW, Allen WP, Sly DL, Thornhill TS, Chanock RM, Kapikian AZ : Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis. *J Med Virol* 2 : 89-96, 1978
 - 18) Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK : Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 68 : 5117-5125, 1994
 - 19) Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK : Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195 : 51-61, 1993
 - 20) Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN : Human enteric Caliciviridae : the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76 : 2349-2355, 1995
 - 21) Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lambden PR : Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 140 : 1345-1356, 1995
 - 22) Liu B, Clarke IN, Lambden PR : Polyprotein processing in Southampton virus : identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70 : 2605-2610, 1996
 - 23) Liu BL, Viljoen GJ, Clarke IN, Lambden PR : Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* 80 : 291-296, 1999
 - 24) Matson DO, Zhong WM, Nakata S, Numata K, Jiang X, Pickering LK, Chiba S, Estes MK : Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol* 45 : 215-222, 1995
 - 25) Herrmann JE, Blacklow NR : Gastroenteritis Viruses. *In* Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections, Seventh Edition. eds. Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET Washington, DC., American Public Health Association, 1995, pp. 313-326
 - 26) Numata K, Hardy ME, Nakata S, Chiba S, Estes MK : Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch Virol* 142 : 1537-1552, 1997
 - 27) Pringle CR : Virus taxonomy-San Diego 1998. *Arch Virol* 143 : 1449-1459, 1998
 - 28) Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN : Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus

- : relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73 : 819-825, 1999
- 29) Lewis DC, Lightfoot NF, Pether JV : Solid-phase immune electron microscopy with human immunoglobulin M for serotyping of Norwalk-like viruses. *J Clin Microbiol* 26 : 938-942, 1988
- 30) Lewis DC : Three serotypes of Norwalk-like virus demonstrated by solid-phase immune electron microscopy. *J Med Virol* 30 : 77-81, 1990
- 31) Lewis D : Norwalk agent and other small-round structured viruses in the U.K. *J Infect* 23 : 220-222, 1991
- 32) Okada S, Sekine S, Ando T, Hayashi Y, Murao M, Yabuuchi K, Miki T, Ohashi M : Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 28 : 1244-1248, 1990
- 33) Lewis D, Ando T, Humphrey CD, Monroe SS, Glass RI : Use of solid-phase immune electron microscopy for classification of Norwalk-like viruses into six antigenic groups from 10 outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Clin Microbiol* 33 : 501-504, 1995
- 34) Madore HP, Treanor JJ, Buja R, Dolin R : Antigenic relatedness among the Norwalk-like agents by serum antibody rises. *J Med Virol* 32 : 96-101, 1990
- 35) Green KY, Kapikian AZ, Valdesuso J, Sosnovtsev S, Treanor JJ, Lew JF : Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. *J Clin Microbiol* 35 : 1909-1914, 1997
- 36) Leite JP, Ando T, Noel JS, Jiang B, Humphrey CD, Lew JF, Green KY, Glass RI, Monroe SS : Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* 141 : 865-875, 1996
- 37) Lew JF, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY : Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* 200 : 319-325, 1994
- 38) Hale AD, Crawford SE, Ciarlet M, Green J, Gallimore C, Brown DW, Jiang X, Estes MK : Expression and self-assembly of Grimsby virus : antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 : 142-145, 1999
- 39) 名取 克郎, 武田直和, 小林慎一, 柴 賢司, 篠崎邦子, 宮村達男 : 小型球形ウイルスの組換え中空粒子の作製と血清学的解析への応用. 第42回日本ウイルス学会総会, 1998, 東京
- 40) Takeda N. et al. 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases, 1998, Kyoto

Recombinant Subunit ORF2.1 Antigen and Induction of Antibody Against Immunodominant Epitopes in the Hepatitis E Virus Capsid Protein

Fan Li,^{1,2} Michaela A. Riddell,^{1,2} Heng-Fong Seow,^{1,3} Naokazu Takeda,⁴ Tatsuo Miyamura,⁴ and David A. Anderson^{1,2*}

¹Hepatitis Research Unit, Macfarlane Burnet Centre for Medical Research, Fairfield, Australia

²Australian Centre for Hepatitis Virology, Melbourne, Australia

³Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Science, University Putra, Selangor, Malaysia

⁴Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

A recombinant subunit antigen (ORF2.1), representing the carboxy-terminal 267 amino acids of the 660-amino-acid hepatitis E virus (HEV) capsid protein, was expressed in *Escherichia coli* and used for the immunisation of rats. Purified antigen formulated with either Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant (Alum) or Titermax gave high and equivalent levels of antibody after three doses. Responses to two doses of 15, 75, or 150 µg antigen, formulated with Alum and given at 0 and 4 weeks, were also equivalent by 17 weeks after immunisation. Rats initially developed antibody to a wide range of linear epitopes in the ORF2.1 region, but by 27 weeks the predominant response detected by Western immunoblotting was restricted to the conformational epitope unique to ORF2.1 [Li et al. (1997) *Journal of Medical Virology* 52:289-300], a pattern that was also observed when comparing acute-phase patient serum samples with serum samples from convalescing patients. Antibody from immunised rats blocked the majority of patients' serum reactivity in enzyme-linked immunosorbent assay against both ORF2.1 (57-92% inhibition) and virus-like particles of HEV produced using the baculovirus system (74-97% inhibition). Together, these results suggest that the ORF2.1 subunit vaccine induces an antibody response against immunodominant, conformational epitopes in the viral capsid, which largely mimics that seen in convalescent patients, who are presumed to be immune to HEV infection. *J. Med. Virol.* 60:379-386, 2000.

© 2000 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: hepatitis E virus; subunit vaccine; convalescent reactivity; immunodominant epitopes

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded, positive sense RNA virus responsible for epidemic and sporadic cases of hepatitis E, mainly in developing countries (see Bradley [1995] for review). Sporadic cases of hepatitis E also have been reported in some developed countries [Heath et al., 1995; Kwo et al., 1997], where at least some cases [Schlauder et al., 1998] may represent infection with zoonotic strains of HEV, such as the newly described swine HEV [Meng et al., 1997]. HEV is transmitted by the faecal-oral route, and large epidemics are usually caused by contamination of water. The mortality rate may exceed 21% during pregnancy [Kane et al., 1984], though it is low in the general population.

The HEV genome contains three open reading frames (ORFs), with ORF2 encoding the putative major structural or capsid protein PORF2. The cloning of geographically distinct strains of HEV [Reyes et al., 1990; Huang et al., 1992] and expression of recombinant HEV proteins have led to the development of serologic assays for the detection of HEV infection [Yarborough et al., 1991; Dawson et al., 1992; Goldsmith et al., 1992; Khudyakov et al., 1993; Tsarev et al., 1993; Khudyakov et al., 1994b; He et al., 1995; Li et al., 1997b; Anderson et al., 1999; Li et al., unpublished observations]. However, there is currently no licensed hepatitis E vaccine, and although it is clear from passive immunisation that antibody to ORF2 is sufficient to confer immunity [Tsarev et al., 1994], we have a poor understanding of

Grant sponsor: National Health and Medical Research Council of Australia; Grant number: 950876; Grant sponsor: Research Fund of the Macfarlane Burnet Centre for Medical Research.

*Correspondence to: Dr. David Anderson, Hepatitis Research Unit, Macfarlane Burnet Centre for Medical Research, P.O. Box 254, Fairfield 3078, Melbourne, Victoria, Australia. E-mail: anderson@burnet.edu.au

Accepted 9 September 1999

the antigenic structure of the virus and the immune responses important in conferring immunity.

Animal models of hepatitis E infection in nonhuman primate species appear to mirror the pattern of infection, pathologic characteristics, and immune responses seen in human beings [Kane et al., 1984; Bradley et al., 1987]. Swine also have been shown to be susceptible to experimental infection with human HEV strains [Balayan et al., 1990; Meng et al., 1998c], though it appears that some other human HEV strains may be restricted in their host range [Meng et al., 1998b]. Two groups have reported experimental infection of laboratory rats with HEV [Karetnyi et al., 1993; Maneerat et al., 1996], which may provide a more convenient, small-animal model for studies of HEV infection.

Primate models of HEV infection have shown at least partial protective efficacy of experimental vaccines, such as the trpE-C2 fusion protein, representing the carboxy-terminal two-thirds of HEV ORF2 expressed in *Escherichia coli* [Purdy et al., 1993]. Subsequently, immunisation with subviral particles (SVPs) of HEV expressed using the baculovirus system has conferred protection against disease caused by both homologous and heterologous HEV strains in macaques [Tsarev et al., 1994; Fuerst et al., 1996; Tsarev et al., 1997]. Such SVPs, representing amino acids (aa) 112-660 of the capsid protein or with variable C-terminal truncations, are generally thought to mimic the native antigenic structure of the HEV particle [Tsarev et al., 1993; He et al., 1995; McAtee et al., 1996; Li et al., 1997b; Robinson et al., 1998].

Active immunisation against HEV therefore seems feasible, but the relationships between antibody reactivity and immunity to HEV infection are still poorly understood. For example, we do not know whether the antibodies detected by available HEV antibody assays are relevant to the protective immune response. Moreover, there is evidence that at least some antibody specificities may not be cross-protective (in the case of trpE-C2) [Purdy et al., 1993] or may have no neutralising activity at all (in the case of the mosaic HEV protein, consisting of multiple linear epitopes) [Meng et al., 1998a]. The specificity of HEV antibody induced upon immunisation with experimental vaccines is therefore likely to be of greater importance than the total amount of antibody.

In this context, we have sought to identify recombinant antigens that are highly reactive with convalescent-phase sera and conserved between HEV strains, reasoning that such antibodies may be associated with humoral immunity to infection. The results of our previous studies suggest that the carboxy-terminal 267 aa of ORF2 (ORF2.1) contain a conserved, conformational epitope that is strongly reactive with convalescent-phase sera [Li et al., 1994; Li et al., 1997a; Anderson et al., 1999], but it was not clear whether this reactivity represented a major part of the total humoral immune response to the virus. In this study, we examined the antibody specificities induced in rats after immunisation with ORF2.1 antigen produced in *E. coli*, including

competitive assays with patients' serum samples. Our results suggest that ORF2.1 can induce a high-titre antibody response to immunodominant epitopes in the HEV capsid (represented by baculovirus-expressed viruslike particles [VLPs]) mimicking that seen in serum samples from convalescent patients. The ORF2.1 antigen therefore represents a promising candidate hepatitis E vaccine.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Recombinant ORF2.1 Antigen

Construction of pQE-AC2.1 Plasmid for Expression. Recombinant ORF2.1 antigen was produced as an insoluble fusion protein with glutathione-S-transferase (GST) from the plasmid pGEX-AC2.1 [Li et al., 1994; Li et al., 1997a]. To facilitate the high degree of purification required for a vaccine, the ORF2.1 fragment was subcloned in the vector pQE-30 (Novagen, Madison, WI) to produce a fusion protein with an N-terminal hexahistidine tag. pGEX-AC2.1 was first digested with *EcoRI*, and then the AC2.1 fragment (encoding ORF2.1) was cloned into vector pET-30a(+) (Novagen). The AC2.1 fragment was released from the pET-30a(+) plasmid by digestion with *BamHI* and *SalI* and ligated with pQE-30 vector. The resulting pQE-30 plasmid containing AC2.1 was designated pQE-AC2.1. The construction and screening of these clones, as well as examination of fusion protein expression (QE2.1), were performed using methods described previously [Li et al., 1994; Li et al., 1997a].

Production and Purification of QE2.1 Protein. *E. coli* strain JM109, transformed with pQE-AC2.1, was cultured in LB medium containing 100 µg of ampicillin per milliliter for 3–5 hr at 37°C. Isopropylthio-β-D-galactoside was added to a final concentration of 0.5 mmol/L, and the culture was grown for another 5 hr. Cells were pelleted at 3,500 rpm for 15 min in a JA-20 rotor (Beckman Instruments, Fullerton, CA). For cells from each litre of culture, 50 ml of lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl at pH 8.0, 100 mmol/L NaCl) was added, and the pellet was gently resuspended. The suspension was then sonicated in three 10-second bursts and centrifuged at 15,000 rpm for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in 60 ml of lysis buffer containing 8 mol/L urea and incubated at 4°C for 30 min, followed by centrifugation for 30 min as before. The supernatant containing soluble QE2.1 in urea was collected for further purification.

TALON Metal Affinity Resin (Clontech Inc., Palo Alto, CA) was used for purification of QE2.1 in a ratio of 1 ml of resin for 500 ml of culture. The resin was equilibrated with five bed-volumes of lysis buffer containing 8 mol/L urea before the sample was added. The resin/sample suspension was gently agitated at room temperature for 20 min to allow protein to bind to resin and then centrifuged at 500 rpm in a bench-top microcentrifuge (Beckman CS-6) for 5 min. The supernatant was removed, and the resin was washed three times with 10 volumes of lysis buffer containing 8 mol/L urea. The resin was then transferred to a column and

washed twice with 3 volumes of wash buffer (lysis buffer containing 8 mol/L urea and 5 mmol/L imidazole). The purified protein was eluted by adding 4 volumes of elution buffer (lysis buffer containing 8 mol/L urea and 50 mmol/L imidazole). The fractions collected were examined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The peak fractions were pooled and then refolded by dialysis in 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, at 4°C using a dialysis cassette (Pierce, Rockford, IL), with dialysis solution changed every 4 hr. The resulting sample was centrifuged for 15 min at 4°C, and the supernatant was collected. Where indicated, endotoxin was depleted using Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Pierce). The protein was quantitated by D_c Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, VA) and stored in aliquots at -70°C.

Immunisation of Rats

Wistar rats were 3 months old at the time of immunisation. Purified, refolded QE2.1 was used as a solution in phosphate-buffered saline (PBS) or mixed with Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant (Alum; Superfos Biosector, Denmark) in a ratio of 50 µg protein per 100 µl Alum and absorbed at 4°C overnight or mixed in a 1:1 ratio with Titermax (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) immediately before immunisation. Immunisations were administered via intramuscular injection of 0.1 ml at a single site. For comparison of adjuvants, three groups of three rats each were immunised via the intramuscular route at 0, 4, and 13 weeks with 50 µg per injection of purified QE2.1 (prepared without endotoxin depletion) in Alum, Titermax, or PBS. Another group of three rats received PBS alone as a negative control. Serum samples were collected from the tail vein every 2 weeks from 6 to 30 weeks and then at week 40 after primary immunisation. To determine the dose of recombinant antigen required to elicit maximal antibody titres, four groups of three rats each were immunised via the intramuscular route at 0 and 4 weeks with 1.5, 15, 75, or 150 µg of endotoxin-depleted QE2.1 absorbed onto Alum. Serum samples were collected every 2 weeks up to 10 weeks and then at weeks 13, 17, and 27 after primary immunisation.

Detection and Characterisation of IgG Anti-Hepatitis E Virus

Western Immunoblotting. Anti-HEV in rat or patient serum samples was detected by Western immunoblotting using GST-ORF2 fusion proteins representing different fragments of full-length ORF2, as described previously [Li et al., 1997a]. Briefly, equimolar amounts of each fusion protein were subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with rat or human sera (1:500 dilution). Immune complexes were detected with horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated sheep anti-rat IgG or rabbit anti-human IgG (Dako, Denmark) and enhanced chemiluminescence (ECL, UK).

GST-ORF2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Human and rat serum IgG anti-HEV was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant GST-ORF2.1 antigen, as described for human IgG [Anderson et al., 1999] but with replacement of secondary antibodies to avoid cross-reactivity between rat and human IgG in competitive assays. Briefly, serum dilutions (1:300 unless otherwise indicated) were incubated with GST-ORF2.1-coated microtitre plates for 50 min at room temperature and washed. Bound antibody was detected with a 1:6,000 dilution of HRPO-conjugated sheep anti-rat IgG (Amersham) or a 1:5,000 dilution of HRPO-conjugated sheep anti-human IgG (Amersham) and tetramethyl benzidine (TMB) substrate.

Baculovirus Viruslike Particle Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Human serum IgG anti-HEV was also determined by ELISA using purified VLPs of HEV (0.1 µg/well) produced using the baculovirus system, as previously described [Li et al., 1997b] but with substitution of secondary antibody, as mentioned earlier.

Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay. To determine whether the antibodies induced by QE2.1 in rats were reactive against a range of epitopes similar to those found in HEV patients, competitive ELISAs were performed with both GST-ORF2.1 and VLP-coated plates. Rat sera (1:100 final dilution of pooled or individual pre- or postimmunisation rat sera) and human sera (1:300 final dilution of acute or convalescent patients' sera) were added simultaneously into duplicate ELISA wells and processed as describe earlier for the detection of bound human IgG. The anti-human IgG was shown to have no cross-reactivity against rat IgG (results not shown). Serial twofold dilutions of international reference standard HEV serum 95/584 (100 IU per ml) (a gift from Morag Ferguson, National Institutes for Biological Standards and Control, UK) were assayed in triplicate wells on each plate, to construct a standard curve for the levels of bound human anti-HEV IgG, as described in detail elsewhere [Anderson et al., 1999]. The rate of inhibition was calculated using the quantitative antibody units of patients' samples when assayed in the presence of pre- and postimmunisation rat sera. Except where indicated, samples were assayed on two separate occasions.

RESULTS

Dynamics of Antibody Responses to QE2.1

Comparison of Adjuvants. To evaluate the immunogenicity of QE2.1, groups of three rats each were immunised with either soluble QE2.1 or QE2.1 formulated with either Alum (the only adjuvant licensed for human vaccines) or Titermax (a synthetic adjuvant that has efficacy similar to Freund's complete adjuvant) at 0, 4, and 13 weeks. Figure 1 shows the dynamics of antibody responses to QE2.1 as detected by ELISA with GST-ORF2.1 antigen. High levels of anti-

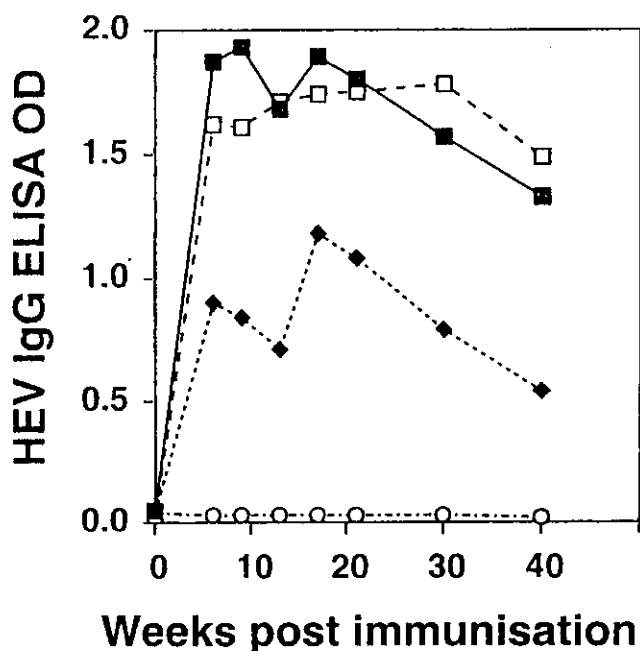


Fig. 1. Kinetics of antibody responses to QE2.1 with different adjuvants. Groups of three rats each were immunised at 0, 4, and 12 weeks with 50 μ g of QE2.1 with Alum (■—■), Titermax (□---□), or PBS (◆··◆) or with phosphate-buffered saline alone (○-○). Serum samples were tested for hepatitis B virus-specific IgG by GST-ORF2.1 enzyme-linked immunosorbent assay, and the mean optical density for each group of rats is shown for each sample time.

HEV were detectable in animals receiving QE2.1 with Alum or Titermax by 6 weeks (2 weeks after the first booster dose), whereas moderate levels of antibody were induced by QE2.1 alone. Levels of antibody were increased after the second booster at 12 weeks but subsequently declined in each group. Nevertheless, it is clear that high levels of anti-HEV were maintained up to 40 weeks after immunisation, which demonstrates that QE2.1 formulated with aluminium hydroxide as the adjuvant is able to induce a strong and lasting immune response.

Titration of Antigen Dose. To determine the optimal dose of QE2.1 for immunisation of rats, groups of three animals each were immunised with 1.5, 15, 75, or 150 μ g QE2.1 with Alum at 0 and 4 weeks, and serum samples were tested at intervals for anti-HEV (Fig. 2). Anti-HEV was detectable at 2 weeks after initial vaccination in all animals receiving Alum-conjugated vaccine; the antibody level continued to increase until it peaked at approximately week 10 and declined somewhat thereafter. Table I shows the reciprocal end-point titres of individual rat serum samples in each of the QE2.1/Alum dose groups at weeks 6 and 17. At week 6 (i.e., 2 weeks after boosting), specific IgG titres were higher with increasing dose of antigen. However, at week 17 (13 weeks after boosting), when the specific IgG titres were gradually declining, there was no clear difference between the groups immunized with ≥ 15 μ g of antigen. These results indicate that two doses of 15

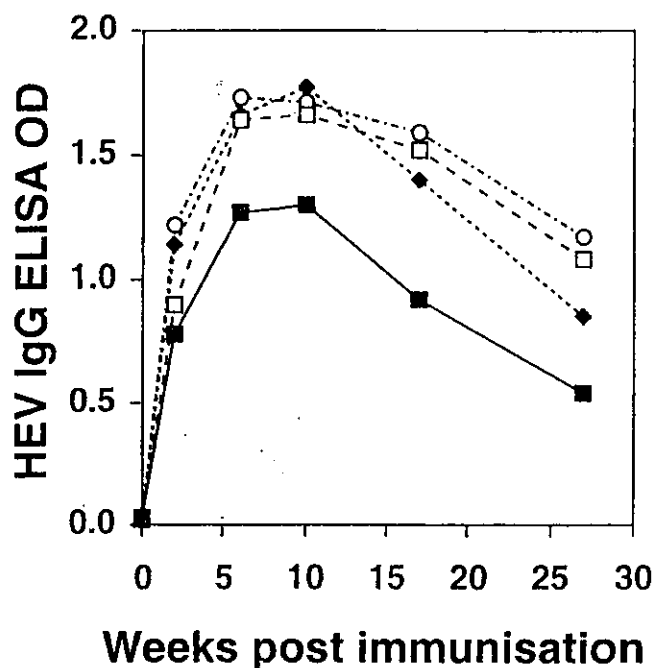


Fig. 2. Kinetics of antibody responses to different doses of QE2.1 with Alum adjuvant. Groups of three rats each were immunised at 0 and 4 weeks with 1.5 (■—■), 15 (□---□), 75 (◆··◆), or 150 μ g (○-○) QE2.1 with Alum. Serum samples were tested for hepatitis E virus-specific IgG by GST-ORF2.1 enzyme-linked immunosorbent assay, and the mean optical density for each group of rats is shown for each sample time.

μ g of QE2.1 formulated with aluminium hydroxide are sufficient to induce high titres of anti-HEV in rats.

Characterisation of Antibody Responses to QE2.1

Western Immunoblotting. We have previously reported that the addition or deletion of as few as 20 HEV-specific aa from the N-terminal part of ORF2.1 ablates its reactivity with convalescent macaque and patient serum samples [Li et al., 1997a]. As such, the reactivity pattern of these truncated or extended recombinant HEV proteins can be used to probe the specificity of antibody responses (Fig. 3). In the present study, 12 fusion proteins from the series were electrophoresed in replicate SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose, and the membranes were probed with sera from patients in the acute or convalescent phase of illness or with sera collected at 2, 10, or 27 weeks after primary immunisation from rat 7 (immunised with 75 μ g of QE2.1 with Alum, as in Fig. 2 and Table I). Human acute-phase serum reacted to an approximately equal extent with all the fusion proteins (Fig. 3A), whereas the convalescent-phase serum was exclusively reactive with GST-ORF2.1 (Fig. 3B), as we have observed previously [Anderson et al., 1999].

Significantly, the serum samples from the immunised rat show a similar dynamic change in the pattern of antibody responses (Fig. 3C-E). At 2 weeks after primary immunisation (Fig. 3C), antibodies were de-

TABLE I. Dose Response of QE2.1/Alum Vaccine in Rats

Antigen dose	Rat no.	Reciprocal end-point titre	
		Week 6	Week 17
2 × 1.5 µg	1	6,400	1,600
	2	6,400	1,600
	3	6,400	1,600
2 × 15 µg	4	25,600	12,800
	5	25,600	6,400
	6	12,800	12,800
2 × 75 µg	7	25,600	12,800
	8	12,800	3,200
	9	51,200	3,200
2 × 150 µg	10	51,200	12,800
	11	51,200	12,800
	12	51,200	12,800

tected against epitopes in the region between 2.1-1 and 2.1. Since they are detected equally well in all larger fusion proteins (containing additional HEV sequences not present in the vaccine), it can be assumed that they are directed against linear epitopes in this region. Similarly, at 10 weeks (Fig. 3D) antibodies against linear epitopes throughout 2.1 were detected, but it is notable that reactivity against GST-ORF2.1 is already predominant. At 27 weeks, reactivity is almost exclusively against ORF2.1, in a similar pattern to that of human convalescent-phase sera, and is thus directed to the conformational 2.1 epitope that is formed after refolding of ORF2.1 in either immunoblot (Li et al., 1997a) or ELISA formats (Anderson et al., 1999). Similar patterns of responses were seen in all rats examined (results not shown).

Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Although the previous data imply that the humoral immune response generated in rats after immunisation with QE2.1 at least partly mimics that seen in HEV-infected patients, it is not known what proportion of the total humoral immune response actually is detected by Western immunoblotting. Accordingly, competitive ELISAs using GST-ORF2.1 or baculovirus-expressed VLPs were performed to examine the capacity of HEV-specific antibodies induced in rats to compete with HEV-specific antibodies in sera from patients or an experimentally infected chimpanzee. Test serum samples were mixed with a pool of pre-immunisation rat sera or pooled 9- to 11-week sera from rats immunised with 3 × 50 µg QE2.1 with Alum (as in Fig. 1) and were assayed in duplicate on both GST-ORF2.1 and baculovirus VLP ELISAs. The level of inhibition of human IgG binding by immune versus pre-immune rat sera is shown in Table II. Inhibition by immune rat sera of acute- and convalescent-phase human and chimpanzee sera was observed in all samples, in both GST-ORF2.1 and baculovirus VLP ELISAs, with the inhibition rate ranging from 57% to 97%. There appeared to be no relationship between the level of inhibition and the initial level of patient IgG reactivity, the stage of infection, or the strain of HEV. The strongest inhibition observed was with highly reactive,

convalescent-phase serum from a patient infected with the Mexico strain of HEV, the most divergent from the Chinese strain.

In addition, individual serum samples from rats immunized with two (n = 9) or three doses (n = 3) of QE2.1 were tested with a single convalescent-phase patient serum sample (GS31) in competitive baculovirus VLP ELISA. Sera collected at 27 weeks from rats immunized with two doses of 15–150 µg QE2.1 inhibited baculovirus VLP ELISA reactivity of GS31 by 34% to 79% (mean, 63%; SD, 14%), whereas week 30 sera from rats immunized with three doses of 50 µg QE2.1 inhibited reactivity by 81–86% (mean, 83%; SD, 2%). These results show that levels of competitive antibodies remain stable between weeks 9 and 11 (Table II, before the second booster dose) and week 30 in rats receiving 3 × 50 µg QE2.1, mirroring the level of reactivity by GST-ORF2.1 ELISA, but they also suggest that three doses of QE2.1 may induce higher levels of competitive antibodies than two doses.

DISCUSSION

The well-controlled passive-immunisation study of Tsarev and colleagues [1994] has clearly shown that antibodies can confer immunity to HEV infection, and a number of studies have shown the efficacy of SVPs in active immunisation [Tsarev et al., 1994; Fuerst et al., 1996; Tsarev et al., 1997]. SVPs and VLPs therefore are considered to be suitable substitutes for "native" HEV antigen. We have now shown that recombinant QE2.1 protein induces an antibody response in rats with specificities similar to those in HEV-infected patients and chimpanzees, as measured by competitive ELISA using baculovirus-expressed VLPs. Furthermore, this antibody response appears to be directed largely against the conformational ORF2.1 epitope and persisted at high levels for at least 9 months. As such, QE2.1 can be considered an alternative antigen for active immunisation against HEV infection, with potential advantages related to the physical characteristics and methods of expression and purification of the protein.

Recent data have suggested that antisera to linear HEV epitopes have no neutralising activity, whereas patient sera are strongly neutralising in an HEV/cell-binding assay [Meng et al., 1998a]. Similarly, baculovirus-expressed SVPs appear to be more effective as candidate vaccines than the trpE-C2 fusion protein, though both induce high levels of total anti-HEV [Purdy et al., 1993; Tsarev et al., 1994; Fuerst et al., 1996; Tsarev et al., 1997]. We therefore think that it is important to consider the specificity of antibodies induced by putative HEV vaccines rather than only the total amount of reactive antibody; available evidence points to the importance of conformational epitopes in the capsid protein. We believe that the current study is the first to examine the specificity of immune responses in animals immunised with an experimental HEV vaccine.