

め、血液製剤からのウイルス遺伝子検出に関して、より広いウイルス株に対応する必要がある。このため、高感度でより広範囲なウイルス株に対応したリアルタイム法を開発した。

## B. 研究方法

### 1) プライマーとプローブ

#### [TaqMan 用]

ウエストナイルウイルス Lineage 1 用および Lineage 2 用の 2 種類を作製した (図 1)。また、CDC の作製した下記のプライマーおよびプローブも使用した。

WN3'NC-forward(10668-10684)CAGACCACGCTACGGCG

WN3'NC-reverse(10770-10756)CTAGGGCCGCGTGGG

WN3'NC-probe(10691-10714)TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT

および

WNENV-forward(1160-1180)TCAGCGATCTCTCCACCAAAG

WNENV-reverse(1209-1229)GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG

WNENV-probe (1186-1207)TGCCCCGACCATGGGAGAAGCTC

また、SYBR Green Based RT-PCR のためのプライマーは、下記のものを使用した。

WNNY514: CGGCGCCTTCATACACW

WNNY904: GCCTTTGAACAGACGCCATA

および

Fla-U5004: GGAACDTCMGGHTCNCCHAT

Fla-U5457:GTGAARTGDGCYTCRTCCA

### 2) 反応条件

使用機種は Light Cycler (Roche)

反応時間は下記の如くである。

	Cycle	反応温度 (°C)	時間 (sec)
RT & Denature	1	61	1200
		95	900
PCR 反応	45	95	0
		60	60
Cooling	1	40	30

## C. 研究結果

ウエストナイルウイルス遺伝子の検出法

としては、リアルタイム PCR 法として TaqMan RT-PCR 法や Lamp 法が高感度であるが、表 1 の如く、インド (g2266) およびアフリカのウイルス株 (FCG 株) を検出することができなかった。そこで、TaqMan 法の感度を維持しつつ、より広範囲な SYBR Green Based RT-PCR を実施したところ、ウエストナイルウイルスを検出し、増殖曲線の上昇を認めたが、陰性コントロールでもプライマーダイマーと考えられる増殖曲線が上昇する場合は認められた (図 1)。しかし、TaqMan 法の感度を維持するために、温度条件や時間の変更は難しいため、図 2 の如く、融解曲線 (Melting curve) 解析を実施すると、ウイルス遺伝子を増殖した場合は、82°C ないし 83°C にピークを認めた。一方、産物がプライマーダイマーである場合は、76°C ないし 77°C にピークを認めた。

## D. 考察

遺伝子検出法は、高感度で特異性を高めるほど診断精度は向上するが、ウイルス株の多様性に対応できなくなる。TaqMan RT-PCR 法は、プローブを使用することで特異性が向上し、感度も高い。この特徴を維持しながら、より広いウイルス株を検出するために、従来の PCR 法で使用していたプライマーを用いて、SYBR Green Based RT-PCR を同時アッセイする方法は有用である。SYBR Green Based RT-PCR では、プローブを用いないために、プライマーダイマーでも増殖曲線が上昇することがある。この欠点は、融解曲線 (Melting curve) 解析を実施することで解決できることを見出した。本方法は輸入ウエストナイル感染症例の診断だけでなく、輸血用製剤のスクリーニング検査にも有用であると考えられる。

## E. 結論

リアルタイム PCR (TaqMan 法) の感度を維持しつつより広いウイルス株に対応した検出法として TaqMan RT-PCR および SYBR Green I Based RT-PCR の同時アッセイ系を開発した。本方法は輸血用製剤のスクリーニング検査にも有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

高崎智彦. ウエストナイル熱の診断と検査.  
臨床とウイルス. 33(1).22-27. 2005

高崎智彦. 話題の感染症—ウエストナイル  
熱を中心に—. Neuroinfection.10 (1) 31-35  
(2005)

2. 学会発表

林昌宏、高崎智彦、根路銘令子、伊藤美佳  
子、田島茂、森田公一、石川豊数、倉根一  
郎. ウエストナイル不活化ワクチンの日本  
脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の  
検討. 第53回日本ウイルス学会(横浜)2005  
年11月

C. Lim, T. Takasaki, A. Kotaki, R. Nerome, M.  
Ito, S. Tajima, K. Morita, T. Ishikawa, I. Kurane  
Mouse Antibody Response to Inactivated West  
Nile and Inactivated Japanese Encephalitis  
Vaccines for Immunization against West Nile  
virus and other Flaviviruses. 8<sup>th</sup> National  
Conference on WNV in USA (サンフランシスコ)  
2006年2月

表1 ウエストナイルウイルス遺伝子検出法の評価

Virus strain	TaqMan assay			Lamp Method <sup>3)</sup>
	CAP probe <sup>1)</sup>	3'NC probe <sup>2)</sup>	ENV probe <sup>2)</sup>	
WNV (NY株)	+	+	+	+
WNV(Eg101株)	+	+	+	+
WNV (g2266株)	+	-	-	-
WNV (FCG株)	+	-	-	-
Kunjin (K47382株)	+	+	+	-
Kunjin (OR393株)	+	+	+	-

表2 ウエストナイルウイルス用TaqMan RT-PCR Primers and probes

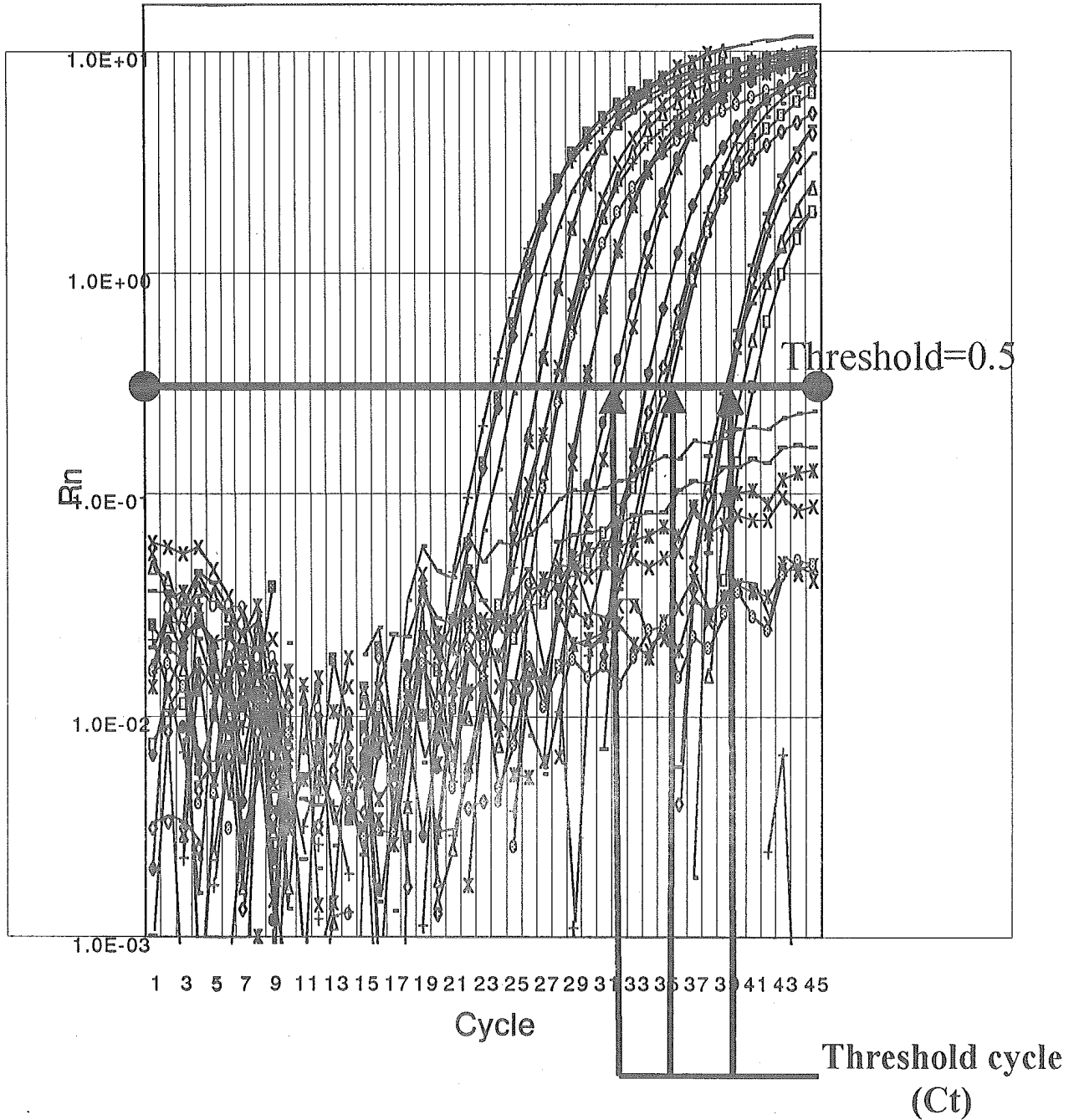
### Lineage 1

WNVEN513P.MGB	HGCGGCGCCHTC
WNVEN483S.513Pset	GGNAGATTCAGCATMACYC
WNVEN550R.513Pset	CATACTCTCCVAGCTTHAGHGTGT

### Lineage 2

WNLin2g471s-495pset	ACCCARGCHGGAAGATTCAG
WNV-Line2gly495Prob	ACYCCATCGGCCRCCA
WNLin2g531R-495pset	CACCCARCTTYAGCGTGTA

図1 TaqMan Real Time RT-PCR



Minimum Correlation coefficient: >0.98

The determination of the detection threshold: >0.5

図2 PCR産物増殖曲線

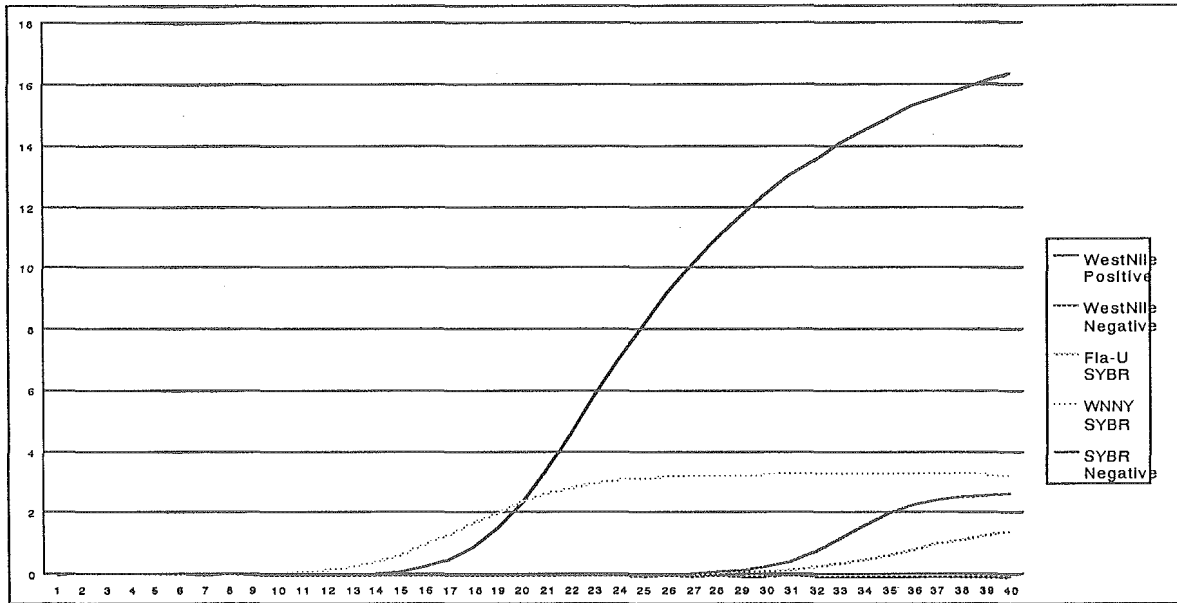
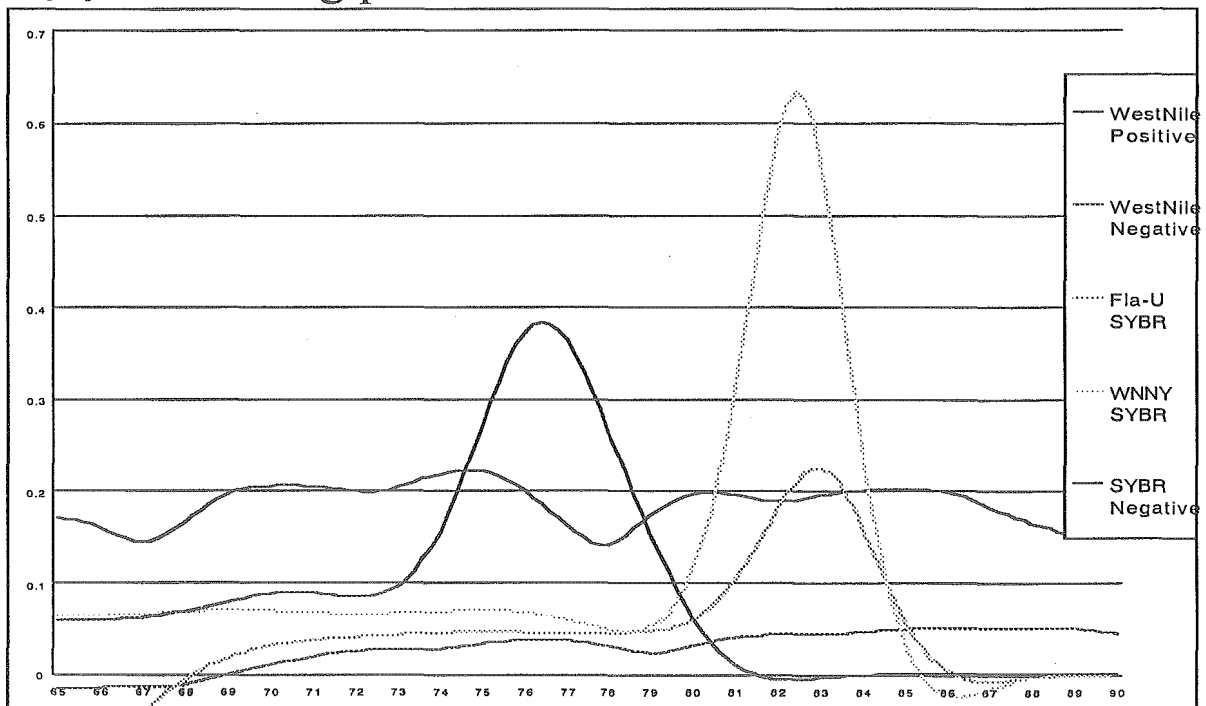


図2 Melting peaks



定量可能な組換え E 型肝炎ウイルス様粒子の作製

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究協力者 李 天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 遺伝子型 3 の HEV VLP を作製した。N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 を発現した場合は、これまでの遺伝子型 1 や遺伝子型 4 の場合と同様、直径 27nm の VLP であった。一方、ORF2 の全長の発現では、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する VLP が作製できた。この組換え粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子が取り込まれていた。

協力研究者 永田 典代、宮村達男（国立感染症研究所）、恒光 裕（動物衛生研究所）

いサイズを持つ VLP の作製を試みた。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子（VLP）がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。我々はこれまでに 1 型と 4 型の HEV について N 末端を欠失した構造蛋白を発現して VLP を作製し、その抗原性と免疫原性がネイティブな HEV と似ていることを明らかにした。しかしながら、これら VLP はネイティブな HEV に比べ明らかに小さなサイズの粒子であった。本研究では 3 型の構造蛋白を発現し、ネイティブな HEV に近

B. 研究方法

3 型 HEV ORF2 の全長、および N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、ORF2 全長を発現する場合は感染細胞から、N 末端を欠失させた ORF2 を発現する場合は培養上清からウイルス様中空粒子（VLP）を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。発現蛋白の N 末端アミノ酸配列は Edman 法で決定した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA 法等で抗原性を比較した。

C. 研究結果

1. N 末端から 111 アミノ酸を欠失した ORF2 の発現

これまで発現した遺伝子型 1 や遺伝子型 4 と同様、感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞

やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 58k、および 54k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 58k 以外に 57k、56k、および 54K のバンドが出現した。上清中には感染後 4 日目から 57k、56k、および 54K のバンドが出現し、これらの発現は 7 日目にプラトーに達した。感染 7 日目の上清を回収し、超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径約 27nm の中空粒子が多数観察された。遺伝子型 3 の VLP が作製できた。感染上清を健常人血清と遺伝子型 4 HEV 感染患者血清と反応後、電子顕微鏡で観察したところ、患者血清でのみ凝集塊が観察された。したがって VLP はネイティブな HEV と同じ抗原性を有する粒子であった。

## 2. ORF2 の全長の発現

感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54K のバンドが出現した。上清中からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかった。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。

## 3. 中空粒子内に取り込まれた核酸の解析

直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子は、その電顕像から粒子内部に核酸分子を取り込んでいることが予想された。そこで、精製粒子を用い、HEV 構造タンパク領域を増幅するプライマーを用いて増幅し、その塩基配列を解析した。その結果、増幅産物は HEV 特異的な配列を持つ核酸であった。

## D. 考察

遺伝子型 3 の VLP を作成することができ、遺伝子型 1 および遺伝子型 4 と合わせて 3 種類の VLP を作製することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。したがって、高い抗体価を持つ急性期の血清を用いた場合、いずれの VLP を用いても、診断は可能と思われる。しかしながら、ホモの組み合わせに比べヘテロでは反応性が若干弱く、血清疫学を行う際、どの抗原を用いるかによって抗体価に差が生じる可能性がある。単クローン抗体では遺伝子型 1 VLP と遺伝子型 4 VLP で抗原性に差が検出されており、これが患者血清との反応性の差となっているのかもしれない。患者がどの遺伝子型のウイルスに感染していたかとも絡む問題であり、今後の課題である。35-40nm の粒子の三次構造の解析により、ネイティブな HEV 構造の情報が得られることも期待できる。この粒子内部には HEV 特異配列を持つ核酸が取り込まれていたことから、HEV の除去・不活化法の研究に有用である。

## E. 結論

組換えバキュロウイルスで遺伝子型 3 の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つ VLP を作製することができた。この組換え粒子内には、構造タンパクをコードする遺伝子を取り込まれていた。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

李 天成、斉藤 美加、小倉 剛、宮村 達男 武田 直和。沖縄に生息するマンガースの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況。日本ウイルス学会、第 53 回学術集会 2005 年 11 月 横浜

李 天成、宮村 達男、武田 直和。E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須な領域の同定。

日本ウイルス学会、第 53 回学術集会 2005  
年 11 月 横浜

2. 論文発表

Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T,  
Takeda N: Serological evidence for hepatitis E  
virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med.*  
*Hyg.* 2005;in press.

Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang  
JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH:  
Essential elements of the capsid protein for self-  
assembly into empty virus-like particles of  
hepatitis E virus. *J Virol* 2005;79:1299-3006.

Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y,  
Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S,  
Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E Virus  
Transmission from Wild Boar Meat. *Emerg*  
*Infect Dis* 2005;11:1958-1960.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



SARS コロナウイルスの血液製剤における除去，不活化に関する研究

研究分担者：田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部）

協力研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）

研究要旨

血液製剤に含まれる SARS コロナウイルス（SARS-CoV）の界面活性剤（S/D）及び熱による不活化に関して検討した。5%グロブリンまたは5%アルブミン溶液中に含まれる SARS-CoV は S/D の室温 4 時間の処理で完全に感染性を消失した。また5%グロブリン溶液中のウイルスは、60℃ 2 時間の熱処理により、完全に感染性が失われた。これらのことから、S/D 処理、60℃ 2 時間の熱処理は血液製剤中から SARS-CoV を取り除くために十分な条件であることが判明した。

A. 研究目的

SARS は 2002 年から 2003 年にかけて中国広東省から香港に飛び火し、その後東南アジアを中心とする全世界へ伝播した。SARS は死亡率が高い事から世界を震撼させた新興感染症である。世界各国の共同研究により、原因病原体はそれまで報告されたウイルスとは異なる新たなコロナウイルス（SARS コロナウイルス）であることが明らかにされた。SARS は感染初期には呼吸器、血液中から感染性ウイルスやウイルスゲノムを検出するのが困難であり、確定診断が難しい感染症である。本研究は、SARS 感染極初期（発熱前）患者の血清が血液製剤として利用される可能性もあり、血液製剤中から SARS-CoV を取り除く方法を確立する目的で遂行された。

B. 研究方法

SARS-CoV はドイツヴュルツブルグ大学 Ziebuhr 博士から分与された Frankfurt-1 株を用いた。ウイルス増殖及び定量には VeroE6 細胞を用いた。本研究では、分与された SARS-CoV を VeroE6 細胞で増殖させた  $7.6 \times 10^7$  PFU/ml の力価の種ウイルスを使用した。SARS-CoV の血漿分画製剤中の S/D 処理による不活化は以下の方法に依った。血漿分画製剤としては、5%グロブリン溶液及び5%アルブミン溶液を用い

た。血漿分画製剤の対照として細胞培養用培地（DMEM, 日水）を用いた。これらの溶媒中に  $3 \times 10^5$  PFU/50  $\mu$ l になるよう SARS-CoV を調整し、同量の S/D 剤を更に加え（全量で 500  $\mu$ l）、室温で 4 時間ゆっくりと攪拌した。その後、S/D を取り除くための biobeads を加え、室温で 2 時間攪拌し、2000 回転 5 分遠心し、biobeads を含まない溶液を分離後、溶液中のウイルス感染価（PFU）を下に述べる plaque assay で定量した。60℃中の熱安定性については以下のように行った。5%グロブリン溶液 2.7 ml に 0.3 ml の SARS-CoV を加え、60℃で 2 時間水槽で処理し、そのウイルス力価を測定した。ウイルスの定量は以下のような plaque assay により行った。VeroE6 細胞を 24 well plate に培養し、confluent 細胞の培養液を除き、10 倍階段希釈したウイルス液を 50  $\mu$ l/well で、それぞれを 2 well に接種した。37℃で 1 時間吸着後、1% FCS, 0.75% methyl cellulose を含む DMEM 0.5 ml を加え、37℃で更に 2 日間培養した。更に、10%ホルマリンを各 well に 0.5 ml 加え、2 時間固定した後、UV で細胞を overnight 照射し、完全にウイルスを不活化させた。その後、細胞を cristal violet で染色し、SARS-CoV による plaque を光学顕微鏡で算定した。

### C. 結果

血漿分画製剤に含まれる SARS-CoV を S/D 剤で 4 時間処理したところ、対照の DMEM に含まれる SARS-CoV と同様、完全に感染性が消失した (図 1)。また、5% グロブリン溶液中のウイルスを 60℃ 2 時間処理により、その感染性は完全に失われ、この条件下でウイルスが完全に不活化されることが示された。

### D. 考察

SARS-CoV はエンベロープを持つウイルスであり、Tween 20, NP-40 などの non-ionic detergent に感受性である。今回行った界面活性剤 S/D の処理によっても、感染性が完全に消失することが判明し、この結果は今までの界面活性剤を用いた結果と合致する。また、SARS-CoV の血清中での不活化に関して、56℃ 30 分の処理により、ウイルス感染性が 1/10000 以下になることが報告されており、熱に弱いことが指摘されていた。今回行った実験では、60℃ 2 時間で感染性が完全に失われたが、この結果もこれまでの報告と合致するものである。

### E. 結論

血漿分画製剤中の SARS-CoV は界面活性剤である S/D より完全に除去できること、また 5% グロブリン溶液中の SARS-CoV は 60℃ 2 時間の熱処理により完全に不活化されることが明らかとなった。

### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Tsunetsugu-Yokota Y, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. Immunological detection

of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. Jpn J Infect Dis. 2005 58:88-94.

Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NT, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. J Virol Methods. 2005 125:181-6.

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello DE, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. Vaccine. 2005;23:2269-72.

#### 2. 学会発表

松山州徳、氏家誠、森川茂、田代真人、田口文広：プロテアーゼによる SARS コロナウイルスの感染増強第 53 回日本ウイルス学会総回、横浜 2005.11.21-23

石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、鈴木哲朗、宮村達男：高度弱毒化ワクシニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討 第 53 回日本ウイルス学会総回、横浜 2005.11.21-23

H. 知的財産権の出願・登録状況  
ない

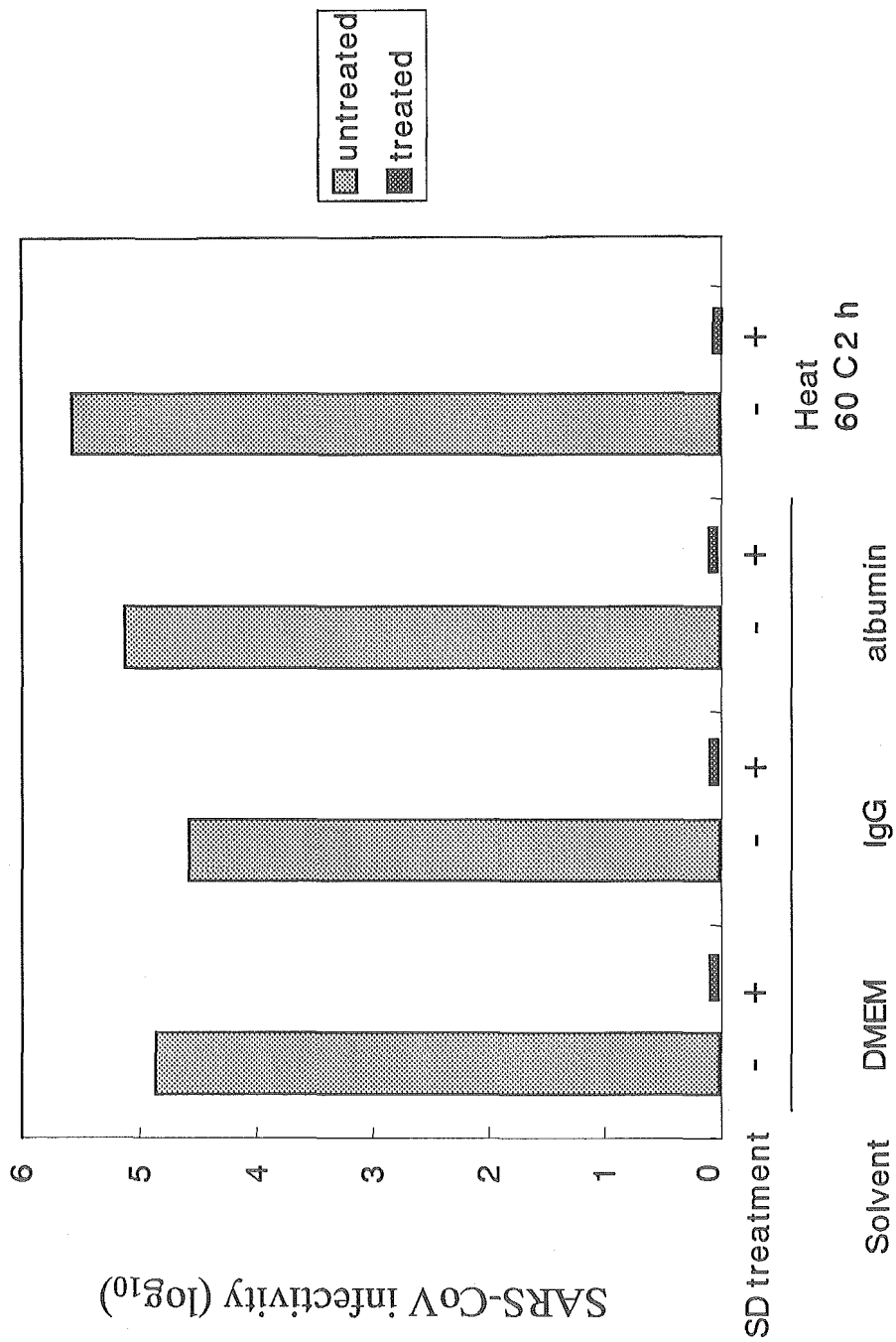


図1 : SARS-CoVの界面活性剤S/D及び熱による不活化

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書  
A型肝炎ウイルスの不活化法

分担研究者：米山徹夫（国立感染症研究所 ウイルス 2 部）

共同研究者：嶋崎典子（北里衛生科学センター）、清原知子、戸塚敦子  
研究要旨

今年度はA型肝炎ウイルス(HAV)の不活化を、加熱等で試み、加熱不活化に HAV 株間の差異があることを見出した。γ線照射で効果的に不活化されたことも報告する

#### A.研究の背景

血液を介したA型肝炎ウイルス(HAV)の感染効率は、通常の感染ルートである経口感染より非常に高いことが動物実験で示されている。日本では毎年数百人の患者報告がある現状から、血液や血液製剤を介した感染の可能性を常に念頭においた安全対策が必要である。

#### B.研究目的

HAV の野外株は培養細胞で増殖させるのは難しく、実験室で扱うのは細胞に馴化させたウイルス株である。血液製剤の製造工程で使われる加熱処理により、複数の HAV 細胞馴化株間で、不活化の kinetics に違いがあるか調べ、ウイルス安全性試験に適切な株を選別する資料とする。また、他の効果的な不活化法を検討した。

#### C.研究方法

1) ウイルス：HAV の細胞馴化株、

KRM238（遺伝子型 IIIB）を使用した。

加熱実験では、他の 2 株、同じ遺伝子型の KRM003（遺伝子型 IIIB）、遺伝子型の違う KRM031（遺伝子型 IA）も使用した。

2) 感染価の測定：HAV を感染させた GL37 細胞の免疫染色法 (Immunofocus assay) で感染価を測定

した（詳細は昨年度報告）。

3) 加熱試験：25%アルブミン中の HAV を、60℃で1時間及び10時間加熱した。

4) γ線照射：Co60線源により12℃で、5—50K Gy の線量を照射した。HAV は溶液中（10%FBS in PBS）と凍結乾燥した状態とで照射し、不活化の効果を比較した。

5) 有機溶媒/界面活性剤(S/D)処理

2種類のS/D剤の組み合わせを使用した。

①終濃度1%TnBP+終濃度1% TritonX-100 in PBS

②終濃度1%TnBP+終濃度1%Tween80 in PBS

常温で4時間、S/D処理を行い、S/D剤の除去は、希釈また Bio-Beads® (BIORAD社)法で行った。

#### D.研究成果

##### 加熱試験

HAVの3株に対し、25%アルブミン下、60℃10時間による不活化効果は不活化され易い株と不活化されにくい株の間で約2logの差があった(表1, 図1)。同じ遺伝子型のKRM238と003株でも不活化効率に1.5logの差があった。

##### γ線照射による不活化

溶液中でHAVKRM238株は照射線量を25K Gyまで増加すると指数直線的に不活化され、5K Gyで1.8log、10K Gyで2.7log、25K Gyで6.7log不活化された。50K Gyでは検出限度(<7.2log)以下になった。凍結乾燥したウイルスでも同様な不活化のkinetics(図3)を示した。

##### S/D処理の効果

S/D剤①1%TnBP+1%TritonX-100, 及びS/D剤②1%TnBP+1%Tween80でHAVKRM238株を処理しても感染価は影響されなかった。S/D剤除去に使用したBiobeadsはHAVを吸着してしまうようである(図4)。S/D処理で不活化され

ないHAVでは、希釈操作で充分S/D剤の影響を取り除けた。

#### E.考察

60℃10時間の加熱不活化はHAVの株間で差があり、不活化効率の評価を慎重にしなければならない。試験に使用する株はKRM238のように熱に不活化されにくい株の使用が望ましい。血液製剤への影響を考慮しなければ、25K Gyのガンマー線の照射はHAVの不活化に効果的であった。

HAVは本実験でも示されているように、不活化されにくいウイルスであり、超高度のウイルス検出法の開発が必要である。

#### F.健康危険情報

なし。

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

1. 米山徹夫、宮村達男：A型肝炎・B型肝炎：プロGRESS イン メディシン26巻、43-48、2006.

##### 2.学会発表

1. 清原知子、戸塚敦子、下池貴志、米山徹夫、宮村達男：日本におけるA型肝炎の血清疫学調査、第53回日本ウイルス学会総会、横浜、2005年.

#### H.知的所有権の取得状況

なし。

表1. HAVの加熱不活化

HAV strain	HAV titer (FFU/ml) after heating at 60°C for indicated hr		不活化効果 (10時間後)
	0	10	
KRM238	2.2E+07	2.7E+06	3.2
KRM003	1.8E+07	1.3E+06	4.7
KRM031	1.5E+07	3.4E+05	5.3

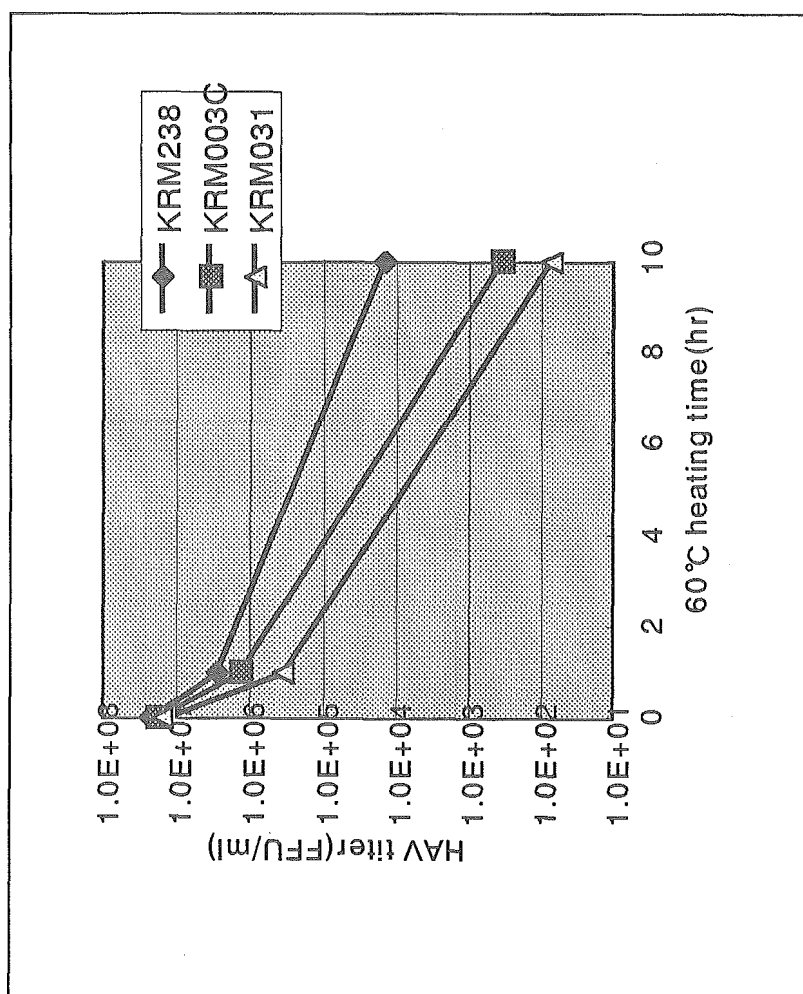


図1. HAVの加熱不活化

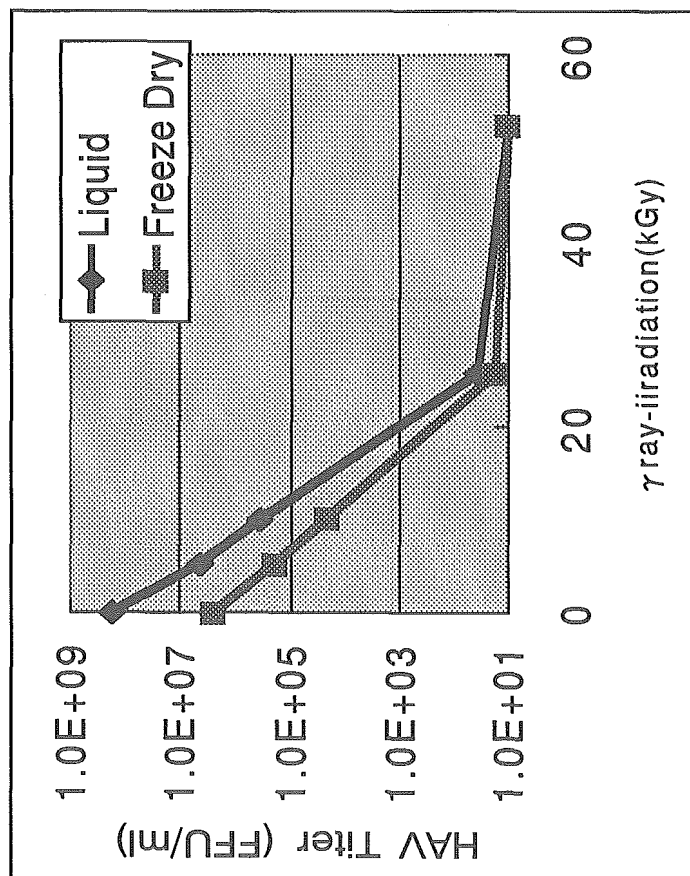


図2. HAVのγ線照射による不活化



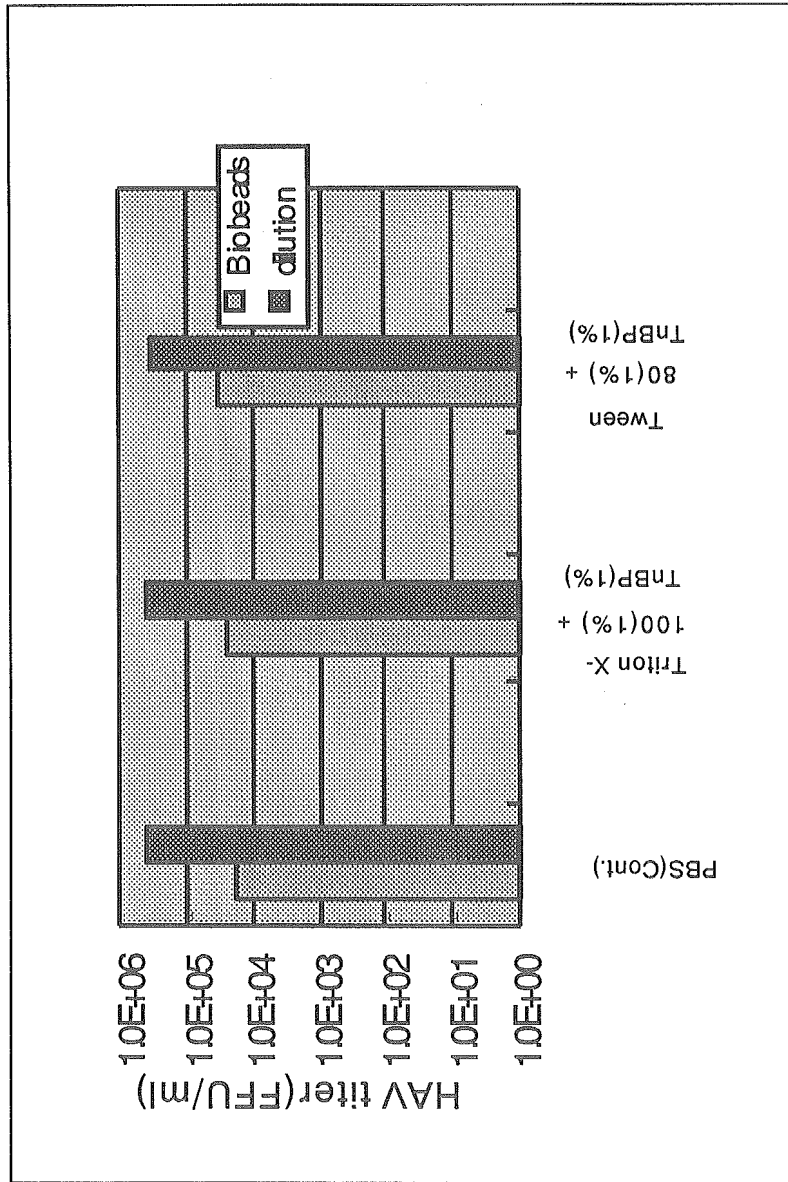


图 3. HAVのS/D処理効果

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Owada,T.,Matsubayashi,K.,Sakata,H., et al.	Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry	J.Viral Hepat.	13	11-18	2006
Li,T-C.,Chijiwa,K.,Sera,N., et al	Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat	Emerging infectious Diseases	11	1958-1960	2005

## Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry

T. Owada, K. Matsubayashi, H. Sakata, H. Ihara, S. Sato, K. Ikebuchi, T. Kato, H. Azuma and H. Ikeda *Hokkaido Red Cross Blood Center, Nishi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido, Japan*

Received February 2004; accepted for publication October 2004

**SUMMARY.** The cellular receptor for hepatitis B virus (HBV) infection has not yet been identified. The purpose of this study was to address the possibility of participation by desialylated HBV and the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) exclusively expressed on liver parenchymal cells, in infection. Assays for viral binding and entry were performed by culturing a hepatoblastoma cell line, HepG2, and HBV particles derived from the HBV carrier in the presence or absence of neuraminidase (NA). Viral binding and entry were clearly enhanced in the presence of NA, and the enhancement of the binding could be blocked by asialo-fetuin and ethylenedi-

amine-tetraacetic acid (EDTA). In addition, covalently closed circular (CCC)-DNA, as a marker of infectivity, was detected in the presence of NA, but not in its absence. The optimal concentration of NA raised infectivity more than 1000 times. We concluded that this method makes it feasible to evaluate the infectivity of HBV *in vitro* and that ASGP-R may be a specific HBV receptor once viral particles are desialylated.

**Keywords:** asialoglycoprotein receptor, binding, desialylation, HBV, infection.

### INTRODUCTION

The initial event in the life cycle of viruses is attachment to specific receptor(s) on the host cells. As for human hepatitis B virus (HBV) infection, the mechanisms of viral replication and proliferation have been investigated [1–6]. Many candidates for cellular receptors, such as immunoglobulin A-receptor [7,8], interleukin-6-receptor [9,10], asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) [11], transferrin-receptor [12], glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase [13,14], annexin V [15–17], 44-kDa protein [18], as well as apolipoprotein H [17,19], polymerized human serum albumin [20], and human soluble serum factor [21] as a mediator between hepatocytes and HBV, has been studied. However, no definitive conclusion has yet been made. The virus ligand(s) involved in the attachment to the cell surface are also still

unknown. The lack of a reproducible *in vitro* infection system hampers the identification of receptor(s) and ligand(s). Among the many candidate molecules, ASGP-R stands out because: (i) the liver parenchyma is by far the leading target for HBV infection [22], (ii) ASGP-R is highly and exclusively expressed in liver parenchymal cells [23–25], (iii) the endothelial cell is reported to express sialidase activity [26,27] and (iv) conspicuous sinusoid piling with endothelial cells is recognized in the liver [28]. These points led us to refocus on ASGP-R as a cellular receptor for HBV infection. In this study, we examined the effect of neuraminidase (NA), commonly called sialidase, on the cell-binding, entry and infectivity of HBV in HepG2 cells, and discuss the importance of interaction between ASGP-R and the desialylated HBV particles in the establishment of infection.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Cells and virus*

A hepatoblastoma cell line, HepG2, was purchased from Riken (The Institute of Physical and Chemical Research, Ibaraki, Japan). A HepG2-derived cell line, HepG2.2.2.15, transfected with a plasmid containing HBV-DNA [29,30], was also employed in this study. HepG2.2.2.15 cells were used as controls expressing covalently closed circular (CCC)-

Abbreviations: ASGP-R, asialoglycoprotein receptor; CCC, covalently closed circular; DIG, digoxigenin; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; HBV, hepatitis B virus; NA, neuraminidase; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infection dose; TC<sub>50</sub>, median tissue culture dose for penetration.

Correspondence: Takashi Owada, Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 063-0002, Japan. E-mail: owada@hokkaido.bc.jrc.or.jp

DNA. HBV particles were isolated from donor sera containing a high titre of HBs- and HBe-antigens at Hokkaido Red Cross Blood Center as previously described [11,15]. In brief, three sequences of differential ultracentrifugation were conducted on 30% (w/w) sucrose layers, then the HBV-positive serum was centrifuged ( $1.5 \times 10^5 \times g$ ) with an L8-70 M Ultracentrifuge (Beckman Coulter K.K., Tokyo, Japan) for 16 h, and suspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen Corporation, CA, USA) containing 10% foetal calf serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) designated as culture medium. HBV preparations were kept in small aliquots at  $-80^\circ\text{C}$  until used for assays. Informed consent was obtained from donors of the sera.

#### *Quantitative HBV binding assay using TaqMan polymerase chain reaction*

Samples of HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded into 25-cm<sup>2</sup> flasks (Becton Dickinson, NJ, USA). On the following day, the culture medium was replaced with 2 mL of fresh medium containing  $1 \times 10^6$  copies of HBV and the cells were cultured in the presence or absence of NA from *Clostridium perfringens* (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) in a humidified incubator at  $37^\circ\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. Then, the cultured supernatant was discarded, and the HepG2 cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS)(-) in order to remove viral particles that did not bind to the cell surface. Subsequently, the cells and the viruses were treated with 0.25% trypsin/1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) - 4Na (Invitrogen Corporation, CA, USA), known as trypsin solution. After that, the trypsin solution together with HepG2 and HBV was collected. The whole DNA (both cellular DNA and viral DNA) was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) from the trypsin solution. Whole DNA samples were dissolved in 20  $\mu\text{L}$  of distilled water. Then, a quantitative TaqMan polymerase chain reaction (PCR) targeting the S region of the HBV-DNA was performed with the following primer set (forward primer: 5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3', reverse primer: 5'-TGAGGCATAGCAGCAGGATG-3', TaqMan probe: 5'-TATCGCTGGATGTGTCTGCGCGTT-3'). The methodology for this PCR is highly reliable and gave reproducible results, nevertheless it has not been published elsewhere. Hence in this report, we detail the procedure. The reaction mixture (50  $\mu\text{L}$ ) contained 25  $\mu\text{L}$  of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 200 nM each of the forward and reverse primers (Sigma Genosys Japan, Hokkaido, Japan), 100 nM of TaqMan probe (Sigma Genosys Japan), and 20  $\mu\text{L}$  of template DNA. Conditions for TaqMan PCR were: 50 cycles of denaturation for 15 s at  $95^\circ\text{C}$  followed by extension for 1 min at  $60^\circ\text{C}$ . Before the first cycle, the samples were incubated for 2 min at  $50^\circ\text{C}$  and for 10 min at  $95^\circ\text{C}$ . The fluorescence intensity of the TaqMan probe was detected using an ABI Prism<sup>TM</sup>7700 Sequence

Detection System (Applied Biosystems). Incidentally, we prepared HBV-DNA standard samples measured with the Amplicor<sup>®</sup> HBV-DNA Monitor Test (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) to make a calibration curve for the TaqMan procedure.

#### *Quantitative HBV binding assay with chemicals*

Binding assays were performed with asialo-fetuin and two kinds of polyions, either sodium dextran sulphate or polybrene. Asialo-fetuin is well known to combine with ASGP-R [11,25], and the latter polyions are frequently used to ascertain whether the interaction between viruses and cells is initiated electrostatically. Two millilitres of culture medium containing HBV in the presence of 0.1 U/mL of NA and various concentrations (<2.5 mg/mL) of asialo-fetuin was added at the start of cell to virus interaction. Also, the polyion at a range of concentrations (sodium dextran sulphate <50 000  $\mu\text{g/mL}$ , polybrene <7500  $\mu\text{g/mL}$ ) was added into the culture system without causing cytotoxicity in the absence of NA. Moreover the effect of EDTA, a calcium chelator, on the binding of HBV which was pretreated with 0.1 U/mL of NA, was investigated. It is known that ASGP-R is characterized by a requirement for calcium ions to bind ligand [31]. Previous reports demonstrated that EDTA (<1 mM) did not inhibit NA activity [32], but we used NA (0.1 U/mL) - pretreated and centrifugally collected HBV particles in this assay. The method of binding inhibition using EDTA was described elsewhere [23]. Briefly, after the enzymatically treated HBV particles were combined with HepG2 at  $4^\circ\text{C}$  for 1 h, the cells were incubated in each concentration (<20 mM) of EDTA for 15 min at RT. Harvesting methods for HBV and HepG2, DNA extraction and TaqMan PCR methods are described above. The number of HBV particles and HepG2 cells were the same as above. All additives were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA).

#### *Quantitative HBV entry assay based on the TaqMan PCR method*

The assay procedure for the cells and viruses was as described above. HepG2 cells infected with HBV were cultured in the presence or absence of NA in a humidified incubator at  $37^\circ\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub> for a predetermined period. Then, the supernatant was discarded, and the cells were rinsed twice with PBS(-) in order to remove the viral particles that had not bound to their surface. The cells were subsequently treated with trypsin solution and collected. Then, they were washed with culture medium four times. After all these procedures, whole DNA considered to be a combination of cellular DNA and intracellular viral DNA was extracted and dissolved in 20  $\mu\text{L}$  of distilled water. The number of viral copies within each DNA sample was directly determined using the TaqMan PCR method as described above.