

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能な
C型肝炎ウイルス株を利用したワクチン開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 脇田 隆字

平成19（2007）年 3月

目次

I. 総括研究報告

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を 利用したワクチン開発	1
脇田 隆字	

II. 分担研究報告

1. HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、 ワクチン免疫	14
脇田 隆字	
2. ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリアクターによる ウイルス粒子産生細胞の培養	22
石井 孝司	
3. ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発	26
望月 英典	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

	29
--	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊

	34
--	----

I. 総括研究報告

総括研究報告書

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を利用したワクチン開発

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。我々が分離した JFH-1 株により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、HCVの感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子産生系やウイルス様中空粒子産生系によるワクチン開発を試みる。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

分担研究者 石井 孝司
国立感染症研究所
主任研究官
分担研究者 望月 英典
東レ株式会社医薬研究所
研究主幹

染増殖できなかったためである。Lohmannらが Con1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかった。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCVのワクチン開発が望まれている。

これまでにHCVのワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感

そこで本研究では、JFH-1株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1株によるリコンビナントウイルス粒子産生系によるワクチン開発を試みる。これは世界で初めてのnative HCV粒子を用いたワクチン開発である。

JFH-1株による実験系は、VSVやレトロウイルスのシュードタイプウイルスと異なり、HCVのnativeなウイルス粒子を用いる。さらにJFH-1株の構造遺伝子領域を他のウイルス株と組み換え

ることにより、他のウイルス株の構造蛋白をもつ感染性キメラウイルス粒子の産生が可能である。JFH-1株およびキメラウイルス粒子によりウイルス感染中和アッセイ系を樹立する。このシステムにより様々なHCV株による交差中和活性を検討することができる。また、これまでに開発されたHCV遺伝子を挿入した組み換えウイルス（組み換えワクチニア、組み換えアデノなど）やDNAワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

さらに本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域をほ乳細胞で発現させると、培養液中にウイルス様中空ウイルス粒子を分泌する。ウイルス様中空粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

1. ウイルス粒子の精製法の確立

シードウイルスを高感受性 Huh7 細胞に感染させて継代培養した。感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの 5 – 10 倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて培養し、ウイルス粒子を含む培養液を回収した。限外ろ過、しょ糖密度遠心、ヘパリンカラムを段階的に組み合わせることにより、ウイルス粒子の精製法を確立した。

2. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルス液中に含まれるウイルス粒子を

形態学および生化学的に解析した。電子顕微鏡によりウイルス粒子形態を観察した。蛋白質電気泳動および質量分析によりウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。さらに精製ウイルス粒子液をアジュバントと共にマウスに免疫した。

3. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

pEF ベクターは、EF プロモーターと Zeocin 耐性遺伝子を持ち、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成することができる。本ベクターの EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してしょ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

4. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

上記の HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを、HCV の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に同様に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してしょ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白と replicon RNA の培養上清中での挙動を調べた。

5. HCV 感染に係わる宿主因子の解析

JFH-1 株、HCV は従来の Huh7 細胞にのみ感染可能だがその感染効率は 1 % 以下と

低い。感染感受性の異なる細胞株の混在を考慮して、Huh7 細胞を限界希釈法によりクローニングして亜細胞株を得た。亜細胞株をHCV 感染性、レプリコンの複製感受性、細胞表面マーカーの解析を行った。

6. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

細胞培養系でのHCV粒子大量生産を目指し、HCV感染細胞のマイクロキャリアによる培養を検討した。

7. Genotype 1b の株由来構造蛋白をもつキメラウイルスの作製

我が国および欧米諸国においてHCVの主要な遺伝子型は1型である。現在感染性の確認されているウイルス株はJFH-1株のみで、その遺伝子型は2aである。そこで、JFH-1株の構造領域遺伝子を遺伝子型1bに組み換えたキメラウイルスの作製を試みた。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを

実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. ウイルス粒子の精製法の確立

JFH-1株またはJ6/JFH-1キメラウイルス株の合成RNAをHuh7細胞にトランスフェクションしてシードウイルスを回収した。このシードウイルスをHuh7細胞またはHuh7.5.1細胞に感染させて継代培養した。ウイルス粒子を含む培養液を回収するために、感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの5-100倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて継代培養した。さらにウイルス液に含まれる蛋白量を減らすために、培養液回収にはFCS濃度を2%の培養液を使用した。回収したウイルス液はまずフィルターで濾過して、細胞のデブリスなどを取り除いた後に、分子量カットオフ100kDの限外ろ過膜を用いて低分子の夾雑物を除去すると同時に濃縮した。この濃縮ウイルス液中のウイルス分画をしょ糖密度遠心法により回収した。さらに感染性ウイルスを吸着するヘパリンカラムによりウイルス粒子をさらに精製した。精製前の原液と比較して、2000倍から8000倍程度の精製が可能となった。

2. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルスを電子顕微鏡により観察すると、直径50-60nmの球状粒子を観察できた。さらに免疫電顕法により、ウイルス表面蛋白質に対する抗体がこの球状ウイルス粒子に吸着することが明らかとなった。また、精製ウイルス粒子を電気泳動して、染色および質量分析によ

りウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。ウイルス蛋白質と共に多くの細胞性蛋白質が同定された。これら細胞性蛋白質の存在意義をさらに検討中である。

精製ウイルス粒子をアジュバントと共にマウスに免疫した。アジュバントと混和することによりウイルスの感染性が不活化されることを確認後、マウスに投与した。複数回の投与後、マウスの免疫反応を検討中である。中和抗体の産生などが期待できる。

3. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

JFH-1 株の構造領域遺伝子を pEF4 の EF プロモーターの下流に挿入し、Huh7 細胞に導入した。目的蛋白を発現している細胞株を選択したところ、培養上清にも HCV 構造蛋白が分泌されていることが確認された。また、培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 付近にコア蛋白が存在していることが確認され、HCV の粒子様構造物が形成されている可能性が示唆された。

4. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成

Genotype 1b の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に JFH-1 の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入した細胞株を樹立した。この株からは構造蛋白と replicon RNA が分泌され、蔗糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白と RNA は比重が 1.15 前後の分画に回収された。この画分の構造蛋白と RNA の大部分がヘパリンカラムに結合したことから、同様に何らかの構

造体を形成していることが示唆された。現在、この構造体の電顕観察と感染性の有無を調べている。

5. HCV 感染に係わる宿主因子の解析

従来の Huh7 細胞から限界希釈法により 70 クローンの亜細胞株を得た。HCV の感染性を比較すると親株よりも最大 10 倍程度まで感染性の良いクローンや感染性のより低い細胞株、さらに感染性の全くない細胞株が存在することが明らかとなった。次にルシフェラーゼ遺伝子を持つレプリコンによる HCV 遺伝子の複製感受性を検討すると、複製感受性も様々な程度の細胞株が存在したが、感染感受性と複製感受性の間に相関関係はなかった。そこで、HCV の感染性に関与することが報告されている細胞表面マーカーを解析した。CD81, SR-BI, LDLr について検討すると、CD81 の発現の有無が亜細胞株の感染感受性と相関していることが明らかとなった。つまり、CD81 の発現がある細胞株は感染感受性があり、CD81 の発現のない細胞株では感染性が見られなかった。さらにレプリコンによる解析により、CD81 を発現していない細胞は複製感受性が高かった。そこで、CD81 を発現せず、感染感受性の無い細胞株 (Huh7-25) に CD81 発現プラスミドのトランスフェクションにより、CD81 を強制発現すると感染感受性が回復した。さらに CD81 を持続して発現する細胞株を樹立した (Huh7-25-CD81)。この Huh7-25-CD81 はこれまでに報告された Huh7.5.1 などの細胞よりも高い感染感受性を示し、ウイルス培養に適した細胞株であることが明らかとなった。

6. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

ウイルスを大量に取得するためにはHCV感染細胞を平面培養するよりもマイクロキャリア上で細胞を培養して、スピナー培養を行うことで、効率よく、高濃度のウイルス培養液を取得できると考えられる。そこで前項で樹立したHuh7-25-CD81をマイクロキャリア上に培養する条件を検討した。しかし、至適条件下でHuh7-25-CD81をマイクロキャリア上で培養し、HCVを感染させると、細胞増殖が停止して培養液中のウイルス産生量があまり増加しないことが明らかとなった。そこで、ウイルス感染細胞の培養条件の至適化を試みている。

7. Genotype 1b の株由来構造蛋白をもつキメラウイルスの作製

3種類の遺伝子型1b HCV株の構造領域遺伝子をJFH-1株の全長遺伝子に組み換えて、キメラウイルス遺伝子を作製した。全長RNAを合成して、Huh7細胞にトランスフェクションして、ウイルス産生を検討した。3種類のキメラウイルスの中で1種類のキメラウイルスは持続的にウイルスが産生されて、その産生量は遺伝子型2aのウイルスに匹敵した。このキメラウイルスはHuh7細胞に感染性を示した。現在このキメラウイルスの大量取得を試みている。

D. 考察

HCVのワクチン開発が進んでこなかった理由はHCVのウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1株を用いた実験系により

感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。

ウイルス粒子を含む培養液を大量に調整して、ウイルス粒子を精製する方法を構築した。現在の方法によって約2000倍から8000倍程度の精製が可能である。ウイルス粒子の精製法の確立はワクチン開発に必須であるとともに、HCV粒子の性状解析にも非常に重要である。精製法をさらに改善していくことと、ウイルス培養時によりタイターの高い培養方法を用いることにより、より精製度の高いウイルス液が得られることは他のウイルスの例からも明らかである。従って、より効率の良いウイルス培養法の開発も本研究において重要であると考えられる。精製ウイルス粒子の観察によりウイルス粒子の可視化が可能となった。さらに精製度を高めて、ウイルス粒子の構造解析へつなげていくことが期待される。ウイルス粒子の構造解析は新たな抗ウイルス薬開発につながる可能性があり重要である。また、ウイルス粒子液中に含まれる蛋白質を同定すると多くの細胞性蛋白質が同定された。この結果からはウイルス液の精製度がまだ不十分なことが推測されるとともに、ウイルス粒子に様々な細胞性蛋白質が吸着、または粒子中に含まれていることが示唆された。従って、ウイルスの精製度をより向上させて、特異的にウイルス粒子と共存する細胞性蛋白質を同定することが重要であると考えられた。この解析はウイルス粒子の生成過程に関与する宿主因子の解明につながることを期待できる。

精製ウイルス粒子を用いてマウスの免疫を開始した。精製ウイルス蛋白による免疫ではウイルスに対する抗体の誘導は報告されている。ウイルス粒子を用いた免疫により、どのような抗

体が誘導されるかを検討していく必要がある。
強い中和活性を持つ抗体が誘導されれば、モノクローナル抗体の樹立も試みる必要がある。

さらに本研究では、HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV の virus-like particles の作成を最終的な目標としている。HCV の構造蛋白を供給する方法として、昨年度は組換えワクチニアウイルスを用いる方法と薬剤耐性プラスミドを用いる方法の2つを検討したが、組換えウイルスを用いた場合には精製した HCV-LPs にワクチニアウイルスが少量ではあるが混入するため、VLP の感染性を検討することが困難であった。従って本年度は薬剤耐性プラスミドを subgenomic replicon を保持する細胞に導入する方法のみを検討した。その結果、構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認され、この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心で native な HCV 粒子と類似の比重の画分に集積していることが見出された。また、同じ画分から subgenomic replicon RNA も検出された。このことから、いずれの方法で構造蛋白を供給した場合も発現蛋白は HCV 粒子様構造を取っていることが示唆され、また、ウイルス様粒子中には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。この推定構造が正しければ、感受性細胞に一過性に感染し、細胞内で増殖しないウイルス様粒子である可能性が高く、目的とする粒子が取得できたことになる。今後は、粒子様構造を正しく取っているかどうかのさらに詳細な解析を行い、証明できれば感染性を有するかどうかの検討を行う。本粒子は感染性は有するが増殖せず、HCV 蛋白をすべて感染

細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチンとして用いることができると考えられる。また、構造蛋白や replicon RNA に変異を入れ、粒子形成に重要な部分の解析を行うことも検討している。

Huh7 細胞をクローニングすることにより、親細胞株中には感染感受性の異なる亜細胞株が存在していることが明らかとなった。感染感受性を決定する重要な宿主因子は細胞表面の CD81 分子であった。また、ウイルス複製感受性は逆に CD81 発現の無い亜細胞株で高いものが見られた。そこで、CD81 を強制発現して得られた Huh7-25-CD81 細胞は感染感受性が高く、ウイルス培養に適していると考えられた。HCV の感染感受性にはさらに多くの宿主因子が関与していると考えられている。最近では肝細胞のタイトジャンクションに発現する Claudin-1 という分子が HCV 感染に重要であることが報告された。従って、関与する宿主因子の発現を調整することにより感染感受性をコントロールできると考えられる。また、ウイルス粒子を大量に取得するために、より効率の良い感染細胞培養法を開発する必要がある。今回はマイクロキャリア上での感染細胞培養を試みた。感染前と感染後で培養の至適条件が異なることが示唆された。従って、今後は感染細胞の至適培養条件を探索することが必要であると考えられた。

異なる遺伝子型の感染性ウイルス粒子を取得することは HCV ワクチン開発において重要である。今回の検討で、ウイルス粒子産生効率の良い遺伝子型 1b のキメラウイルスを作製することができた。培養細胞に適したウイルスゲノ

ム配列を明らかにすることが必要である。

E. 結論

今年度の研究により、感染性ウイルス粒子を大量に取得して精製する方法が確立できた。精製ウイルス粒子の性状を解析し、さらにマウスに免疫を開始した。中和抗体の誘導能を検討していく。HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV 様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。HCV の粒子形成や細胞への吸着、侵入過程の解析に好適であり、また優れたワクチン候補であると考えられる。さらに、HCV 感染感受性の高い細胞株 (Huh7-25-CD81) を樹立し、ウイルス粒子を大量に取得するための感染細胞培養法を検討した。遺伝子型 1b の構造領域遺伝子を持つキメラウイルスを作製した。以上の成果はワクチン開発に重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. D Akazawa, T Date, K Morikawa, A Murayama, M Miyamoto, M Kaga, H Barth, T F Baumert, J Dubuisson, T Wakita. CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. J Virol. 2007 in press.
2. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. J Virol. 2007 in press.

3. K Morikawa, Z Zhao, T Date, M Miyamoto, A Murayama, D Akazawa, J Tanabe, S Sone, and T Wakita. The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. J. Med. Virol. 2007 in press.
4. E Larrea, JI Riezu-Boj, L Gil-Guerrero, N Casares, R Aldabe, P Sarobe, MP Civeira, JL Heeney, T Wakita, F Borrás-Cuesta, JJ. Lasarte, J Prieto. Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus Infection. J Virol. 2007. 81(7):3662-6.
5. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. Hepatology Research, 2007 in press
6. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. J Virol. 2007 81(3):1174-85.
7. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. Nature Protocols, 2006 1(5): 2334-2339.
8. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. Virology Journal 2006, 3:89

9. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. Arch Virol. 2007 152(3):457-61.
10. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. J Virol. 2006 81(1):309-18
11. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, Wakita T, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouillé. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. J Virol. 2006. 80(14):6964-72.
12. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. J Virol. 2006. 80(9):4633-9.
13. N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. J Virol. 2006. 80(9):4510-20.
14. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. Future Virology, 2006, 1: 519-525.
15. Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.
16. 脇田隆字 ウイルス性肝炎 増刊号・ICPのためのウイルス学・臨床と微生物 2006, 33(10) 611-615
17. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字 HCV増殖機構の解明 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 143-6
18. 脇田隆字 HCV発現細胞系の確立 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 147-51
19. 脇田隆字 JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩 医学のあゆみ 2006, 218(10) 883-888
20. 脇田隆字 C型肝炎ウイルス 分子細胞治療 2006 Vol.5, p364-367
21. 脇田隆字 HCVレプリコンシステム カレントセラピー、2006, 24(8), 67
22. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. Microbes and Infection, in press.
23. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. Archives of Virology, in press.
24. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by

ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).

25. Nakai K., Kimura-Someya T., Okamoto T., Ishii K., Lim C.K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K. and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of Virology* 80: 11265-11273 (2006)

26. Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 253-258 (2006)

27. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596 (2006)

28. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).

29. Mizutani T., Fukushi S., Ishii K., Sasaki Y., Kenri T., Saijo M., Kanaji Y., Shiota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-265 (2006).

30. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006).

31. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380 (2006).

32. 李天成、石井孝司、武田直和 E 型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒 遺伝 印刷中

33. 石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218 : 839-844 (2006)

34. 石井孝司、李天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用 感染・炎症・免疫 36 : 44-47 (2006)

2. 学会発表

1) 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」、第8回仙台Liver Meeting、仙台エクセルホテル東急、(2006, 6.24)

2) 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルス培養系の構築とその応用」、第7回横浜青葉・緑消化器病研究会、青葉台フォーラム、(2006, 7.21)

- 3) 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系の構築とその応用」、第 4 回 湯沢リバーシンポジウム、NASPA ニューオータニ、(2006, 9. 9)
- 4) 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルス培養系の開発とその展望」、第 14 回 Schering-Plough Liver Forum (Tokyo)、赤坂プリンスホテル、(2006, 11. 18)
- 5) 脇田隆字, ランチョンセミナー「C 型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」
日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 6) 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系開発とその応用」、第 1 0 回東海ウイルス感染症研究会、安保ホール (名古屋市)、(2007, 1. 13)
- 7) 脇田隆字, 「C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系の開発とその応用」、第 1 3 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、笹川記念会館、(2007, 1. 19)
- 8) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆字、「H C V 感染に関与する宿主因子の探索」、第 2 回広島大学肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館(2006, 6. 18)
- 9) 森川賢一、脇田隆字 C型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における H S P G および C D 8 1 の関与 第 4 2 回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26) ワークショップ 1 「ウイルス型肝炎研究の最前線」
- 10) 脇田隆字、相崎英樹、鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関与する宿主因子の解析 第 1 0 回日本肝臓学会大会、札幌(2006, 10.11-12) シンポジウム 6 「ウイルス肝炎進展因子の解明」
- 10) 関根裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆字、渡辺守、C型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討、第 4 2 回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5. 25-26)
- 11) 棟方翼、脇田隆字、野本明男、C 型肝炎ウイルス (HCV) による自然免疫受容体 TLR3 の発現制御、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 12) 森田奈央子、野村知里、石橋真理子、楠美嘉晃、杉谷雅彦、脇田隆字、高山忠利、江角真理子、類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN と C 型肝炎ウイルス、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 13) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、脇田隆字、HCV 感染に関与する宿主因子の探索、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 14) 相崎英樹、原 弘道、井上 寧、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、マイケルライ、鈴木哲朗、HCV RNA 複製を調節する分子シャペロンの同定とその機能解析、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 15) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、RNA Polymerase I promoter/terminator 系を用いた感染性 HCV 粒子の作成、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)
- 16) 石橋真理子、脇田隆字、江角真理子、C 型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝

子 OASL の機能解析、日本ウイルス学会第 5 4 回
 学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)

17) 村山麻子、伊達朋子、森川賢一、赤澤大輔、
脇田隆字、HCV JFH-1 株の RNA 複製に必要な領
 域の同定、日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、
 名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)

18) 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭
 子、下地徹、高橋由利絵、阿部克俊、奈須純一、
 鈴木哲朗、脇田隆字、水本清久、宮村達男、E6AP
 依存性 HCV core 蛋白分解の分子認識機構の解析、
 日本ウイルス学会第 5 4 回学術集会、名古屋国
 際会議場(2006, 11. 19-21)

19) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢
 一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗、
 HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様
 粒子の形成と放出、日本ウイルス学会第 5 4 回
 学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11. 19-21)

20) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis
 Particles in vitro. 2nd international workshop on
 clinical pharmacology of hepatitis therapy.
 Vienna, Austria (2006, 4. 25).

21) T Wakita. In vitro cultivation of hepatitis C
 virus. Current strategy of new drug development
 for HCV. Biomedical Engineering Research
 Laboratories, Industrial Technology Research
 Institute, Hsinchu, Taiwan (2006, 5. 3).

22) T Wakita. Development of an Infectious HCV
 system JFH-1, a Fulminant Hepatitis. 2006 ASV
 Medical Virology Club Satellite meeting. Madison
 WI, USA (2006, 7. 1)

23) T Wakita. Production of Infectious Hepatitis C
 Virus in Cultured Cells. 12th International
 Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease.

Paris, France, on July 1-5, 2006.

24) T Wakita. HCV and cell culture-progress and
 problems. 13th International Meeting on
 Hepatitis C and Related Viruses. Cairns,
 Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

25) T Wakita. HCV replication Update. 17th
 Asian Pacific Association for the study of the
 Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan (2007,
 3. 27)

26) K Morikawa, T Date, A Murayama, M Kaga,
 D Akazawa, T Wakita.
 CHARACTERIZATIONS OF HIGHLY PURIFIED
 INFECTIOUS HCV PARTICLES PRODUCED IN
 CULTURED CELLS. 13th International Meeting
 on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns,
 Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

27) K Fukuda, I Shoji, M Shirakura, K Murakami,
 T Ichimura, R Suzuki, T Suzuki, T Shimoji, K Abe,
 J Nasu, Y Takahashi, S Sato, M Fukasawa, Y
 Yamakawa, M Nishijima, T Wakita, K Mizumoto,
 T Miyamura. Molecular determinants of E6AP-
 dependent degradation of hepatitis C virus core
 protein. 13th International Meeting on Hepatitis C
 and Related Viruses. Cairns, Queensland,
 Australia (2006, 8. 27-31)

28) T Masaki, R Suzuki, M Matsuda, T Miyamura,
T Wakita, T Suzuki. Production of infectious
 hepatitis C virus by using RNA polymerase I-
 mediated transcription. 13th International
 Meeting on Hepatitis C and Related Viruses.
 Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

29) H Aizaki, Y Inoue, M Matsuda, T Shimoji, M
 Lai, T Wakita, T Miyamura, T Suzuki.

Identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

30) A Murayama, T Date, M Miyamoto, K Morikawa, D Akazawa T Wakita. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

31) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Barth H, Baumert TF, Blum HE. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

32) D Akazawa T Date, K Morikawa, A Murayama, K Kaga, T Wakita CD81 expression is important for the heterogenous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

33) Machida M, Huang J, Wang CH, Kondo Y, Sung VMH, Wakita T, Lai MMC. Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses.

Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

34) Miyanari Y, Usuda N, Atsuzawa K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

35) K Ishii, B Zhang, J Li, M Shirakura, K Morikawa, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki. Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia (2006, 8. 27-31)

36) Kato T, Heller T, Matsumura T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang JT. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

37) M Imamura, N Hiraga, M Tsuge, C Noguchi, S Takahashi, E Iwao, Y Fujimoto, C Tateno, M Honda, S Kaneko, T Wakita, K Yoshizato, K Chayama. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

38) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A,

Lavillette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

39) K Morikawa, T Wakita. Infectious hepatitis C virus particle binding to the Huh7 cell surface is mediated by glycosaminoglycans and its internalization by CD81. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (October 27-31, 2006)

40) 吉崎佐矢香、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の機能的解析とプロテオーム解析、日本分子生物学会、平成 18 年 12 月、名古屋。

41) 水谷哲也、福士秀悦、石井孝司、西條政幸、緒方もも子、酒井宏治、遠藤大二、座本 綾：SARS-coronavirus と Mycoplasma fermentans の共感染が細胞に及ぼす影響、第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 11 月、名古屋。

42) 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎 昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男：C 型肝炎のサロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染マウモセットの解析、第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 11 月、名古屋。

43) 水谷哲也、遠藤大二、白戸憲也、岡本道子、渡辺理恵、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、石

井孝司、鈴木哲朗、清水博之、高崎智彦、森川茂、西村秀一：新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法（LAV 法）、第 142 回日本獣医学会、平成 18 年 9 月、山口。

44) 横田隆徳、石井孝司、榎 昇、矢野純一、榎本信幸、明里宏文：siRNA の静脈注射による C型肝炎の遺伝子治療：サルを用いた C型肝炎サロゲートモデルによる有効性の検討、第 42 回日本肝臓学会総会、平成 18 年 5 月、京都。

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

1. 2004-242937・石井孝司他 12 名・財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・SARS-コロナウイルスタンパク質の全部もしくは一部のタンパク質をコードする DNA をゲノム DNA 上に保有し、該タンパク質を発現し得る組換えワクチニアウイルス DIs 株。・2004 年 8 月 23 日出願

2. 2004-225043・石井孝司他 4 名・独立行政法人医薬品医療機器総合機構・HCV ウイルスタンパク質をコードする DNA を保有する組換えワクチニアウイルス DIs 株、およびその利用・2004 年 8 月 2 日出願

3. 特願 2006-510335（対応する国際出願 W02005080575A1）

ヒト C型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びに C型肝炎ウイルス粒子の作製方法

4. 特願 2006-532743（対応する国際出願 W2006022422A1）

自律複製能を有する改変されたヒト C型肝炎ウイルスゲノム RNA

II. 分担研究報告

分担研究報告書

HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、 ワクチン免疫

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったことである。我々が分離した JFH-1 株により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、HCVの感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子産生系やウイルス様中空粒子産生系によるワクチン開発を試みる。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待されるので、HCVのワクチン開発が望まれている。

これまでにHCVのワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかったためである。LohmannらがCon1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかった。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複

製能力が非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

そこで本研究では、JFH-1株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1株によるリコンビナントウイルス粒子産生系によるワクチン開発を試みる。これは世界で初めてのnative HCV粒子を用いたワクチン開発である。

JFH-1株による実験系は、VSVやレトロウイルスのシュードタイプウイルスと異なり、HCVのnativeなウイルス粒子を用いる。さらにJFH-1株の構造遺伝子領域を他のウイルス株と組み換えることにより、他のウイルス株の構造蛋白をもつ感染性キメラウイルス粒子の産生が可能である。JFH-1株およびキメラウイルス粒子によりウイルス感染中和アッセイ系を樹立する。このシステムにより様々なHCV株による交差中和活性を検討することができる。また、これまでに開発されたHCV遺伝子を挿入した組み換えウイルス（

組み換えワクチニア、組み換えアデノなど)やDNA ワクチンなどによる中和抗体誘導能を検討可能となる。

さらに本研究ではリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。精製ウイルス粒子を動物に免疫して中和抗体価の誘導を検討する。さらに JFH-1 株の構造遺伝子領域をほ乳細胞で発現させると、培養液中にウイルス様中空ウイルス粒子を分泌する。ウイルス様中空粒子を大量に回収、精製する方法を開発する。その免疫原性を検討する。最終的にチンパンジーに接種可能なワクチン作製を目指す。

B. 研究方法

1. ウイルス粒子の精製法の確立

シードウイルスを高感受性 Huh7 細胞に感染させて継代培養した。感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの 5-10 倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて培養し、ウイルス粒子を含む培養液を回収した。限外ろ過、しょ糖密度遠心、ヘパリンカラムを段階的に組み合わせることにより、ウイルス粒子の精製法を確立した。

2. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルス液中に含まれるウイルス粒子を形態学および生化学的に解析した。電子顕微鏡によりウイルス粒子形態を観察した。蛋白質電気泳動および質量分析によりウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。さらに精製ウイルス粒子液をアジュバントと共にマウスに免疫した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. ウイルス粒子の精製法の確立

JFH-1 株または J6/JFH-1 キメラウイルス株の合成 RNA を Huh7 細胞にトランスフェクションしてシードウイルスを回収した。このシードウイルスを Huh7 細胞または Huh7.5.1 細胞に感染させて継代培養した。ウイルス粒子を含む培養液を回収するために、感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの 5-10 倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて継代培養した。さらにウイルス液に含まれる蛋白量を減らすために、培養液回収には FCS 濃度を 2% の培養液を使用した。回収したウイルス液はまずフィルターで濾過して、細胞のデブリスなどを取り除いた後に、分子量カットオフ 100 kD の限外ろ過膜を用いて低分子の夾雑物を除去すると同時に濃縮した。この濃縮ウイルス液中のウイルス分画をしょ糖密度遠心法

により回収した。さらに感染性ウイルスを吸着するヘパリンカラムによりウイルス粒子をさらに精製した。精製前の原液と比較して、2000倍から8000倍程度の精製が可能となった。

2. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルスを電子顕微鏡により観察すると、直径50－60nmの球状粒子を観察できた。さらに免疫電顕法により、ウイルス表面蛋白質に対する抗体がこの球状ウイルス粒子に吸着することが明らかとなった。また、精製ウイルス粒子を電気泳動して、染色および質量分析によりウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。ウイルス蛋白質と共に多くの細胞性蛋白質が同定された。これら細胞性蛋白質の存在意義をさらに検討中である。

精製ウイルス粒子をアジュバントと共にマウスに免疫した。アジュバントと混和することによりウイルスの感染性が不活化されることを確認後、マウスに投与した。複数回の投与後、マウスの免疫反応を検討中である。中和抗体の産生などが期待できる。

D. 考察

HCVのワクチン開発が進んでこなかった理由はHCVのウイルス培養系が存在しなかったことである。JFH-1株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。

ウイルス粒子を含む培養液を大量に調整して、ウイルス粒子を精製する方法を構築した。現在の方法によって約2000倍から8000倍程度の精製が可能である。ウイルス粒子の精製法の確立はワクチン開発に必須であるとともに、

HCV粒子の性状解析にも非常に重要である。精製法をさらに改善していくことと、ウイルス培養時によりタイターの高い培養方法を用いることにより、より精製度の高いウイルス液が得られることは他のウイルスの例からも明らかである。従って、より効率の良いウイルス培養法の開発も本研究において重要であると考えられる。精製ウイルス粒子の観察によりウイルス粒子の可視化が可能となった。さらに精製度を高めて、ウイルス粒子の構造解析へつなげていくことが期待される。ウイルス粒子の構造解析は新たな抗ウイルス薬開発につながる可能性があり重要である。また、ウイルス粒子液中に含まれる蛋白質を同定すると多くの細胞性蛋白質が同定された。この結果からはウイルス液の精製度がまだ不十分なことが推測されるとともに、ウイルス粒子に様々な細胞性蛋白質が吸着、または粒子中に含まれていることが示唆された。従って、ウイルスの精製度をより向上させて、特異的にウイルス粒子と共存する細胞性蛋白質を同定することが重要であると考えられた。この解析はウイルス粒子の生成過程に関与する宿主因子の解明につながることを期待できる。

精製ウイルス粒子を用いてマウスの免疫を開始した。精製ウイルス蛋白による免疫ではウイルスに対する抗体の誘導は報告されている。ウイルス粒子を用いた免疫により、どのような抗体が誘導されるかを検討していく必要がある。強い中和活性を持つ抗体が誘導されれば、モノクローナル抗体の樹立も試みる必要がある。

E. 結論

1. ウイルス粒子の産生法と精製法を確立した。