

- The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J. Biol. Chem.* 276:42389–42400.
9. Li, T. C., N. Takeda, and T. Miyamura. 2001. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 19:3476–3484.
  10. Li, T. C., Y. Suzuki, Y. Ami, T. N. Dhole, T. Miyamura, and N. Takeda. 2004. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 22:370–377.
  11. Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71:7207–7213.
  12. Magden, J., N. Takeda, T. C. Li, P. Auvinen, T. Ahola, T. Miyamura, A. Merits, and L. Kaariainen. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J. Virol.* 75:6249–6255.
  13. Niikura, M., S. Takamura, G. Kim, S. Kawai, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, T. C. Li, N. Takeda, and Y. Yasutomi. 2002. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* 293:273–280.
  14. Olson, A. J., G. Bricogne, and S. C. Harrison. 1983. Structure of tomato bushy stunt virus. IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171:61–93.
  15. Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann, and M. K. Estes. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:287–290.
  16. Purcell, R. H., and S. U. Emerson. 2001. Hepatitis E virus, p. 3051–3061. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
  17. Robinson, R. A., W. H. Burgess, S. U. Emerson, R. S. Leibowitz, S. A. Sosnovtseva, S. Tsarev, and R. H. Purcell. 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 12:75–84.
  18. Schofield, D. J., J. Glamann, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2000. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J. Virol.* 74:5548–5555.
  19. Stewart, L. M. D., and R. D. Possee. 1993. Baculovirus expression vectors, p. 227–256. *In* A. J. Davidson and R. M. Elliotts (ed.), *Molecular virology: a practical approach*. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
  20. Takamura, S., M. Niikura, T. C. Li, N. Takeda, S. Kusagawa, Y. Takebe, T. Miyamura, and Y. Yasutomi. 2004. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* 11:628–635.
  21. Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185:120–131.
  22. *Virus Taxonomy*. 2002. <http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/Ictv/fr-fst-g.htm>.
  23. Wickham, T. J., and G. R. Nemerow. 1993. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* 9:25–30.
  24. Xiaofang, L., M. Zafrullah, F. Ahmad, and S. Jameel. 2001. A C-terminal hydrophobic region is required for homo-oligomerization of the hepatitis E virus capsid (ORF2) protein. *J. Biomed. Biotechnol.* 1:122–128.
  25. Xing, L., K. Kato, T. Li, N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R. H. Cheng. 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 265:35–45.
  26. Yarbough, P. O., A. W. Tam, K. E. Fry, K. Krawczynski, K. A. McCaustland, D. W. Bradley, and G. R. Reyes. 1991. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 65:5790–5797.
  27. Zafrullah, M., M. H. Ozdener, S. K. Panda, and S. Jameel. 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* 71:9045–9053.
  28. Zhong, Y., J. Cheng, Y. Liu, J. Dong, J. Yang, and L. Zhang. 2000. Expression of human single-chain variable fragment antibody against non-structural protein 3 of hepatitis C virus antigen in *e. coli*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 8:171–173. (In Chinese.)

# 輸血，血液製剤の安全性の現状

岡田 義昭 水沢左衛子 種市麻衣子 梅森 清子 斉賀 菊江

血液製剤というと、一般的には血漿分画製剤を指すことが多いが、正確には輸血に用いられる赤血球濃厚液，濃厚血小板液，新鮮凍結血漿等の成分製剤と，血漿から製造される血漿分画製剤の総称である。過去に凝固因子製剤によって HIV や HCV (C 型肝炎ウイルス) の感染が発生し，大きな社会問題になった。また，かつては受血者の約 50% が輸血後肝炎になった信じられないような時代から，年間百数十万件の輸血によって数十例の肝炎 (疑い例を含む) 感染にまで激減した現在を考えると，確かに安全性は飛躍的に向上したといえる<sup>1)</sup>。しかし，血液製剤は新薬事法において「特

定生物由来製品」に指定され，各医療機関では投与記録の 20 年間の保管と使用にあたっては，患者へのリスク等の説明が求められており，今後もさらなる安全性の向上を目指すことが求められている。

本稿では，輸血用血液および血漿分画製剤の安全性確保のために実施されている，対策の現状を解説したい。

## 輸血の安全性の現状

日本において，輸血用血液は献血者の善意によって無償で提供され，日本赤十字社の血液センタ

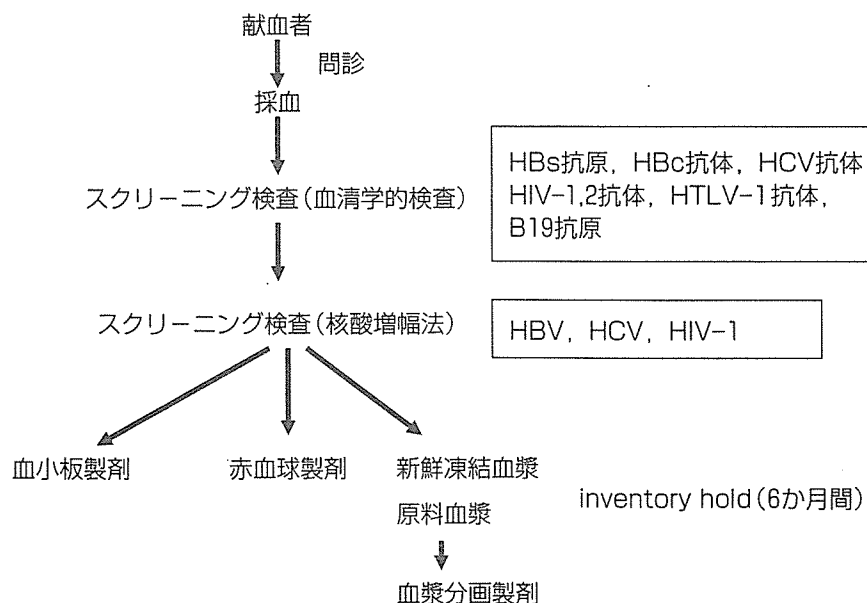


図1 血液製剤の製造工程

おかだ よしあき，みずさわ さえこ，たねいち まいこ，うめもり きよこ，さいが きくえ：国立感染症研究所 血液・安全性研究部 連絡先：☎ 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

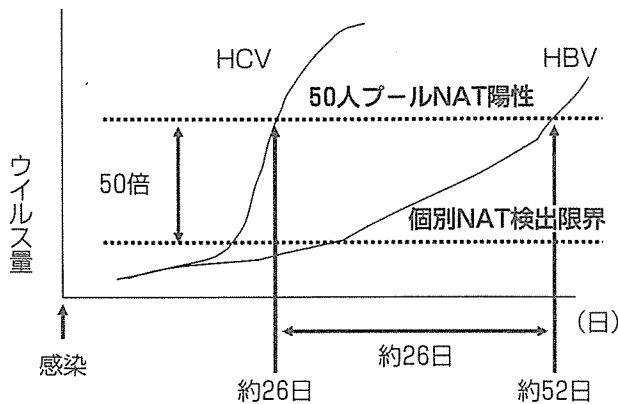


図2 ミニプール(50人)での NAT 検出限界

一で各成分製剤となり、医薬品として医療機関に提供されている。採血から医療機関に供給されるまでに取られている安全性を確保するための対策を図1に示す。最初に、問診によって肝炎や輸血等の既往歴、海外への渡航歴、脳外科手術の既往、伝染性紅斑の既往、入れ墨やピアスの有無、不特定多数との性的接触の有無等がチェックされる<sup>2)</sup>。これによって、マラリアやvCJD(変異型クロイツフェルト・ヤコブ病)などのスクリーニングされていない(スクリーニング法のない)感染症や感染症のリスクを持つ供血者、さらにHIVの検査目的の供血者からの採血を防止している。

しかし、問診で本当のことを申告してくれているのか、確認することは困難である。実際、一般の人々のHIV抗体陽性率より、献血者における陽性率のほうが高いことが指摘されたこともあった。感染初期には、後で詳細に解説するが、抗体もウイルス遺伝子も検出されない期間(window期と呼ぶ)があり、現在の技術を持ってしても、完全にはウイルスが混入した血液を除外できないからである<sup>3)</sup>。そこで、平成16年10月からは献血受付時に運転免許証等によって本人であることを確認し、偽名による検査目的の献血を防ぐ対策が実施されている<sup>2)</sup>。

採血された血液は図1に示すように、血清学的検査によって各種ウイルス感染の有無が検査される。1999年6月までは、輸血用血液は血清学的検査で陰性の血液が医療機関に供給されていた。しかしHCVやHIVは、感染初期では感染して

いても抗体が陽性とならず(血清学的window期と呼ぶ)、輸血に用いられる危険性があった<sup>3,4)</sup>。日本赤十字社では1999年7月からは東京都内で採血された血液、同年10月からは全献血を対象にHBV(B型肝炎ウイルス)、HCV、HIV-1の3つのウイルスを対象にした核酸増幅検査(nucleic amplification test: NAT)をスクリーニング検査として導入した<sup>1)</sup>。

NATは供血者の検査用血液をある人数分集めて核酸抽出用の検体とし(これをミニプールという)、核酸の抽出、増幅、ウイルス遺伝子の検出を行う検査である。理想的には供血者ごとに実施することが必要だが、高感度であることから、世界的に見てもミニプールで実施している(コストと検査結果が出るまでの時間的制約もある)。1999年7月~2000年1月までは500人のプール、2000年2月~2004年7月までは50人プールでNATを実施し、2004年8月からはさらに安全性を向上させるために、20人プールに変更した<sup>2)</sup>。

一方、問題点として、50人または20人プールを作ることによってウイルスの濃度が希釈され、ミニプールでは陰性だが供血者ごとのNATでは陽性を示す例が報告されている。これらはNATを用いてもウイルス量が少ないために検出不可能な期間(NATのwindow期)が存在すること(最近では、単にwindow期と呼ばれている)や、極微量のウイルス血症を呈する持続感染者が存在するためである。特に、HBVはC型肝炎ウイルス(ウイルスのダブリングタイムが約6~21時間<sup>5)</sup>)やHIV(同10~20時間<sup>6)</sup>)に比較して2.5~3.7日と、ウイルスの増殖する速度が遅い<sup>7)</sup>。そのため感染してから50または20人プールのNAT検査で陽性になるまでの期間が長く、個々の供血者のNATでも感度以下の陰性になることがある。その結果としてNATをすり抜けてしまうことがある。

図2は、Schreiberらの報告とウイルスのダブリングタイム等からミニプールNAT陽性と個々のNAT陽性になる時期を、HBVとHCVについて模式的に比較した図である。さらにわが国ではB型肝炎ウイルスの感染率が高いこと、異性

間感染によって新たな感染が生じていること等から、NATを導入しても、輸血によってHBVに感染する残存リスクは、HCVやHIVに比べて高い。

しかし、残存リスクをできるだけ低下させ輸血の安全性向上のために、ある時点で供血者のウイルス感染や受血者の感染が判明したときに、供血者の過去に遡って感染の有無を調べ、該当する血液由来の成分製剤や原料血漿が保管されていた場合(新鮮凍結血漿や原料血漿は6か月の保管を実施している)には破棄することによって、感染の拡大を予防し、受血者の輸血による感染を早期に発見・治療を開始することは重要である。具体的にどのように調査を実施するのか、ガイドラインが整備された。

また、受血者の感染を早期に発見するため、および輸血との因果関係を明確にするために、輸血前後のウイルス検査(HBV, HCV, HIV)が保険で認められるようにもなった。さらに、遡及調査のために血液製剤に使用されたすべての献血の各々の一部が、検査用として10年間保存されている。

## 血漿分画製剤の安全性の現状

### 1. 原料血漿の安全性の現状

献血血を原料とする場合は、輸血に準じた基準をクリアした血漿が原料血漿となる(図1)。一方、血漿分画製剤の国内自給が目標とされ、凝固因子製剤や静注用グロブリン製剤などの自給率は向上したが、アルブミン製剤や加熱ヒト血漿蛋白製剤などは、依然、輸入製剤の割合が多い。これら輸入製剤は主に「非献血」由来の血漿から製造されている。

「非献血」とは、簡単に言えば有償で採血された血液(売血)である。過去に凝固因子製剤の多くがこれら有償の血漿から製造され、投与された多くの患者がHIVに感染し、大きな社会問題となった。現在の有償での採血の場合、血漿に混入するウイルスを可能な限り少なくするために、問診と血清学的検査(HBV, HCV, HIV-1, 2),

NAT(日本向けの製品の場合はHBV, HCV, HIV-1)が導入されている。

NATは高感度であるが、感度や特異性などの精度管理が重要である。そのための国際標準品が整備され、国際的に差が生じないようになっている(詳細は総説を参照のこと<sup>8)</sup>)。

さらに、window期が存在することから、window期の血漿を除外するために、最初の採血で取った血漿は、たとえすべての検査が陰性であっても使用しないで冷凍保管し、ある一定の間隔をおいて再び採血した時の検査結果が陰性であった場合に、最初の血漿を製造に用いる方法がとられている(これをquarantineという)。これは有償の供血者は反復して供血するように血液バンクから求められているからである(来ない供血者血漿は破棄される)。このようにして、献血・非献血とも原料血漿にウイルスの混入が可能な限り少なくなるような対策を導入している。

### 2. 血漿分画製剤の製造工程とウイルス除去・不活化について

上で述べた検査や貯留等を経て集められた原料血漿は、国内製造所だと3,000 l前後(1万から数万人分に相当)がタンク内で混合され、図3に示すようにアルコール濃度とpH(図ではpHとアルコール濃度の数値は省略してある)、さらにイオン強度による溶解度の違いによって、種々の分画に粗精製される(Cohnの低温エタノール分画法)。1つの原料血漿タンクから1つの製剤が作られるのではなく、血漿に含まれている各血漿成分が精製され、様々な分画製剤が製造される。

さらに、粗精製された各分画は含有する成分量によっては別のタンクで粗精製されたものと混合され、さらなる精製とウイルスの除去・不活化工程を経て、最終的に1,000~1万本の容器に分注される(この一群の製品は品質的に同等と考えられるのでロットと呼ばれている)。このように、血漿分画製剤は多数の供血者の血漿から製造される。そのため検査法の進歩した現在でも、検査感度以下のウイルスの混入、検査されていないウイルスや未知のウイルスが原料血漿に混入する可能

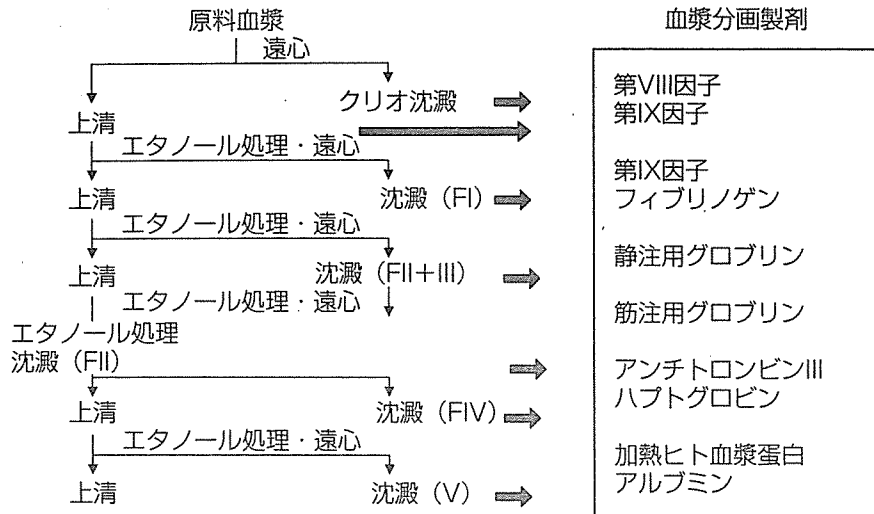


図3 Cohnの低温エタノール分画法による血漿の分画

性が常に存在する。

もし、これらの原料血漿がウイルスに汚染していた場合には、多くの投与を受けた患者が感染する可能性がある(Cohnの低温エタノール分画法がエンベロープを持つウイルスの不活化に有効であったため、製剤によって感染するリスクは異なるが)。これらのリスクから、血漿分画製剤の安全性を確保するためには、種々のウイルス除去・不活化法を製造工程に導入することが必要であり、実際に導入されている。代表的なウイルス除去・不活化法として、加熱処理①乾燥加熱：最終製品としてバイアルに充填し、凍結乾燥後加熱する。65°Cで96時間の加熱をしている製剤が多い。②液状加熱：製剤が液体の状態での加熱処理する。パスツリゼーションとも呼ばれている。60°Cで10時間加熱することが多い)、有機溶媒/界面活性剤処理(solvent/detergent処理：S/D処理と呼ばれる。トリ-n-ブチルフォスフェートなどの有機溶媒とTween 80などの界面活性剤を添加してウイルスを不活化する)、ウイルス除去膜処理などがある。

ウイルスはエンベロープと呼ばれる細胞膜に近い組成の脂質の膜を有するウイルス(HBV, HCV, HIV等)と持たないウイルス[HAV(A型肝炎ウイルス)、パルボウイルスB19等]とがあり、アルコール(Cohnの低温エタノール分画法)

やS/D処理はエンベロープを持つウイルスの不活化にきわめて有効であるが、その一方で持たないウイルスに対しては無効である。加熱処理はウイルス全般に有効であるが、エンベロープを持つウイルスに比較して、持たないウイルスは抵抗性を示すことが多い。

1つのウイルスの除去・不活化工程では限界があるため、原理が異なる2つ以上の除去・不活化工程を製造に組み込むことが企業に求められている<sup>9)</sup>。また、各除去・不活化工程がどの程度のウイルスの除去・不活化能力を持つものか、各血漿分画メーカーでは評価が求められる(この試験をウイルス・プロセスバリデーション試験という)、工程によるウイルス量の減少はウイルスリダクションファクター(virus reduction factor)として評価できる。

主な工程において各々評価することで、分画製剤の製品ごとの製造工程全体のウイルスリダクションファクターが計算される。用いるウイルスや試験法によって、結果の数値が大きく変動する可能性があるため、用いるウイルスの種類や試験法を定めたガイドラインが作成され、それに沿って除去・不活化の評価がされている。

平成15年までは、遡及調査等によって原料血漿にHBV, HCV, HIVなどのウイルスが混入していたことが判明した場合(製造時の段階では

核酸増幅法の検出感度以下)には、該当する血漿から製造された血漿分画製剤はすべて回収されていた。しかし、原料血漿におけるミニプールによる核酸増幅法による検査、およびウイルスの除去・不活性化工程におけるウイルス・プロセスバリデーション試験の評価が整備されたこと等を考慮し、除去・不活性化工程によって9 log以上のリダクションファクターが得られる製剤においては、ミニプールによる核酸増幅法の検出限界以下の極微量のHBV, HCV, HIVが混入していても、製造工程中で十分に除去・不活性化されることから、回収しないことになった<sup>10)</sup>。これによって十分な除去・不活性化が確認された製剤は、破棄されることなく有効に利用され、献血者の貴重な血液を無駄にすることがなくなった。

また、血漿分画製剤メーカーは、感染症や副作用が医療機関から報告があった場合には、随時厚生労働省に届けなければならない。また、感染症定期報告書を作成し、自社製品に関する世界を含めた情報を集め、定期的に報告するシステムになっている。これらによって、分画製剤による感染症発生を未然に防ぎ、安全性をさらに向上させることに貢献している。

## 将来への展望

血漿分画製剤では、エンベロープを持たないウ

イルスに対して有効な除去・不活化法、およびプリオン除去法の開発が今後必要と考えられる。輸血用血液に関しては、献血者に対しての啓発、window期をできるだけ短縮するような検査法の開発、ウイルスやプリオンの除去・不活化法の開発などが必要である。

## 文 献

- 1) 西岡久壽彌：B型肝炎・C型肝炎. 病原微生物検出情報 **23**(7)：163-164, 2002
- 2) 日本赤十字社ホームページより
- 3) Vrieling H, et al: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV negative blood transfusion. *Vox Sang* **68**: 55-56, 1995
- 4) Schreiber GB, et al: The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* **334**: 1685-1690, 1996
- 5) Nubling CM, et al: Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion* **42**: 1037-1045, 2002
- 6) Little SJ, et al: Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* **190**: 841-850, 1999
- 7) Whalley SA, et al: Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* **193**: 847-854, 2001
- 8) 岡田義昭・他：血液製剤の安全性確保のための核酸増幅検査 (NAT). *臨床検査* **48**: 1125-1130, 2004
- 9) 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン. 医薬発第 1047 号
- 10) 医食血発第 1107001 号

# 血漿分画製剤の安全性確保の現状

Viral safety for plasma derivatives



岡田義昭(写真) 梅森清子

Yoshiaki OKADA and Kiyoko UMEMORI

国立感染症研究所血液・安全性研究部

◎血漿分画製剤は数千～数万人の供血者からの血漿を混ぜ合わせた原料血漿から製造され、最終的に数千～1万本のまったく同一の品質を有する製剤となる。血漿分画製剤は高度に精製されているため、疾患の治療に必要な成分のみを補充することを可能にし、医療の発展におおいに寄与した。その一方、多くの供血者の血漿から製造されるため、原料となる血漿や最終製品にウイルスが混入する可能性は完全には否定できない。かつて凝固因子製剤によって HIV や HCV の感染が発生し、大きな社会問題になった。現在ではこのような感染を防止するために、①採血段階での問診や血液のスクリーニング(血清学的検査および核酸増幅検査)によって可能な限りウイルスが混入していない血漿を確保すること、②製造工程にすくなくとも2つ以上の異なる原理のウイルス除去・不活化工程を導入すること、が実施され、血漿分画製剤の安全性は飛躍的に向上した。しかし、ヒトの血液を原料としているため、感染症伝播のリスクを完全には排除することはできないことを認識し、適正使用することが重要である。



ウイルス除去・不活化, ウイルスクリアランス指数, モデルウイルス, 特定生物由来製品

## 原料血漿の安全性確保の現状

分画製剤の安全性を確保するためには、可能な限りウイルスなどの病原体が混入していない血漿を原料血漿として用いることが重要である。原料血漿は、日本赤十字社が採血した“献血由来の血漿”と海外で採血された“有償の血漿”とがあるが、最近では海外で採血された“有償の血漿”は抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤や抗破傷風ヒト免疫グロブリン製剤といった特殊免疫グロブリン製造用の原料血漿が血漿のまま輸入されている。一方、ヒト血清アルブミン製剤や加熱ヒト血漿蛋白製剤はその多くを海外に依存しているが、原料血漿を輸入して製造するのではなく、最終製品として輸入されていることが多い。血漿分画製剤の原料血漿の由来を明確にするために、献血由来の血漿で製造された製剤には“献血”“原産国日本”, 海外で採血された血漿で製造されたものには“非献血”“原産国〇〇……”と箱に明記され、区別できるようになっている。

安全性確保のために、献血血はその多くは全血で採血された後に遠心分離され、赤血球成分と血漿成分とに分けられ、輸血と同じ基準をクリアした血漿が原料血漿となる(図1)。赤血球はすぐに使用されるが、血漿成分は新鮮凍結血漿あるいは原料血漿として6カ月間保存される(貯留保管という)。その間に赤血球製剤を投与された受血者の感染症情報や供血者が再度献血した場合のウイルスマーカーの陽転化などの情報が集められ、疑わしい血漿は廃棄される。

“非献血”由来の有償血漿は、その多くがアメリカで採血された血漿である(ほかにヨーロッパ由来の血漿もある)。有償という“売血”の暗く危険なイメージがあるが、現在はFDAの基準を満たす血液センターだけが採血を認可されている。有償血の安全対策として問診と血清学的検査(HBV, HCV, HIV-1/2)やNAT(HBV, HCV, HIV-1)が導入されているが、NATにおいてもwindow期が存在するため、window期の血漿を除外するため

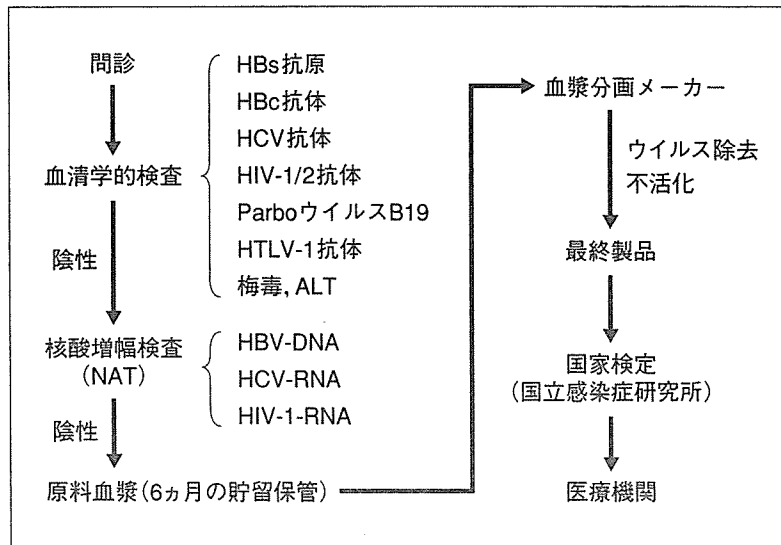


図 1 血漿分画製剤の安全性確保

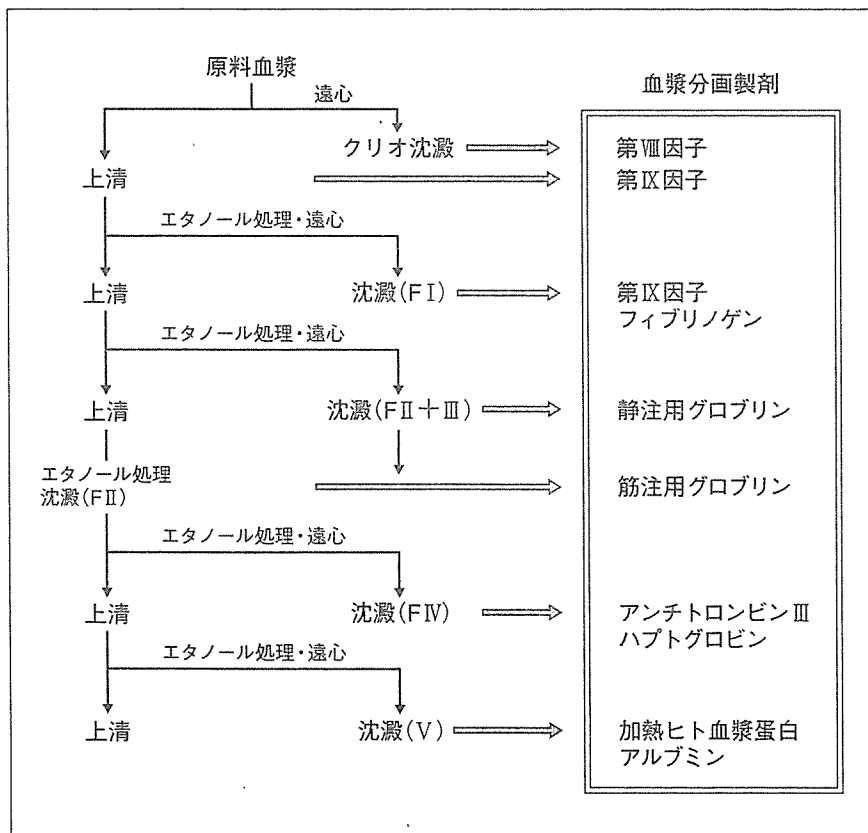


図 2 Cohnのエタノール分画法と血漿分画製剤

に、最初の採血でとった血漿はすべての検査が陰性であっても使用せずに冷凍保管し、ある一定の間隔をおいて(60日とホームページに明記している企業もある)、ふたたび採血したときの検査結果が陰性であった場合に最初の血漿を製造に用いるという安全対策を導入している企業が多い。これ

は有償の供血者は反復して供血するように血液センターから求められているからである(反復して供血に来ない者の血漿は破棄される)。

このようにして献血・非献血とも、原料血漿にウイルスの混入が可能なかぎり少なくなるような対策を導入している。



## ● 血漿分画製剤の製造工程での安全性確保の現状

### 1. 血漿分画製剤の製造工程

上述した検査や貯留保管などを経て集められた原料血漿は 3,000l 前後(数千人～数万人分に相当)がタンク内で混合され、図 2 に示すようにアルコール濃度、pH(図 2 では pH とアルコール濃度の数値は省略してある)、温度、さらにイオン強度による血漿蛋白の溶解度の違いによって種々の分画に粗精製される(Cohn の低温エタノール分画法)。粗精製された分画は(製剤によっては別のタンクで粗精製されたものと混合されることもある)、さらに精製とウイルスの除去・不活性化工程を経て最終的に数千～1 万本のバイアルに分注される(この一群の製品は品質的にまったく同等と考えられるので、ロットとよばれ、各製品に製造番号として記載されている。製品に何らかの問題が生じたときに、該当するロット番号の製品の回収や投与された患者の特定に役立っている)。

このように、血漿分画製剤は多数の供血者の血漿から同一の品質をもつ製剤が多数製造される。もしこれらの原料血漿がウイルスに汚染し、製造工程によっても十分に除去・不活性化されなかった場合、投与を受けた多数の患者が感染する可能性がある。前述したように血清学的試験や NAT が導入され、混入するウイルス(HBV, HCV, HIV, B19)は劇的に減少したが、NAT でも検出できない感染早期の window 期に採血された血漿や変異株の存在など、これらの検査をすり抜けてしまう場合やスクリーニングされていないウイルスの存在、さらに未知のウイルスが原料血漿に混入する可能性はつねに存在している。これらのリスクから血漿分画製剤の安全性を確保するためには、種々のウイルス除去・不活性化法を製造工程に導入することが重要である。

### 2. ウイルス除去・不活性化法

一般的なウイルス除去・不活性化法として、①加熱処理(1. 乾燥加熱：凍結乾燥後加熱する、2. 液状加熱：液体の状態で加熱処理する。パスツリゼーションともよばれている。60°Cで 10 時間加熱することが多い)、②有機溶媒/界面活性剤処理(solvent/detergent 処理：S/D 処理とよばれる。トリ-

n-ブチルフォスフェートなどの有機溶媒と Tween 80 などの界面活性剤を添加してウイルスを不活化する)、③ウイルス除去膜、などがある。

また、製剤特有なウイルス除去・不活性化法として、①アフィニティークロマトグラフィ(乾燥濃縮第Ⅷ因子製剤、乾燥濃縮第Ⅸ因子製剤、アンチトロニンⅢ製剤)、②スルホ化処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、③ポリエチレングリコール処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、④pH4 処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、⑤ペプシン処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)などがあり、各製剤の添付文書に記載されている。これらの処理工程は各製剤の製法上の特有な工程であるとともに、ウイルスの除去・不活性化が期待できる工程でもある。このほかに Cohn の低温エタノール分画法もウイルス除去・不活性化が期待できる。

ウイルスは、エンベロープとよばれる細胞膜に近い組成の脂質の膜を有するウイルス(HBV, HCV, HIV など)と、もたないウイルス(A 型肝炎ウイルス, Parvo ウイルス B19 など)とがある。S/D 処理はエンベロープをもつウイルスの不活性化にきわめて有効であるが、もたないウイルスに対してはまったく無効である。加熱処理はウイルス全般に有効であるが、エンベロープをもつウイルスに比較して、もたないウイルスは抵抗性を示すことが多い。また、ウイルス除去膜は物理学的にウイルスの大きさによってウイルスが除去できるため、エンベロープの有無にかかわらずきわめて有効な除去法である。当然ながら膜の穴の大きさが小さいほどウイルスの除去効率はやいが、製剤によっては成分となる蛋白の分子量などの違いによって効率よく濾過できないこともあり、用いられる除去膜の穴の大きさが限られる場合がある。ヒト免疫グロブリン製剤や第Ⅷ因子製剤など血漿分画製剤の多くでは 35 nm のものが使用されているが、アンチトロニンⅢ製剤などは 15 nm が使用されていることが多い。

### 3. ウイルスの除去・不活性化法の評価

血漿分画製剤の製造工程においてどの程度のウイルスの除去・不活性化が期待できるのかを評価することは、血漿分画製剤の安全性確保のうえからきわめて重要である。実際の工程にウイルスを投

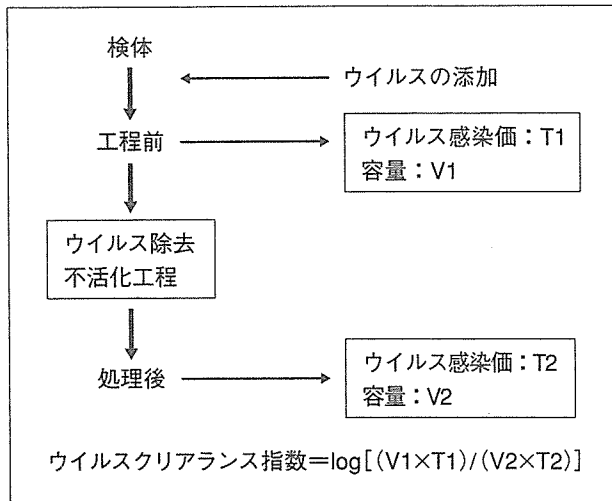


図 3 ウイルスの除去・不活化工程の評価法

入してウイルスの除去・不活化効率を評価することは現実的には不可能なので、工程のスケールを忠実に実験室レベルまで縮小した評価が実施されている。この試験をウイルスプロセスバリデーション試験という<sup>1)</sup>。用いるウイルスや試験法によって結果の数値が大きく変動する可能性があるため、用いるウイルスの種類や試験法を定めたガイドラインが作成され、それに沿って除去・不活化の評価がされている<sup>1)</sup>。

評価の概要を簡単に説明すると、評価する工程の処理前の検体に処理量の 10% 以下の容量のウイルス液を添加し、十分攪拌後、処理前の検体としてサンプリングする。その際に全体の容量を測定する。つぎに工程を忠実に再現したウイルスの除去・不活化を実施し、処理後の容量を測定し、検体をサンプリングする。処理前後のウイルス量(実際の評価では感染価を測定する)を測定し、処理前後の容量をかけることによってそれぞれのウイルス総量を求め、評価した工程での除去・不活化された値をウイルスクリアランス指数として求める(図 3) (「サイドメモ」参照)。

ウイルスの除去・不活化が期待できるおもな工程においてそれぞれウイルスクリアランス指数を評価し、これらの工程では評価されたウイルス量を独立的に除去・不活化することができるので、それぞれウイルスクリアランス指数をかけ合わせた値が製剤の全工程における除去・不活化できるウイルス量になる。評価するウイルスの種類は DNA ウイルスと RNA ウイルスにつきそれぞれエ

ンベロープのあり・なしの 4 つのウイルスについて、すくなくとも実施する必要がある。さらに、レトロウイルスも実施しているところが多い。評価に用いるウイルスは実際に原料血漿に混入する可能性のあるウイルスを用いるべきであるが、HBV や HCV は一般的に利用できる培養系が開発されていない。さらに、原料血漿に存在する抗体によってウイルスクリアランス指数が影響を受ける可能性もあるため、培養できないウイルスに関しては、動物由来の培養できるウイルスを“モデルウイルス”として評価に用いている。“モデルウイルス”は評価の対象となるヒト由来ウイルスとウイルス学的に近縁なウイルス、または同じ特性を有するウイルスを用いることになっている(表 1)<sup>1)</sup>。

ウイルスクリアランス指数の解釈として、同じ工程を繰り返してもウイルスクリアランス指数に加算されない。なぜならば、その工程の除去・不

サイド  
メモ

ウイルスクリアランス指数と  
ウイルスリダクション指数

製造工程で実施されているウイルス除去・不活化工程の機能を評価する際に、ウイルスクリアランス指数とウイルスリダクション指数が用いられており、一部では混乱している。評価のためのウイルス液を検体に添加するが、当然、添加するウイルスの感染価は事前に測定されているので、添加容量から添加した総ウイルス量は計算できる。これをウイルス除去・不活化実施後の総ウイルス量で割った数値がウイルスクリアランス指数とよばれている。一方、添加されたウイルスは添加された溶液の性状などによって一部は不活化されることがある。そのため、添加されたウイルスが溶液に十分攪拌された状態で測定されたウイルス感染価から工程前の総ウイルス量を計算し、工程後の総ウイルス量で割った値が、より実際の値を反映しているものと考えられ、ウイルスリダクション指数(virus reduction factor)とよばれている。しかし、本来ならばウイルスリダクション指数とよばなければならないはずなのに、日本においては習慣的にウイルスクリアランス指数とよばれている。図 3 もそれに従ったが、日本において、ウイルスクリアランス指数はウイルスリダクション指数を意味することに注意しなければならない。

表 1 ウイルスプロセスバリデーションに用いられるモデルウイルス

ウイルス	略号	ゲノム	envelope	サイズ	耐性
HIV-1		RNA	+	100 nm	低
ウシ下痢ウイルス	BVDV	RNA	+	50~70 nm	低
仮性狂犬病ウイルス	PRV	DNA	+	120 nm	中
脳心筋炎ウイルス	EMC	RNA	-	25~30 nm	中
A 型肝炎ウイルス	HAV	RNA	-	25~30 nm	高
ブタ Parbo ウイルス	PPV	DNA	-	18~24 nm	非常に高い

活化法に抵抗性を示すウイルスは同じ除去・不活化法を実施しても除去・不活化できない、との考えからである。また、1log 以上のウイルスクリアランスがなければ、ウイルスクリアランス指数として加算できないことになっている。

また、1つのウイルスの除去・不活化工程だけではウイルスの種類や量に対して限界があるので、原理が異なる2つ以上の除去・不活化工程を製造に組み込むことが求められている<sup>1)</sup>。これらによって血漿分画製剤のウイルスに対する安全性は飛躍的に向上した。

ところで、どれくらいのウイルスクリアランス指数が求められているのか、または必要なのであろうか。ウイルスの混入する頻度や種類によって一般的に言うことは困難であるが、わが国では2003年よりHBV, HCV, HIVに関して、9log以上のウイルスクリアランス指数が求められている<sup>2)</sup>。原料血漿のスクリーニングとしてNATが導入されているが、ミニプール(当時は50人の献血をプールして試験を実施していたため、ウイルス濃度は50倍に希釈される)での検査は陰性であっても個別のNATでは陽性を示す血液が原料血漿に混入する場合があります。混入した原料血漿から製造された血漿分画製剤は回収となっていた。しかし、NATや除去・不活化法の整備によって混入したウイルスが製造工程で十分に除去・不活化されれば安全性の確保は可能との考えから、検出感度から混入するウイルス量を計算し、除去・不活化工程によって十分なセーフティマージンの確保可能なウイルスクリアランス指数として9log以上となった。

#### 4. 感染症定期報告制度

血漿分画製剤の使用によるものと疑われる感染症が発生した場合、薬事法第77条の4の2の規

定に基づき、製造業者らは厚生労働大臣に報告する義務がある。さらに、安全性を向上させるために、2002年の薬事法および採血および供血あつせん業取締法の改正によって、2003年から生物由来製品の原料あるいは材料に関する感染症の最新の論文、およびその他により得られた知見に基づいて、該当する生物由来製品を評価し、その成果を感染症定期報告として定期的に報告制度ができた<sup>3)</sup>。これによって最終製品の投与による感染症発生だけでなく、原料となる血液を介する感染症の情報を集め、評価することが製造業者らに求められている。

#### 5. 特定生物由来製品としての指定

2002年の薬事法および採血および供血あつせん業取締法の改正によって血漿分画製剤は“特定生物由来製品”に指定され、他の医薬品と比べてとくに注意を要する製剤となった。そのため、“特定生物由来製品”とわかるように白地に黒枠、黒字をもって“特生物”と明記すること、投与に際して使用する必要性の説明やリスクを完全には排除できないなどの説明が求められている。また、患者の氏名、住所、製造番号、投与日などを医療機関は記録として20年間保存しなければならない<sup>4)</sup>。これによって使用する医療側も適正使用が求められることになった。

### ● 血漿分画製剤に対するさらなる感染症対策を

薬事法の改正によって、前述したような原料血漿や製造工程だけでなく、より幅広く感染症の情報を解析することによって、血漿分画製剤の安全性の確保と仮に感染症が発生した場合に被害の拡大を防ぐ処置がとられている。しかし、血漿分画製剤では、より安全性の高い製剤の製造が期待さ

れていることには変わりがない。また、感染症がグローバル化し、海外で問題となっている新興・再興感染症が短期間に国内に侵入・発生する危険性もあることから、ウイルスに対してより有効な除去・不活化が可能な新しい方法の開発(とくにエンベロープをもたないウイルスに対して)や、異常プリオンを除去する方法の開発が今後必要と考えられる。

## 文献

- 1) 厚生労働省：血漿分画製剤のウイルスに対する安

全性確保に関するガイドライン(医薬発第 1047号)。1999。

- 2) 厚生労働省：血漿分画製剤のウイルス安全対策(薬食血発第 1107001 号)。2003。
- 3) 厚生労働省：特定生物由来製品に係る使用の対象者への説明並びに特定生物由来製品に関する記録及び保存について(医薬発第 0515012 号)。2003。
- 4) 厚生労働省：生物由来製品に関する感染症定期報告制度について(医薬発第 0515008 号)。2003。

\* \* \*

## 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'-AGACTCGTGCTGGACTTCTCTCA-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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , polybrene <7500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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.

### Quantitative HBV entry assay based on the median entry endpoint dilution method

Internalized viral DNA was extracted as described above. A serial threefold dilution of the extracted DNA solution was performed. Then, a nested PCR targeting the P region was carried out with each attenuated DNA solution using a DNA thermocycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) as follows. Two primer sets were utilized as described before [33] (first set: 5'-CTGAATCCCGCGGACGACCC-3' and 5'-ACCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3', second set: 5'-GTCTGTGCCCTTTCATCTGCC-3' and 5'-AGATGAT-TAGGCAGAGGTGAAAAA-3'). The target sequences obtained from the first set were amplified in a reaction mixture (50  $\mu$ L) containing 1.0 U of Ex Taq polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan), 200  $\mu$ M dNTPs (Takara Bio), 25 pmol of each primer (Sigma Genosys, Japan), 10x Ex Taq buffer (Takara Bio) and 20  $\mu$ L of template DNA. Conditions for the first PCR were: 35 cycles of denaturation for 1 min at 95 °C followed by extension for 3 min at 72 °C. After the last cycle, the samples were incubated for 6 min at 72 °C. Subsequently, 2  $\mu$ L of amplified DNA product was used for nested PCR using the second primer set. The 50- $\mu$ L reaction mixture contained the same reagents as described above. Conditions for the second PCR were: 28 cycles of denaturation for 1 min at 95 °C followed by extension for 3 min at 72 °C. The amplified product was separated on a 1.5% agarose gel (SeaKem LE agarose, FMC BioProducts, ME, USA) and the expected size of the PCR product was 294 bp. The dilution for recognizing HBV-DNA with 50% probability was calculated by the Reed-Munch method [34] based on the number of HBV-DNA-positive and negative samples. This dilution was defined as the median tissue culture dose for penetration (TC<sub>50</sub>).

### Detection of HBV covalently closed circular-DNA as evidence of infectivity

Covalently closed circular-DNA is shaped by the HBV genome in Dane particles, which appear to be circular, yet it is only partially double-stranded. Recognizing this specific DNA formed in the hepatocyte nucleus is widely considered to confirm previous evidence of active viral replication [15,16,33,35–37]. The HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were added to 2 mL of culture medium containing serially 10-fold diluted HBV and further incubated for 24 h in the presence or absence of NA. The experimental procedure for obtaining cellular DNA and intracellular viral DNA was described elsewhere. Total DNA was dissolved in 20  $\mu$ L of distilled water and subjected to amplification by PCR with a primer pair as described by Köck et al. [36] (sense primer: 5'-CCTCTGCCGATCCATACTGCGGAAC-3' and antisense primer: 5'-CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTC-3'). The target sequences were amplified in a 50- $\mu$ L reaction mixture containing the same reagents and conditions as in the first step of nested PCR, except for the last cycle, where the samples

were incubated for 6 min at 72 °C. The amplified product was separated on a 1.5% agarose gel and showed a specific 1139 bp band of CCC-DNA. Subsequently, CCC-DNA was transferred onto a positively charged nylon membrane, Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, England), using 0.4 M NaOH as a transfer buffer. HBV-specific sequences were detected by hybridization according to the procedure described by Southern [38] with a digoxigenin (DIG)-labelled (DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Boehringer Ingelheim GmbH, Germany) probe contains part of the HBV-DNA genome (5'-TGTC AACGACCGACCTTGAGGCATACTTCA-3'). The membrane was incubated with anti-DIG-alkaline phosphatase conjugates (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Ingelheim GmbH) and subsequently incubated with chemiluminescent substrate CSPD® solution and exposed for 10 min at 42 °C to Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) to visualize the hybridized probe. The dilution of HBV materials for recognizing CCC-DNA in HepG2 with 50% probability was calculated by the Reed-Munch method [34] based on the number of CCC-DNA-positive and negative samples. This dilution was defined as the median tissue culture infection dose (TCID<sub>50</sub>).

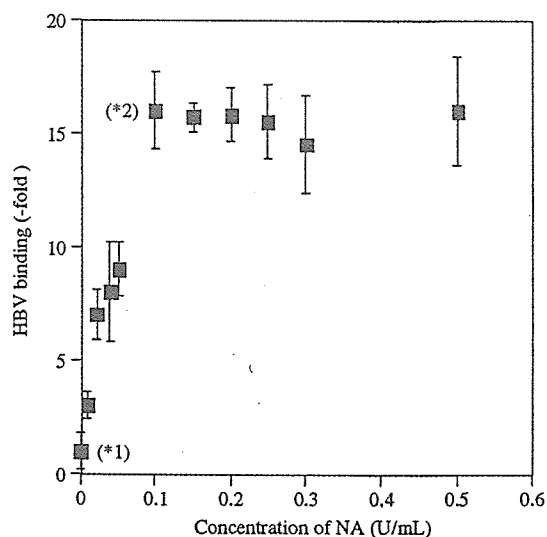


Fig. 1 Neuraminidase (NA) improves HBV binding. HBV ( $1 \times 10^6$  copies) was incubated with HepG2 ( $1 \times 10^6$  cells) in the presence of the given concentrations of NA for 3 h. The cells were then washed twice with PBS(-). The load of HBV binding on HepG2 was measured with the TaqMan PCR. The attachment of HBV was enhanced 16.5 times in the presence of 0.1 U/mL of NA compared with the control. This assay was performed four times. Error bars indicate standard deviations. The actual viral loads at (\*1) and (\*2) were  $3.0 \times 10^4$  and  $49.5 \times 10^4$  copies, respectively.

## RESULTS

*Effect of NA on HBV binding*

First, we investigated the effect of NA on the binding of HBV to HepG2. The NA augmented the binding of this virus in a saturable and dose-dependent manner (Fig. 1). The attachment to HepG2 was enhanced 16.5 times in the presence of 0.1 U/mL of NA ( $49.5 \times 10^4$  copies) compared with the control ( $3.0 \times 10^4$  copies) (Fig. 1). No effect on cell growth was observed, even in the presence of 1.0 U/mL of NA (data not shown). In addition, almost the same enhancement of binding was obtained when HBV particles were pretreated with NA (0.1 U/mL) and then cultured with HepG2 (Fig. 5).

*Effect of NA on HBV entry*

Second, we studied the effect of 0.1 U/mL of NA on viral entry. HepG2 cells were harvested at various time points after the interaction as described in materials and methods. Then, we checked the number of copies of HBV-DNA within the cells by TaqMan PCR. It should be pointed out that the amount of internalized virus at 3 h incubation ( $1 \times 10^4$

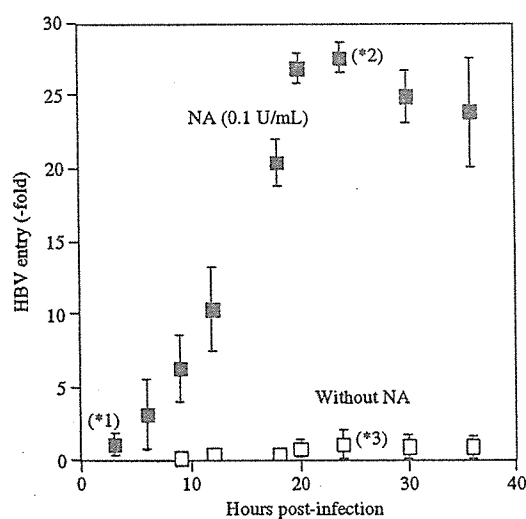


Fig. 2 Enhancement of HBV entry by NA. HBV ( $1 \times 10^6$  copies) interacted with HepG2 ( $1 \times 10^6$  cells) during a given period in the presence or absence of NA. The cells were treated with trypsin solution following two rinses with PBS(-), and were washed four times with culture medium. The number of viral particles penetrating the cells was evaluated with the TaqMan PCR. The number of internalized particles rose with time of interaction. The entry of HBV at 24 h post-inoculation was promoted 27.8 times compared with the control. This assay was performed four times. Error bars indicate standard deviations. The actual viral loads at (\*1), (\*2) and (\*3) were  $1.0 \times 10^4$ ,  $27.8 \times 10^4$  and  $1.0 \times 10^4$  copies, respectively.

copies; Fig. 2) obtained with the entry assay was clearly less than that obtained with the binding assay ( $49.5 \times 10^4$  copies; Fig. 1). Therefore, the trypsin treatment successfully removed the viruses present on the cell surface. The amount of internalized virus rose with the increase in the period of interaction. As a result, the entry of this virus ( $27.8 \times 10^4$  copies) at 24 h post-inoculation was increased 27.8 times compared with the control ( $1.0 \times 10^4$  copies; Fig. 2). To further confirm the effect of NA on HBV entry, the median entry endpoint dilution method was employed. We calculated the median tissue culture dose for penetration ( $TC_{50}$ ) at 24 h post-inoculation by the Reed-Munch method [34], repeating the same experiment six times and obtaining reproducible results. Consequently,  $1 \times 10^6$  copies of HBV in the presence of 0.1 U/mL of NA and in the absence of NA corresponded to a  $TC_{50}$  of  $10^{1.93}$  and  $10^{0.40}$  (Table 1), respectively. Therefore, NA-treatment accelerated the entry of HBV 34.7-fold relative to the control value (Table 1). This result is consistent with the value obtained with the TaqMan PCR methods (27.8 times; Fig. 2).

*Detection of CCC-DNA as evidence of HBV infectivity*

When PCR and Southern-hybridization were performed using whole DNA samples extracted from  $1 \times 10^6$  copies of

Table 1 Change in  $TC_{50}$  of HBV materials by the effect of NA

	Dilution of sample	HBV-DNA		$TC_{50}$
		Positive	Negative	
HBV without NA	1	6	0	
	3	2	4	
	9	0	6	$10^{0.40}$
	27	0	6	(2.50)
	81	0	6	
	243	0	6	
With 0.1 U/mL of NA	1	6	0	
	3	6	0	
	9	6	0	$10^{1.93}$
	27	5	1	(86.68)
	81	4	2	
	243	0	6	

HBV ( $1 \times 10^6$  copies) was incubated with Hep G2 ( $1 \times 10^6$  cells) in the presence or absence of NA. The cells were treated with trypsin solution following two rinses with PBS(-), and washed four times with culture medium after cultivation for 24 h. DNA obtained from HBV-associated HepG2 cells was diluted threefold. The HBV-DNA was recognized by nested PCR. The experiment was performed repeatedly, and the efficiency of viral penetration, described as the  $TC_{50}$ , was calculated according to the method of Reed-Muench based on the number of HBV-DNA-positive and negative samples. The HBV entry was accelerated 34.7 times in comparison with the control.



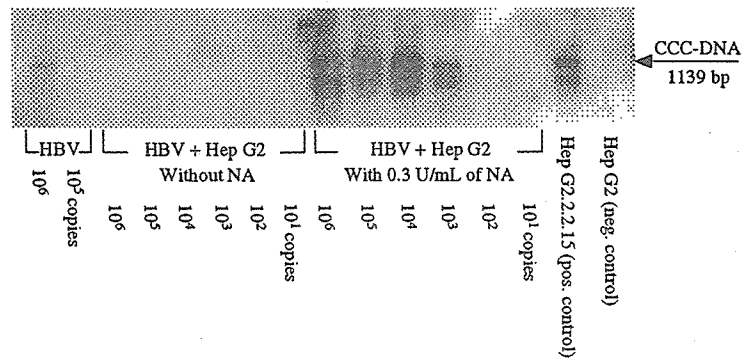


Fig. 3 Detection of CCC-DNA in HepG2 by PCR and Southern-hybridization. HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were inoculated with serially tenfold diluted HBV, and cultured for 24 h. The cells were treated with trypsin solution following two rinses with PBS(-), and were washed four times with culture medium. Whole DNA samples were dissolved in 20  $\mu$ L of distilled water. CCC-DNA as evidence of infection was investigated by PCR and Southern-hybridization. When whole DNA samples extracted from  $1 \times 10^6$  copies of HBV were utilized, a slight band could be seen at 1139 bp. This DNA product was not related to the actual infection. No CCC-DNA could be detected in the control, although the DNA product could be clearly seen when  $1 \times 10^3$  DNA copies of HBV were inoculated in the presence of 0.3 U/mL of NA.

HBV, a slight band could be seen at 1139 bp (Fig. 3), however, this DNA product was not related to the actual infection, as previously stated [36]. An obvious intracellular CCC-DNA band was detected when we inoculated  $1 \times 10^3$  copies of HBV into HepG2 cells in the presence of 0.3 U/mL of NA (Fig. 3). We repeated the experiment six times, and obtained reproducible results. We determined the median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) according to the methods of Reed and Muench [34] and found that  $1 \times 10^6$  copies of HBV corresponded to a TCID<sub>50</sub> of  $10^{2.30}$ . In other words, the viral burden needed for detecting infectivity with a probability of 50% is 4960 copies (Table 2). This solution corresponded to a TCID<sub>50</sub> of  $10^{1.60}$  in the presence of 0.1 U/mL of NA. No CCC-DNA could be detected without NA (Fig. 3).

#### Effect of asialo-fetuin on HBV binding

To confirm that the binding of HBV to HepG2 in the presence of NA is associated with the interaction between asialoglycoprotein on the virus and its receptor (ASGP-R) on HepG2 cells, asialo-fetuin was used to inhibit the binding of the virus in the presence of NA [11,25]. The attachment of HBV mixed with 0.1 U/mL of NA was clearly inhibited by asialo-fetuin in a dose-dependent manner (Fig. 4). This suggested that the binding is specific for ASGP-R and its ligand, asialoglycoprotein.

#### Effect of polyions on HBV binding

Desialylation itself must alter the electric charge of the HBV surface, because NA removed negatively charged sialic acid. To see whether the augmentation of binding was caused by

Table 2 Improvement of TCID<sub>50</sub> of HBV infectious materials by the effect of NA

	TCID <sub>50</sub> (original virus load: $10^6$ copies)	HBV load for recognizing infectivity (CCC-DNA) with 50% probability
HBV without NA	n.d.	n.d.
With 0.1 U/mL of NA	$10^{1.60}$	25100
With 0.3 U/mL of NA	$10^{2.30}$	4960

Hep G2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were infected with serially 10-fold diluted HBV, and cultured for 24 h in the presence or absence of NA. The cells were treated with trypsin solution following two rinses with PBS(-), and washed four times with culture medium. Whole DNA from HBV-associated HepG2 cells, was acquired. CCC-DNA as evidence of infection was investigated by PCR and Southern-hybridization. The infectivity, depicted as the TCID<sub>50</sub>, was calculated according to the method of Reed-Muench based on the number of CCC-DNA-positive and negative samples. We found that  $1 \times 10^6$  copies of HBV corresponded to a TCID<sub>50</sub> of  $10^{2.30}$  in the presence of 0.3 U/mL of NA. From this data, 4960 copies of HBV are required for detecting infectivity with a probability of 50%. n.d., could not be determined.

an electrostatic effect, a binding experiment was performed in the presence of positively or negatively charged polymers. No change in attachment was seen at any concentration of the chemicals (data not shown).

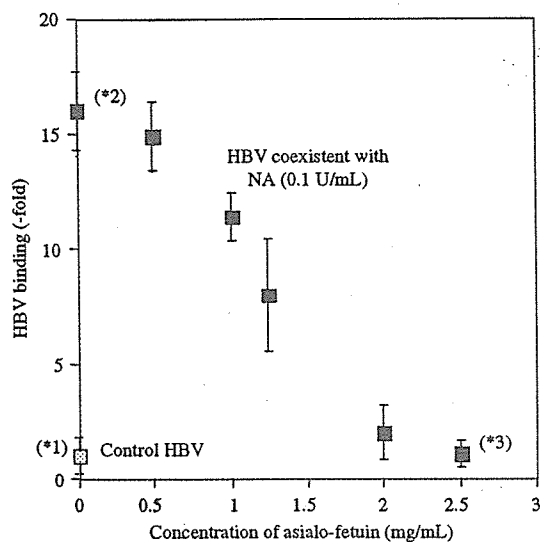


Fig. 4 Inhibition of HBV binding by asialo-fetuin. HBV ( $1 \times 10^6$  copies) was cultured with HepG2 ( $1 \times 10^6$  cells) in the presence of NA (0.1 U/mL) and various concentration of asialo-fetuin for 3 h. The cells were rinsed twice with PBS(-) after the culture. The number of virions binding to the cells was measured with the TaqMan PCR. The binding was blocked by asialo-fetuin in a dose-dependent manner. This assay was performed four times. Error bars indicate standard deviations. The actual viral loads at (\*1), (\*2) and (\*3) were  $3.0 \times 10^4$ ,  $49.8 \times 10^4$  and  $3.9 \times 10^4$  copies, respectively.

#### Effect of EDTA on HBV binding

To confirm that the desialylated viral particles interacted with the receptor, ASGP-R, on the host cell, EDTA was used to inhibit the binding [31]. The attachment of NA (0.1 U/mL)-pretreated HBV was obviously hampered by the calcium chelator in a dose-dependent manner (Fig. 5). This result also suggested that the interaction between the virus and cell was initiated by ASGP-R and asialoglycoprotein.

#### DISCUSSION

Over the past few decades, many studies have been performed to identify a cellular receptor or mediator for HBV infection. The area is truly important because the identification of receptor(s) is indispensable to elucidation of the mechanism of infection, and the fabrication of anti-HBV drugs or chemicals for inactivation of the virus lurking in blood products. Moreover, we have been able to expand on the idea of infectivity as a new index of viral load, allowing a detailed and accurate prognosis of HBV patients. As a result, various candidates have been proposed. However, none of them have appeared to be generally accepted as a true receptor for the virus. In this study, we refocused on ASGP-R because of its

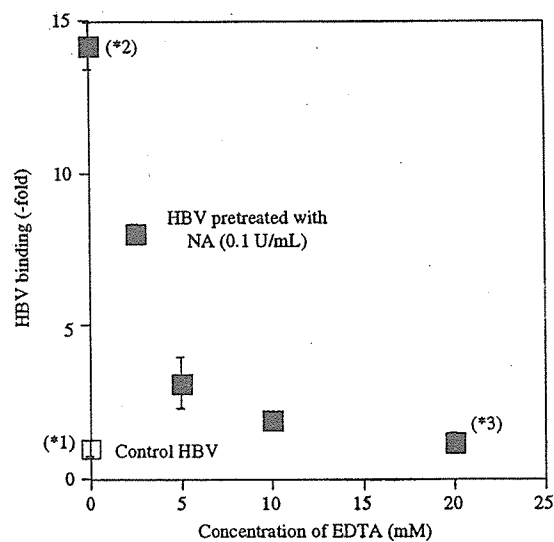


Fig. 5 Inhibition of HBV binding by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). HBV ( $1 \times 10^6$  copies) was processed with 0.1 U/mL of NA and collected by the centrifugal method. Viral particles were cultured with HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ ) for 1 h at 4 °C. Then, the cells were rinsed with various concentrations of EDTA for 15 min at RT. The number of virions binding to the cells was measured with the TaqMan PCR. EDTA promoted the dissociation of the virus from HepG2 in a dose-dependent manner. This assay was performed four times. Error bars indicate standard deviations. The actual viral loads at (\*1), (\*2) and (\*3) were  $2.1 \times 10^4$ ,  $29.8 \times 10^4$  and  $2.6 \times 10^4$  copies, respectively.

restricted expression on liver parenchymal cells and a previous report suggesting that ASGP-R is a cellular receptor [11], and addressed the effect of the desialylation of viral particles on binding, entry and infectivity in HepG2 cells.

The HBV binding was enhanced in the presence of 0.1 U/mL of NA compared with the control (Figs 1 & 4), and almost the same augmentation of the binding was found when HBV particles were pretreated with NA (0.1 U/mL) and then cultured with HepG2 (Fig. 5). This augmentation seemed to originate from a specific interaction between desialylated HBV particles and ASGP-R [23,31,39] on the cells, because we found that the binding of HBV in the presence of NA was clearly inhibited by asialo-fetuin (Fig. 4) and also the attachment of NA (0.1 U/mL)-pretreated HBV particles was hampered by EDTA, a calcium chelator [32] (Fig. 5). It is possible that the interaction between HBV and HepG2 is enhanced by the change in charge caused by desialylation. However, this can be excluded by the finding that binding efficacy was not altered in the presence of negatively charged or positively charged polymers (data not shown). Thus, the desialylation of viral particles is important for the enhancement of viral binding.

We also confirmed that viral entry was enhanced by NA treatment using two different assay methods (Fig. 2, Table 1). This indicated that once the viral particles bind to ASGP-R, they may be internalized through the receptor. According to Treichel et al. [11], the counterpart of ASGP-R is a pre-S1 region when it is an HBV infection. Therefore, it is possible that desialylation of a pre-S1 region on the viral envelope plays an important role in the enhancement of binding and entry, at least in our experimental conditions.

Next, we tried to detect CCC-DNA, which is a useful and reliable marker for the infectivity of HBV in an *in vitro* system [15,16,33,35–37]. We tried to detect CCC-DNA in DNA samples obtained 24 hrs after the start of culture, and succeeded in estimating the infectivity of HBV materials. CCC-DNA could be detected from the DNA samples obtained from the cells exposed to  $1 \times 10^3$  DNA copies of HBV in the presence of 0.3 U/mL of NA, but never from the cells exposed to any number of viral copies in the absence of NA (Fig. 3). In addition, the TCID<sub>50</sub> at 0.1 U/mL of NA ( $10^{1.60}$ ) increased to  $10^{2.30}$  at 0.3 U/mL of NA (Table 2). A relatively higher concentration of enzyme was favourable in this assay. The change in concentration of NA may have occurred because HBV infection was initiated by multiple interactions between desialylated sites of the viral envelope and ASGP-R on HepG2 cells. Because a complete CCC-DNA formation only occurs inside the nucleus, these findings demonstrated that NA-treatment is effective for the enhancement of viral binding and entry. However, the level of both internalized DNA and CCC-DNA diminished gradually after the 24-hrs culture period and no viral DNA was detectable on the seventh day (data not shown).

On the basis of our data, the interaction between ASGP-R and desialylated glycoprotein or glycolipid on the surface of HBV particles appeared to be critical for the infection of HBV, at least in our experimental conditions. However, whether the interaction of these molecules is important or not for the establishment of a viral infection *in vivo* remains to be elucidated. In this sense, it was of interest that endothelial cells have desialylation activity [26,27] and the sinusoid in the liver was piled with endothelial cells [28]. In addition, it has recently been reported that duck HBV was first captured by liver sinusoidal endothelial cells and then penetrated liver parenchymal cells [40]. Thus, it is possible that liver sinusoidal endothelial cells are a source of endogenous sialidase *in vivo* and desialylated HBV particles enter liver cells through ASGP-R.

Finally, in order to carry out an HBV infection assay, the inoculation of animals such as chimpanzees or the other anthropoids with HBV [41,42], or the use of primary hepatocytes [43–45] is necessary at present. However, there are ethical problems and methodological difficulties with these assay systems. In contrast, our experimental system is a feasible and reproducible *in vitro* HBV infection assay, although no viral replication can be seen. Improvement of the sensitivity is needed in the future. In conclusion, (i) ASGP-R

on HepG2 may be a specific receptor for HBV infection, and (ii) desialylation of HBV particles makes it possible to evaluate the infectivity of HBV in terms of CCC-DNA formation by enhancing the viral binding and entry.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The first two authors equally contributed to this work. Dr Harumichi Matsukura at Osaka Red Cross Blood Center is gratefully acknowledged for providing the methodology of TaqMan PCR for HBV-DNA quantitative assay. We also gratefully acknowledge Professor Dr Naoki Yamamoto at Tokyo Medical and Dental University for critical review of this manuscript and helpful insights and discussion. We thank Professor Dr Hiroaki Mitsuya at Kumamoto University for technical advice.

#### REFERENCES

- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (sub-type ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979; 281: 646–650.
- Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 651–693.
- Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1995; 69: 6158–6169.
- Miller RH, Marion PL, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology* 1984; 139: 64–72.
- Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403–415.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489–495.
- Neurath AR, Strick N. Antigenic mimicry of an immunoglobulin A epitope by a hepatitis B virus cell attachment site. *Virology* 1990; 178: 631–634.
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli C, Gerlich WH, Ruol A, Alberti A. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol* 1992; 73: 2041–2045.
- Neurath AR, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 1992; 175: 461–469.
- Neurath AR, Strick N, Li YY. Cells transfected with human interleukin 6 cDNA acquire binding sites for the hepatitis B virus envelope protein. *J Exp Med* 1992; 176: 1561–1569.
- Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Stockert RJ, Poralla T, Gerken G. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol* 1994; 75: 3021–3029.
- Franco A, Paroli M, Testa U et al. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175: 1195–1205.

- 13 Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* 1998; 79: 1665–1670.
- 14 Petit MA, Capel F, Dubanchet S, Mabit H. PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology* 1992; 187: 211–222.
- 15 De Meyer S, Gong ZJ, Hertogs K et al. Influence of the administration of human annexin V on in vitro binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on in vitro hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2000; 7: 104–114.
- 16 Gong ZJ, De Meyer S, van Pelt J et al. Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 576–584.
- 17 Neurath AR, Strick N. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 1994; 204: 475–477.
- 18 De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A et al. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 36613–36623.
- 19 Mehdi H, Kaplan MJ, Anlar FY et al. Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 1994; 68: 2415–2424.
- 20 Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, Peeples ME. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol* 1989; 63: 1981–1988.
- 21 Budkowska A, Quan C, Groh F et al. Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor. *J Virol* 1993; 67: 4316–4322.
- 22 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51–68.
- 23 Becker S, Spless M, Klenk HD. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol* 1995; 76: 393–399.
- 24 Junbo H, Li Q, Zaide W, Yunde H. Receptor-mediated interleukin-2 gene transfer into human hepatoma cells. *Int J Mol Med* 1999; 3: 601–608.
- 25 Neda H, Wu CH, Wu GY. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J Biol Chem* 1991; 266: 14143–14146.
- 26 Majuri ML, Rabina J, Niittymaki J et al. High endothelial cells synthesize and degrade sLex. Putative implications for L-selectin-dependent recognition. *FEBS Lett* 1999; 455: 97–100.
- 27 Rabina J, Pikkariainen M, Miyasaka M, Renkonen R. A time-resolved immunofluorometric assay of sialyl Lewis x-degrading alpha 2, 3-sialidase activity. *Anal Biochem* 1998; 258: 362–368.
- 28 Rappaport AM. Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol* 1980; 21: 1–63.
- 29 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005–1009.
- 30 Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 1988; 62: 2836–2844.
- 31 Stockert RJ. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev* 1995; 75: 591–609.
- 32 Uchida Y, Tsukada Y, Sugimori T. Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*. *J Biochem (Tokyo)* 1979; 86: 1573–1585.
- 33 Lu X, Block TM, Gerlich WH. Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *J Virol* 1996; 70: 2277–2285.
- 34 Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hygiene* 1938; 27: 493–497.
- 35 Ilan E, Burakova T, Dagan S et al. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999; 29: 553–562.
- 36 Köck J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996; 23: 405–413.
- 37 Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J* 2001; 20: 4443–4453.
- 38 Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503–517.
- 39 Lodish HF. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 374–377.
- 40 Breiner KM, Schaller H, Knolle PA. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* 2001; 34: 803–808.
- 41 Ogata N, Zanetti AR, Yu M, Miller RH, Purcell RH. Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* 1997; 175: 511–523.
- 42 Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 1–5.
- 43 Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P, Zentgraf H. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1994; 106: 664–673.
- 44 Ochiya T, Tsurimoto T, Ueda K, Okubo K, Shiozawa M, Matsubara K. An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 1875–1879.
- 45 Rijntjes PJ, Moshage HJ, Yap SH. In vitro infection of primary cultures of cryopreserved adult human hepatocytes with hepatitis B virus. *Virus Res* 1988; 10: 95–109.