

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石井 孝司

平成20(2008)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
石井 孝司	
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	17
脇田 隆宇	
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	27
石井 孝司	
3. ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発	31
望月 英典	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊	41

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 主任研究官 石井 孝司

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つたことである。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 脇田 隆字
国立感染症研究所
部長

分担研究者 望月 英典
東レ株式会社医薬研究所
研究主幹

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つた。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つた大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたためである。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

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

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. 構造タンパク質が JFH-1 以外の株由来であるキメラウイルスの作製

JFH-1 株の構造タンパク質をコードする遺伝子を JFH-1 以外の株の遺伝子と組換えたキメラウイルスを作製した。JFH-1 以外の株として、遺伝子型 1b の TH1 株、遺伝子型 2a の J6CF 株を用いた。キメラウイルスをそれぞれ、TH/JFH-1、J6/JFH-1 とした。

2. キメラウイルス感染細胞の培養

細胞培養系での HCV 粒子大量生産を目指し、キメラウイルス感染細胞をマイクロキャリア（サイトデックス）、多段式培養器（セルスタック）および高密度細胞培養システム（BelloCell）で培養を検討した。

3. ウイルス粒子の精製法の改良

ウイルス培養に用いる培養液中の FCS 濃度について検討した。回収したウイルス培養液を様々な膜による限外濾過を試みた。

4. 精製ウイルスの性状解析

精製ウイルスを SDS-PAGE により展開し、観察できたバンドを切り出し、質量分析によるタンパク質の同定を試みた。

5. キメラウイルス粒子の精製と免疫

限外濾過、密度勾配遠心、ヘパリンクロマトグラフィーを組み合わせた方法で精製した。ウイルス量は定量的 RT-PCR およびコアタンパク質の EIA にて測定した。紫外線照射にて不活化した部分精製 J6/JFH-1 (HCV core 70 pmol 相当) をフロイントの完全アジュバントに加え、エマルジョンを形成させ、腹腔内投与により免疫した。1週間おきに2回フロイントの不完全アジュバントにてエマルジョンを形成させ、同様に腹腔内へ追加免疫した。最初の免疫から 62 日目に採血し、血清を EIA による E2 タンパク質への反応性評価および HCV 中和価の測定に用いた。

6. 感染阻害活性の測定

希釈した血清とウイルス液を混合し、1時間 37°C にて培養し、あらかじめ培養した Huh7 に加え、3時間培養した。血清/ウイルス液を除き、洗浄後、新鮮培地を加え 48 時間培養した。その後、Isogen を加えて、total RNA の抽出した。total RNA を用いた定量的 RT-PCR により total RNA 1 µg あたりの HCV RNA の copy 数を測定した。

7. 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ショ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。

8. 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ショ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。

9. HCV-LPs の感染性の確認

上記の方法で精製した HCV-LPs を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 を添加した培地で2週間培養し、コロニー形成の有無を調べた。

(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、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 構造タンパク質が JFH-1 以外の株由来であるキメラウイルスの作製

遺伝子型 1b の HCV 株である TH 株および遺伝子型 2a の HCV 株である J6CF 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、Huh7-25-CD81 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。2 種類のキメラウイルスは持続的にウイルスが産生され、Huh7 細胞に感染性を示した。

2. キメラウイルス感染細胞の培養

ウイルスを大量に取得するために、3 種類の培養系を検討した。まず、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。また、高密度細胞培養システム (BelloCell) にて行ったが、HCV に感染した細胞の増殖は悪く、ウイルス生産量は上がらなかった。これらに対して、単純な平面培養系である多段式培養器 (セルスタック) が最もウイルスが得られた。

3. ウイルス粒子の精製法の改良

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。その際に培養液中の FCS 濃度を 10%、5%、2%、1%、0.5%、0% として培養を継続しウイルス産生量を比較した。2%FCS まではウイルス量は低下しなかったが、1% 以下の FCS ではウイルス産生量が低下した。しかし、ウイルス産生量は半分程度に低下するものの FCS 無添加でも数日間であればウイルス培養が可能なが判明した。従って無血清培養によるウイルス産生の可能性が示された。培養液中に分泌されたウイルス粒子を効率よく回収するために、最初の精製は限外濾過が最も効率がよいと考えられる。ウイルスをなるべくロスせずに夾雑タンパク質を取り除く膜を選択することが必要である。カットオフが 100kDa、300kDa、500kDa の膜を比較したところ、300kDa の膜を使用することによりウイルスをほとんどロスすることなくウイルス液を濃縮し低分子夾雑物を濾過することができた。

4. 精製ウイルスの性状解析

精製ウイルス液を SDS-PAGE によりゲルに展開した後、SYPRO Ruby で染色し、同定したバンドを切り出し、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。多くは細胞由来のタンパク質であった。これらのタンパク質がウイルス粒子内にあるのか、ウイルス粒子の外側に付着しているのかを検討している。

5. キメラウイルスの精製と免疫

J6/JFH1 を限外濾過膜、密度勾配遠心、ヘパリンクロマトグラフィーおよび限外濾過膜による濃縮、バッファー置換の工程にて精製を行った。紫外線照射にて不活化した部分精製 J6/JFH-1 (HCV core 70 pmol 相当) をフロイントの完全アジュバントに加え、エマルジョンを形成させ、腹腔内投与により

免疫した。

6. マウス血清の HCV 中和価

E2 タンパク質を固相化した EIA にて、正常マウス血清と比較して、J6/JFH-1 粒子で免疫したて得られたマウスの血清は、900 倍希釈で有意に E2 タンパク質に反応した。さらに、HCV 感染系にて評価したところ、免疫血清には 20 倍希釈で 85% の J6/JFH-1-HCV の感染を阻害する活性が認められた。さらに本血清は、20 倍希釈で 65% の TH/JFH-1 の感染を阻害する活性が認められた。この結果は、遺伝子型 2a の HCV を免疫して誘導される抗体中には遺伝子型 1b の HCV の感染を阻害する抗体が存在することを示している。

7. 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。

8. 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

画分に回収された。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。

9. HCV replicon を保持する HCV-LPs の感染性の有無の検討

上記の実験で得られた構造体は粒子中に HCV replicon を保持していると考えられるため、もし感染性を有するなら感染した細胞に replicon が導入される。導入された replicon が複製することにより、感染細胞は neomycin 耐性を有することになる。上記の画分を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 存在下で培養したところ耐性コロニーが検出された。このことから、上記の画分に存在する構造体は感染性を有する HCV-LPs であることが明らかとなった。

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。

特定の HCV 株で免疫して得られた抗体が、異なる株の HCV の感染を阻害するのかを明らかにすることは、HCV ワクチン開発において重要である。この問題を明らかにするために昨年度までに、HCV 感染感受性およびレプリコン複製能の高い Huh7-25-CD81 細胞の作製、遺伝子型の異なるキメラウイルスの作製を行ってきた。本年度の検討では、昨年度までの成果を元に、遺伝子型 2a の構造タンパク質をもつ J6/JFH-1 を大量調製し、部分精製した本粒子をマウスに免疫して得られた血清が、J6/JFH1 および遺伝子型 1b の構造タンパク質をもつ

TH/JFH-1 の感染を阻害することを明らかにした。この結果は、特定の HCV 株を抗原とした場合でも汎中和抗体を誘導することができることを示しておりワクチン開発における重要な知見の一つとなると考えられる。今後、本結果をモノクローナル抗体レベルで解析することを検討している。さらに、本研究で得られたツールは、宿主免疫からの逃避機構における B 細胞エピトープの変異を解析する上でも重要と考えられる。

ウイルス粒子の精製法を開発することはワクチン開発において最も重要なステップである。このために様々な精製法を試み、至適化していく。異なる精製法を組み合わせることにより、効率よくウイルス精製が可能となる。また、その過程において C 型肝炎ウイルス粒子の生化学的、物理化学的性質が明らかとなってくる。

限外濾過膜の検討において 500kDa カットオフの膜を使用するとウイルス粒子が膜を通過しはじめる。この知見からウイルス粒子のサイズが分子量 500kDa 相当のタンパク質よりもやや小さいことが推定される。しかし、今回使用した膜は再生セルロース膜であり、膜の材質や濾過時の圧力、バッファー条件などにもかなり影響されるので、これらの条件を変えることにより、より至適な濾過条件を検討していく必要がある。限外濾過、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティカラムなどの組み合わせを検討していくことによりウイルス粒子の精製条件はかなり改善できることが期待できる。

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とから、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。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事が期待できる。

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 の作成しワクチンとして応用することを最終的な目標としている。昨年度までに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 も検出されたことから、発現蛋白は HCV 粒子様構造 (HCV-LPs) を取っていることが示唆され、また、HCV-LPs には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。本年度はこの HCV-LPs が感染性を有するかどうかの検討を行い、感染させた細胞の neomycin 耐性能を調べることにより感染性を証明することができた。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の検討も開始している。

E. 結論

遺伝子型 2a の構造タンパク質をもつ J6/JFH-1 キメラウイルス粒子を抗原として免疫したマウス血清中に、抗原に使用したウイルスだけでなく遺伝子型 1b の構造タンパク質をもつ TH/JFH-1 キメラ

ウイルスの感染を中和する抗体が認められた、本知見は、特定の HCV 株をワクチンとした場合でも、他の HCV 株に効果のある汎中和抗体を誘導できることを示唆している。ウイルス粒子精製法の改良を試み、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティカラムなどの組み合わせを検討していくことによりウイルス粒子の精製条件はかなり改善できることが判明した。また、精製ウイルス粒子と共存する細胞性タンパク質を同定した。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-LPs が培養上清中に放出されることが判明した。また、本粒子に一過性の感染能があることを証明した。今回得られた粒子は 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol*. 2007 88:3323-33.
2. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F,

- Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.
3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2007 Oct 18; [Epub ahead of print]
4. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2007 81(24):13922-6.
5. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):1089-97.
6. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.
7. Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK. Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol*. 2007 81(16):8814-20.
8. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.
9. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 581(10):1983-7.
10. 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 81(10):5036-45.
11. 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 81(9):4405-11.
12. 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 79(6):714-23.
13. 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.

14. 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 37(6):433-43

15. 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.

16. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* in press

17. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).

18. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).

19. 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*, 9, 515-521 (2007).

20. 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).

21. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版印刷中 (2007)

22. 石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎感染・炎症・免疫 37 : 58-59 (2007)

2. 学会発表

1) 脇田隆字, 「C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用」、第43回肝形態科学研究会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.30)

2) 脇田隆字, 「in vivoとin vitroにおけるHCV複製」、第4回ウイルス学キャンプin 湯河原、ウエルシティ湯河原、(2007, 6.6-7)

3) 脇田隆字, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第3回広島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、(2007, 6. 29)

4) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの感染増殖機構」、The 6th Hepatitis Expert Meeting、軽井沢プリンスホテル、(2007, 8. 25)

5) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製および増殖機構」、第27回名古屋肝炎セミナー 第116回名古屋肝炎疾患研究会、名古屋東急ホテル、(2007, 9. 21)

6) 脇田隆宇, 「Infection and replication of hepatitis C virus」、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム、神戸商工会議所会館、(2007, 10. 17)

7) 脇田隆宇, 「基礎研究に基づくC型肝炎ウイルスの新規治療とワクチン開発」、第10回熊本ウイルス感染症研究会、熊本全日空ホテル、(2007, 10. 26)

8) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第22回臨床肝臓カンファレンス、日本海運倶楽部、(2007, 11. 10)

9) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス基礎研究の進歩」、第167回高知肝疾患症例検討会、高知新阪急ホテル、(2007, 11. 20)

10) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製および粒子形成」、学術講演会第10回 リサーチフォーラム「ウイルスとヒト」、芝蘭会館別館、(2007, 12. 22)

11) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発」第11回日本ワクチン学会学術集会、パシフィコ横浜、(2007, 12. 8-9)

12) 今村道雄、平賀伸彦、木村俊之、畠山剛、柘植雅貴、野口千笑、高橋祥一、本多政夫、金子周一、脇田隆宇、茶山一彰、培養細胞および動物モデルを用いた肝炎ウイルスのインターフェロン感受性の検討、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-

6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

13) 相崎英樹、原弘道、森川賢一、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染、粒子形成における役割、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

14) 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス(HCV)粒子のワクチン開発への応用、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

14) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染および複製増殖機構、第31回阿蘇シンポジウム「ウイルスと戦う」、阿蘇プリンスホテル、(2007, 7.27-28)

15) 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、トロノ ディディエ、加藤宣之、DNA損傷センサーATMとChk2はHCVのRNA複製に必要な宿主因子である、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)、ワークショップ6 ウイルスと癌

16) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、RNA polymeraseI システムを用いた感染性C型肝炎ウイルス粒子の作成と抗ウイルス薬の薬効評価への応用、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)

17) 箆島裕子、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、脇田隆宇、渡辺守、**plaque-forming assay** を用いた細胞障害性 HCV の選択と機能解析、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)

18) 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、柘植雅貴、野口千笑、高橋祥一、本多政夫、金子周一、脇田隆宇、茶山一彰、リバーズジェネティクスにより作製した HCV 感染マウスを用いた **genotype** 別のインターフェロン感受性の検討、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)

19) 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆宇、遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

20) 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、加藤宣之、HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

21) 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

22) 下池貴志、Mckenna Sean, Lindhout Darrin, 脇田隆宇、Puglisi Joseph、HCV IRES は PKR を活性化するが、それによる翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

23) 阿部克俊、村上恭子、市村徹、高宮智史、大

崎一直、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白と結合する新規宿主因子 hnRNP H1/H2 の同定と相互作用、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

24) 加藤孝宣、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の *in vivo* での病原性の検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

25) 海老原敬、松本美佐子、脇田隆宇、瀬谷司、HCV 感染アポトーシス細胞を介した樹状細胞の成熟化、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

26) 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、竹部豊、新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

27) 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生された HCV ウイルスの免疫原性に関する検討、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

28) 竹部豊、上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的を持つ HCV 阻害剤の同定とその解析、日本ウイルス学会第55回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10.21-23)

- 29) 村上恭子, 勝二郁夫, 木村敬郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆宇, 血球系細胞に HCV JFH-1 株の感染および複製の検討、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 30) 赤澤大輔, 伊達朋子, 森川賢一, 村山朝子, 尾見法昭, 高橋仁, 白倉雅之, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 肝細胞株における感染性 HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 31) 高橋仁, 尾見法昭, 赤澤大輔, 白倉雅之, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の作製と性状解析、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 32) 江角真理子, 石橋真理子, 清水洋子, 森田奈央子, 山口裕美, 高山由理子, 野本聡美, 脇田隆宇, 清水一史, L-SIGN 陽性細胞の C 型肝炎ウイルス感染感受性解析、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 33) 相崎英樹, 原弘道, 森川賢一, 井上寧, 谷英樹, 松浦善治, 斎藤恭子, 深澤征義, 花田賢太郎, マイケル・ライ, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗, C 型肝炎ウイルス脂質成分の感染における役割、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 34) 村上裕子, 山越智, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 深澤秀輔, 培養細胞を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) の阻害剤のスクリーニング、日本ウイルス学会第 5 5 回学術集会、札幌コンベンションセンター(2007, 10. 21-23)
- 35) 石橋真理子, 清水洋子, 山口裕美, 高山由理子, 野本聡美, 脇田隆宇, 清水一史, 江角真理子, C 型肝炎ウイルス感染における肝臓類洞内皮 C 型レクチン (L-SIGN) の役割、第 30 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(2007, 12. 11-15)
- 36) Munakata T, Wakita T, Nomoto A, Toll-like receptor 3 is a downstream target of Rb/E2F pathway activated by hepatitis C virus, 第 30 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(2007, 12. 11-15)
- 37) T Wakita. HCV replication in vitro and in vivo, 3rd Pasteur-Areva Course on Blood-Borne Viruses: Hepatitis C Virus, Shanghai, China (Oct 15-18, 2007)
- 38) T Wakita, H Aizaki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2007 9/1-5)
- 39) H Aizaki, M Fukazawa, K Morikawa, H Hara, H Tani, K Hanada, Y Matsuura, M Lai, T Miyamura, T Wakita, T Suzuki, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 40) R Fischer, S Gorke, L Lan, S J. Rau, T Wakita, H E. Blum¹, M B. Zeisel, T F. Baumert, Hepatitis C virus replication sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis, 14th International Meeting on Hepatitis C and

- Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 41) G Mateu, R O. Donis, J Bukh, T Wakita, A Grakoui, Intragenotypic chimeric hepatitis C viruses produce high levels of infectious particles but cause increased cell death, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 42) D Sir, W-l Chen, T Wakita, T.S. B Yen and J.-H. J Ou, INDUCTION OF AUTOPHAGY BY HEPATITIS C VIRUS VIA ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 43) P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carrière, S Zaïdi, M Dreux, O Scatton, T Wakita, F-L Cosset, F Conti, Y Calmus, A R Rosenberg, Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 44) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T, The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 45) K Murakami, I Shoji, I Hamamoto, T Suzuki, T Miyamura, T Wakita, Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 46) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp R, Furusaka A, Wakita T, Krawczynski K, Liang J, The hepatitis C virus JFH-1 is associated with attenuated infection and low virulence in chimpanzee, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 47) Machida K, Huang J, Wang C-H, Liu H, Kondo Y, Sung V, Wakita T, Lai M, Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 48) Shimoike T, Mckenna SA, Lindhout DA, Wakita T, Puglisi JD, The HCV IRES is a potent activator of PKR but resistant to eIF2 phosphorylation, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 49) Masaki T, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Analysis of NS5A region for hepatitis C virus particle production, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 50) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N, DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA replication, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)

- 51) Fukasawa M, Nitahara-Kasahara Y, Shinki-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M, Cellular vimentin affects the protein level of hepatitis C virus core protein and the activity of hepatitis C virus production in cultured cells, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 52) Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Mishima K, Nakagawa M, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Yamamoto M, Onui Y, Sudo G, Itsui Y, Wakita T, Watanabe M, Development of plaque-forming assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 53) Takahashi H, Akazawa D, Omi N, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T, An adaptive mutation in E2 glycoprotein allow an efficient production of HCV particles with epitope-tagged envelope, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 54) Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor BI is required for an entry step closely linked to CD81, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 55) Akazawa D, Takahashi H, Omi N, Date T, Morikawa K, Murayama A, Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T, Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 56) Isogai M, Uenishi R, Hase S, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y, Identification of new class of HCV inhibitors targeted to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1 based infectivity/replication assay, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 57) Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C, Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in HCV structural proteins, 14th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Glasgow, Scotland, UK (2007, 9. 9-13)
- 58) P Podevin, S Lagaye, A Carpentier, L Aoudjehane, M Carrière, S Zaïdi, JF Meritet, M Dreux, O Scatton, T Wakita, F-L Cosset, F Conti, A R Rosenberg, Y Calmus, Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes, The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)

59) Masaki T., Wakita T., Analysis of NS5A region important for hepatitis C virus particle production, The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA (November 2-6, 2007)

60) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討、第11回日本ワクチン学会、平成19年12月、横浜。

61) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI_s の組換え SARS ワクチンとしての検討、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

62) 岩崎優紀、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、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

G. 知的所有権の出願 ・ 登録状況

特許出願

1) 特願 2007-167916 脇田隆字、鈴木哲朗、石井孝司、尾見法昭 UV によるC型肝炎ウイルスの不活化方法・2007年6月26日出願

2) 特願 2007-184587 脇田隆字、鈴木哲朗、高橋仁 感染性エピトープタグ化 HCV 粒子とその利用・2007年7月13日出願

3) 特願 2007-193413 脇田隆字、鈴木哲朗、森川賢一、尾見法昭、中村紀子、赤澤大輔 C型肝炎ウイルスの感染阻害活性を有する抗体およびその

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発生系やウイルス様中空粒子発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発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改良

ウイルス培養に用いる培養液中の FCS 濃度について検討した。回収したウイルス培養液を様々な膜による限外濾過を試みた。

2. 精製ウイルスの性状解析

精製ウイルスを SDS-PAGE により展開し、観察できたバンドを切り出し、質量分析によるタンパク質の同定を試みた。

(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改良

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。その際に培養液中の FCS 濃度を 10%、5%、2%、1%、0.5%、0% として培養を継続しウイルス産生量を比較した。2%FCS まではウイルス量は低下しなかったが、1%以下の FCS ではウイルス産生量が低下した。しかし、ウイルス産生量は半分程度に低下するものの FCS 無添加でも数日間であればウイルス培養が可能ながことが判明した。従って無血清培養によるウイルス産生の可能性が示された。培養液中に分泌されたウイルス粒子を効率よく回収するために、最初の精製は限外濾過が最も効率が良いと考えられる。ウイルスをなるべくロスせずに夾雑タンパク質を取り除く膜を選択することが必要である。カットオフが 100kDa、300kDa、500kDa の膜を比較したところ、300kDa の膜を使用することによりウイルスをほとんどロスすることなくウイルス液を濃縮し低分子夾雑物を濾過することができた。

2. 精製ウイルスの性状解析

精製ウイルス液を SDS-PAGE によりゲルに展開した後、SYPRO Ruby で染色し、同定したバンドを切り出し、質量分析によりウイルス粒子と