

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤に含まれる C 型肝炎ウイルスの感  
染経路による感染リスクの差に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

血液製剤に含まれるC型肝炎ウイルスの感染経路による感染リスクの差に関する解析 . . . . .	2
協田 隆字	

### II. 分担研究報告

1. HCV の感染経路による感染性についての解析 . . . . .	6
協田 隆字	
2. 感染ウイルスの解析 . . . . .	8
加藤 孝宣	
3. HCV のヒト肝細胞キメラマウスへの感染 . . . . .	10
田中 靖人	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	12
-------------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊 . . . . .	14
---------------------------	----

# I . 総括研究報告

総括研究報告書

## 血液製剤に含まれる C 型肝炎ウイルスの感染経路による 感染リスクの差に関する解析

研究代表者 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 肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスである HCV キャリアは 100-200 万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は 3 万人におよぶ。HCV 感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は 40-50% 程度である。HCV の新規感染は輸血および血液製剤のスクリーニングが開始されてから激減した。しかし、その感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するためその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合にどの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによる HCV の感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。そこで、本研究では血液製剤などからの HCV の感染経路による感染危険性の差を検証する。

研究分担者 加藤孝宣  
国立感染症研究所  
室長

研究分担者 田中靖人  
名古屋市立大学大学院  
准教授

めその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合にどの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによる HCV の感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。本研究では血液製剤などからの HCV の感染経路による感染危険性の差を検証する。

### A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。HCV キャリアは 100-200 万人がいまだに存在し、その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は 3 万人におよぶ。HCV の新規感染は輸血および血液製剤のスクリーニングが開始されてから激減した。しかし、その感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するた

### B. 研究方法

#### 1. 感染材料の検討

脇田研究分担者の分担報告書を参照

#### 2. 血清のチンパンジーへの感染

加藤研究分担者の分担報告書を参照

### 3. フィブリン糊による感染実験

田中研究分担者の分担報告書参照

(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「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. 感染材料の検討

JFH-1 株の場合、培養細胞で作製したウイルス (HCVcc) および患者血清の感染をヒト肝細胞移植キメラマウスで確認できた。しかし、JFH-2 株では患者血清は感染したが、HCVcc は感染しなかった。

#### 2. 血清のチンパンジーへの感染

JFH-1 株血清はチンパンジーへ感染が成立した。HCV 血症は間歇的に接種後 36 週目まで観察でき、その後陰性化した。感染成立後、ウイルスゲノムには変異が蓄積することが明らかとなった。現在これらの変異の意義をリバースジェネティクス法で解析中である。

#### 3. フィブリン糊による感染実験

かつて問題となった HCV が含まれるフィブリンノーゲン製剤や糊を入手することは出来ないため、現在市販されているフィブリンノーゲン製剤及び糊に HCV 陽性血清を混合して実験を行うこととした。

このため HCV が含まれるプール血清から製造され、不活化処理を経たとされる血液製剤とまったく同一の条件であるとは言えないが、HCV 陽性血清を混合したフィブリンノーゲン糊を腹腔内またはフィブリンノーゲン製剤を静脈内投

与したキメラマウス群と、HCV 陽性血清のみを投与した群を比較した結果、フィブリンノーゲン糊と混合した方が、感染効率が高くなる結果を得た。HCV 陽性血清を混合したフィブリンノーゲン糊を腹腔内投与した結果、2IU で 1/3 に、10IU で 1/2 に感染が成立した。HCV 陽性血清のみを腹腔内投与した結果、2IU と 10IU の投与で感染が成立しなかった。HCV 陽性血清を混合したフィブリンノーゲン糊を静脈内投与した結果、2IU の投与で全例 (3 匹) に感染が成立した。一方、HCV 陽性血清のみを静脈内投与した結果、2IU では全例 (3 匹) で感染が成立しなかった。10IU では 2/3 に感染が成立した。

なお、本実験系は同一のウイルス株で同一の細胞株に対して、投与方法の違いを比較したものであり、ウイルスの感染力自体は、ウイルス株や細胞株によって異なることはいうまでもなく、本結果が全てのウイルス株や細胞株に同じようにあてはまるとはいえないことに留意すべきであると思われる。

### D. 考察

HCV は日本で 100-200 万人、世界中で 17000 万人にのぼる感染者が存在する。高率に持続感染化し、慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症である。インターフェロ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が可能になり新規感染者は減少しているが、その感染経路には不明の点が多い。HCV の感染リスクを明らかにすることにより、感染予防法を確立することが可能となる。HCV の新規予防を確立することができれば、今後生じる HCV 感染者を減らすことができる。

### E. 結論

先に述べたように実験的な結果であるが、フィブリンノーゲン糊に HCV 陽性血清を混合して投与すると HCV 陽性血清のみの場合よりも感染効率が高くなる結果が得られた。今後はそのメカニズムの検討が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.

2. 学会発表および講演など

- 1) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2008)
- 2) T Date, T Kato, H Takahashi, T Wakita, Adaptive mutations enhance viral RNA replication of JFH-2, another genotype 2a HCV strain isolated from a fulminant hepatitis patient. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease in Washington, DC, (March 20-24, 2009)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

HCVの感染経路による感染性についての解析

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨 肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHCVキャリアは100-200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は3万人におよぶ。HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。HCVの新規感染は輸血および血液製剤のスクリーニングが開始されてから激減した。しかし、その感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するためその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合などの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによるHCVの感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。そこで、本研究では血液製剤などからのHCVの感染経路による感染危険性の差を検証する。

A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。HCVキャリアは100-200万人がいまだに存在し、その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は3万人におよぶ。HCVの新規感染は輸血および血液製剤のスクリーニングが開始されてから激減した。しかし、その感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するためその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合などの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによるHCVの感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。

B. 研究方法

感染材料の検討

JFH-1株およびJFH-2株の全長HCV遺伝子構築から試験管内で全長HCV RNAを合成する。合成RNAをHuh7細胞に導入しその導入細胞を経代培養する。培養上清から感染性ウイルスを回収してその感染力価、HCV RNA量、HCVコアタンパク量などを測定する。また、患者血清中のHCV RNA量を測定する。

（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

#### 感染材料の検討

試験管内で合成した全長HCV RNAをHuh7細胞に導入し、その導入細胞を経代培養した。培養上清には感染性HCV粒子が分泌された。その感染力価は $10^4 \sim 10^5$  FFU/ml、HCV RNA濃度は $10^7 \sim 10^8$  copies RNA/ml、HCVコアタンパク濃度は $10^4 \sim 10^5$  fmol/Lであった。患者血清中のウイルス量はJFH-1株で $9.6 \times 10^7$  copies RNA/ml、JFH-2株で $4.7 \times 10^7$  copies RNA/mlであった。JFH-1株の場合、培養細胞で作製したウイルス(HCVcc)および患者血清の感染をヒト肝細胞移植キメラマウスで確認できた。しかし、JFH-2株では患者血清は感染したが、HCVccは感染しなかった。

### D. 考察

HCVは日本で100-200万人、世界中で1700万人にのぼる感染者が存在する。高率に持続感染化し、慢性肝炎から肝細胞癌を発症する重大な感染症である。インターフェロ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が可能になり新規感染者は減少しているが、その感染経路には不明の点が多い。HCVの感染リスクを明らかにすることにより、感染予防法を確立することが可能となる。HCVの新規予防を確立することができれば、今後生じるHCV感染者を減らすことができる。

### E. 結論

患者血清はキメラマウスに感染性があるが、培養細胞で作製したウイルスには感染性のあるものと無いものがある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.

#### 2. 学会発表および講演など

- 1) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2008)
- 2) T Date, T Kato, H Takahashi, T Wakita, Adaptive mutations enhance viral RNA replication of JFH-2, another genotype 2a HCV strain isolated from a fulminant hepatitis patient. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease in Washington, DC, (March 20-24, 2009)

### G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 感染ウイルスの解析

研究分担者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 室長 加藤 孝宣

研究要旨 血液製剤は複数の供血者からの血液を材料として作製することがあるため、肝炎ウイルスが複数の供血者から混入する可能性があったと考えられる。また、C型肝炎ウイルスは Quasispecies の状態で宿主に感染していると考えられているが、血液を介して感染する際にどのようなウイルス population の変化があるかはほとんどわかっていない。そこで患者血清をチンパンジーに感染させてその population の変化を解析した。

### A. 研究目的

肝炎ウイルスによる慢性肝炎は我が国の国民病とも呼ばれている。HCV キャリアは100-200万人がいまだに存在し、その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行し、肝臓癌による年間死亡者は3万人におよぶ。HCVの新規感染は輸血および血液製剤のスクリーニングが開始されてから激減した。しかし、その感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するためその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合にどの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによるHCVの感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。

### B. 研究方法

#### 血清のチンパンジーへの感染

JFH-1株の患者血清を $9.6 \times 10^6$  copy HCV RNA 相当量、経静脈的にチンパンジーへ投与した。投与後チンパンジーの感染を血清中のHCV RNAの測定により検出した。

### C. 研究結果

#### 血清のチンパンジーへの感染

JFH-1株血清はチンパンジーへ感染が成立した。HCV血症は間歇的に接種後36週目まで観察でき、その後陰性化した。感染後2週、19週、23週目のウイルス配列を解析すると変異が徐々に蓄積することが明らかとなった。現在これらの変異の意義をリバースジェネティクス法で解析中である。

### D. 考察

チンパンジーに患者血清を接種すると感染が成立し、感染後のチンパンジーから得られたウイルスの配列は感染源の患者血清中のウイルスと比較すると変異が多く含まれていた。チンパンジーに感染した際に適合するために必要な変異であることが考えられた。HCVは感染患者中でQuasispeciesを形成し、新たな宿主に感染後はさらに選択と適合を繰り返していくと考えられた。

なお本研究は米国NIHのJake T Liang博士および米国CDCのKris Krawczynski博士との共同研究である。

## E. 結論

患者血清はチンパンジーに感染した。ウイルスの配列は感染後も変異した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.

### 2. 学会発表および講演など

1) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2008)

2) T Date, T Kato, H Takahashi, T Wakita, Adaptive mutations enhance viral RNA replication of JFH-2, another genotype 2a HCV strain isolated from a fulminant hepatitis patient. 13th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease in Washington, DC, (March 20-24, 2009)

## G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

HCVのヒト肝細胞キメラマウスへの感染

研究分担者： 名古屋市立大学大学院・医学研究科 准教授 田中 靖人

分担研究課題： キメラマウスを用いた血液製剤に含まれるC型肝炎ウイルスの感染実験

研究要旨：血液製剤などからのC型肝炎ウイルス(HCV)の感染経路による感染危険性の差を検証するために、HCV感染源(血清)104 IUを混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与、及び肝臓の創傷面に摺り込む群に分けて投与した結果、全例感染を認めた。さらに、感染力価を検討する目的で、102または103 IU相当のHCV感染源を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与した結果、102 IU投与での感染成立が確認された。さらに、異なる感染方法、感染ルートによるHCV感染効率の違いを検討した結果、2 IU相当のHCV感染源を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与することにより、HCV感染が確認された(血清のみでは未感染)。また、2 IU相当のHCV感染源を混合したフィブリノーゲン製剤を静脈内接種することにより、100%感染した。フィブリノーゲン糊や製剤にHCVを混合することにより感染効率が良くなることがわかった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の感染経路に関しては未だに不明の点が多い。輸血の場合、ウイルスが直接血流に入り、肝細胞に到達するためその感染率は高いと考えられるが、ウイルスを含んだ血液や血液に汚染された医療器具などが、皮膚や創傷面などに触れた場合にどの程度の感染の危険性があるかはよくわかっていない。従って、様々な感染経路の違いによるHCVの感染の危険性の差を検証することは、肝炎ウイルスの感染の予防法を確立するために重要である。本研究では血液製剤などからのHCVの感染経路による感染危険性の差を検証する。

B. 研究方法

かつて問題となったHCVが含まれるフィブリノーゲン製剤や糊を入手することは出来ないため、現在市販されているフィブリノーゲン製剤及び糊にHCV感染源を混合して実験を行うこととした。

HCV感染源として、すでにヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて感染性が確認されているHCV genotype 1b患者血清を用いた。以下の研究はこの感染源を用いて行う。

- 1) HCV感染源1x104 IUを混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与する群(n=5)と、肝臓の創傷面に摺り込む群(n=5)に分けて感染実験を行う。
- 2) 感染力価の検討：102または103 IU相当のHCV感染源を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与し、その感染性を確認する。
- 3) HCV感染源である血清1x102 IUを直接腹腔内に投与する(ip)→感染成立しなければ、103 IUへ増量する。
- 4) 102 IU相当の感染源を市販フィブリノーゲン製剤に混合して静注する(iv)→感染成立しなければ、103 IUへ増量する。
- 5) 異なる感染方法、感染ルートによるHCV感染効率の違い：a) 腹腔内接種(血清のみ)、b) 腹腔内接種(フィブリノーゲン糊に血清を混合)、c) 静脈内接種(血清のみ)、4) 静脈内接種(フィブリノーゲン製剤に血清を混合)⇒それぞれHCV感染源2 IU相当を投与→感染成立しなければ、10 IUへ増量する。

C. 研究結果

かつて問題となったHCVが含まれるフィブリノー

ゲン製剤や糊を入手することはできないため、現在市販されているフィブリノーゲン製剤及び糊に HCV 感染源を混合して実験を行うこととした。

このため、HCV が含まれるプール血清から製造され、不活化処理を経たとされる血液製剤とまったく同一の条件であるとは言えないが、HCV 感染源 1x10<sup>4</sup> IU を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与する群 (n=5) と、肝臓の創傷面に摺り込む群 (n=5) に投与した結果、全例 HCV 感染を認めた。投与 2 週目には HCV-RNA 陽性となり、4 週目には 1x10<sup>7</sup> IU/mL 以上のウイルス量となった。さらに、感染力価を検討する目的で、1x 10<sup>2</sup> または 1x 10<sup>3</sup> IU 相当の HCV 感染源を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与した結果、1x 10<sup>3</sup> IU 接種で 2/3 匹で感染が成立、1x 10<sup>2</sup> IU 接種では 3/3 匹で感染成立が確認された。感染しなかった 1 匹はアルブミン量が相対的に低く、ヒト肝細胞の置換率が低いことが未感染の要因と考えられた。3) 4) の感染実験では、1x 10<sup>2</sup> IU 接種でそれぞれ 100% (4/4) 感染が成立した。5) すべての群で HCV 感染源 2 IU (感染しなければ、10 IU ≪) で感染実験を行った。

- a) 腹腔内接種 (血清のみ) ⇒ 0/3 (0/3): 0%
- b) 腹腔内接種 (フィブリノーゲン糊に血清を混合) ⇒ 1/3 (1/2): 67%
- c) 静脈内接種 (血清のみ) ⇒ 0/3 (2/3): 67%
- d) 静脈内接種 (フィブリノーゲン製剤に血清を混合) ⇒ 3/3: 100%

なお、本実験系は同一のウイルス株で同一の細胞株に対して、投与方法の違いを比較したものであり、ウイルスの感染力自体は、ウイルス株や細胞株によって異なることはいうまでもなく、本結果が全てのウイルス株や細胞株に同じようにあてはまるとはいえないことに留意すべきであると思われる。

#### D. 考察

かつて問題となった HCV が含まれるフィブリノーゲン製剤や糊を入手することはできないため、現在市販されているフィブリノーゲン製剤及び糊に HCV 感染源を混合して実験を行うこととした。

このため、HCV が含まれるプール血清から製造さ

れ、不活化処理を経たとされる血液製剤とまったく同一の条件であるとは言えないが、2 IU 相当の HCV 感染源を混合したフィブリノーゲン糊を腹腔内投与することにより、HCV 感染が確認された (33%)。また、2 IU 相当の HCV 感染源を混合したフィブリノーゲン製剤を静脈内接種することにより、100% 感染した。HCV 感染源単独よりもフィブリノーゲン糊や製剤に HCV を混合することにより感染効率が良くなることがわかったが、本実験系は同一のウイルス株で同一の細胞株に対して、投与方法の違いを比較したものであり、ウイルスの感染力自体は、ウイルス株や細胞株によって異なることはいうまでもなく、本結果が全てのウイルス株や細胞株に同じようにあてはまるとはいえないことに留意すべきであると思われる。

なお、今後は、*in vitro* の感染モデルを用いて、そのメカニズムの検討が待たれる。

#### E. 結論

先に述べたように実験的な結果であるが、HCV 感染源を混合したフィブリノーゲン糊の投与による感染率は、高いことがわかった。

#### F. 研究発表

- 1. 論文発表  
該当なし

- 2. 学会発表  
該当なし

#### G. 知的所得権の所得状況

- 1. 特許取得  
該当なし

- 2. 実用新案登録  
該当なし

- 3. その他  
該当なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

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

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kato T</u> , Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, <u>Wakita T</u> , Krawczynski K, Liang TJ	Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation.	Hepatology	48(3)	732-40	2008

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊



# Hepatitis C Virus JFH-1 Strain Infection in Chimpanzees Is Associated With Low Pathogenicity and Emergence of an Adaptive Mutation

Takanobu Kato,<sup>1-3</sup> Youkyung Choi,<sup>4</sup> Gamal Elmowalid,<sup>1</sup> Ronda K. Sapp,<sup>1</sup> Heidi Barth,<sup>1</sup> Akihiro Furusaka,<sup>5</sup> Shunji Mishiro,<sup>2</sup> Takaji Wakita,<sup>3</sup> Krzysztof Krawczynski,<sup>4</sup> and T. Jake Liang<sup>1</sup>

The identification of the hepatitis C virus (HCV) strain JFH-1 enabled the successful development of infectious cell culture systems. Although this strain replicates efficiently and produces infectious virus in cell culture, the replication capacity and pathogenesis *in vivo* are still undefined. To assess the *in vivo* phenotype of the JFH-1 virus, cell culture-generated JFH-1 virus (JFH-1cc) and patient serum from which JFH-1 was isolated were inoculated into chimpanzees. Both animals became HCV RNA-positive 3 days after inoculation but showed low-level viremia and no evidence of hepatitis. HCV viremia persisted 8 and 34 weeks in JFH-1cc and patient serum-infected chimpanzees, respectively. Immunological analysis revealed that HCV-specific immune responses were similarly induced in both animals. Sequencing of HCV at various times of infection indicated more substitutions in the patient serum-inoculated chimpanzee, and the higher level of sequence variations seemed to be associated with a prolonged infection in this animal. A common mutation G838R in the NS2 region emerged early in both chimpanzees. This mutation enhances viral assembly, leading to an increase in viral production in transfected or infected cells. **Conclusion:** Our study shows that the HCV JFH-1 strain causes attenuated infection and low pathogenicity in chimpanzees and is capable of adapting *in vivo* with a unique mutation conferring an enhanced replicative phenotype. (HEPATOLOGY 2008;48:732-740.)

**H**epatitis C virus (HCV) infects approximately 170 million people worldwide and is a major causative agent of chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma.<sup>1,2</sup> However, the underlying biological mechanisms of pathogenesis and persistence are still not well understood. No vaccine protecting against HCV infection is

currently available.<sup>3</sup> Therapy for HCV-related chronic hepatitis remains problematic, with limited efficacy, high cost, and substantial adverse effects.<sup>1,4,5</sup> Understanding the biology of this virus and the development of new therapies has been hampered by a lack of appropriate model systems for replication and infection of this virus.

*Abbreviations:* ALT, alanine aminotransferase; ELISpot, enzyme-linked immunosorbent spot; FFU, focus-forming unit; HCV, hepatitis C virus; HVR, hypervariable region; IFN- $\gamma$  interferon gamma; JFH-1cc, cell culture generated JFH-1 virus; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SFU, spot-forming unit; WT, wild-type.

From the <sup>1</sup>Liver Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; the <sup>2</sup>Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital, Shinagawa, Tokyo, Japan; the <sup>3</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo, Japan; the <sup>4</sup>Division of Viral Hepatitis, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta; and the <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine (Daisan), Komae, Tokyo, Japan.

Received February 4, 2008; accepted May 7, 2008.

TK and TW were partially supported by a grant-in-aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science and from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan; and by the Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation. This work was supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH, and Division of Viral Hepatitis, Center for Disease Control and Prevention.

Dr. Furusaka is currently affiliated with Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan.

Address reprint requests to: Dr. T. Jake Liang, Liver Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892. E-mail: JakeL@bdg10.niddk.nih.gov; fax: 301-402-0491.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22422

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Recent progress with a unique HCV genotype 2a strain, JFH-1, isolated from a case of fulminant hepatitis in Japan, has led to the development of a robust HCV infectious cell culture system.<sup>6-9</sup> This JFH-1 strain can replicate efficiently, produce the infectious viral particles, and show robust infection *in vitro*. However, in our previous report, the inoculation of cell culture-generated JFH-1 virus (JFH-1cc) induced only transient and attenuated infection in a chimpanzee.<sup>8</sup> The observed low virulence of this strain *in vivo* was unexpected but consistent, with an inverse relationship between *in vivo* and *in vitro* properties of cell culture adaptive mutations in the HCV replicon system.<sup>10</sup>

In this study, we performed an extensive analysis of the *in vivo* replication and pathogenicity of the JFH-1 strain by inoculating chimpanzees with JFH-1cc and patient serum from which the JFH-1 strain was isolated. Furthermore, we analyzed viral sequences during the infection to identify mutations that might represent *in vivo* adaptive mutations with unique phenotypes.

## Materials and Methods

**Cell Culture.** Huh7 derivative cell lines Huh7.5 and Huh7.5.1 were provided by Charles Rice (Rockefeller University, New York, NY) and Francis Chisari (Scripps Research Institute, La Jolla, CA), respectively.<sup>7,9</sup> The Huh7 derivative clone Huh7-25 that lacks CD81 expression was reported previously.<sup>11</sup>

**Inocula.** The production of JFH-1cc has been reported previously.<sup>12</sup> Briefly, the full-length JFH-1 RNA was synthesized by *in vitro* transcription with linearized pJFH-1 plasmid and MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX).<sup>8</sup> Ten micrograms full-length JFH-1 RNA was transfected into  $3.0 \times 10^6$  Huh7 cells by electroporation, and the culture medium with JFH-1cc was harvested 5 days after transfection. The culture medium was passed through a 0.45- $\mu$ m filter unit. The case of fulminant hepatitis C from which the JFH-1 strain was isolated has been reported previously.<sup>6</sup> An aliquot of acute-phase serum (point A as indicated by Kato et al.<sup>6</sup>) was used in this study. To determine the HCV RNA titers in these inocula, total RNA was extracted from 140  $\mu$ L of these samples by QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Valencia, CA), and copy numbers of HCV RNA were determined by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), as described previously.<sup>13</sup>

**Infection Study in Chimpanzees.** Housing, maintenance, and care of the chimpanzees used in this study conformed to the requirement for the humane use of animals in scientific research as defined by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Centers for

Disease Control and Prevention. Chimpanzee 10273 (CH10273, female, age 5, 20 kg) was inoculated intravenously with 100  $\mu$ L serum ( $9.6 \times 10^6$  copies) from the fulminant hepatitis patient mixed with 400  $\mu$ L Dulbecco's modified Eagle's medium culture medium. Chimpanzee 10274 (CH10274, female, age 5, 22 kg) was inoculated intravenously with 500  $\mu$ L Dulbecco's modified Eagle's medium culture medium containing JFH-1cc ( $1.4 \times 10^7$  copies). Serum and liver biopsy samples of these animals were obtained at baseline and weekly after inoculation.

**Measurement of HCV RNA, anti-HCV, and Alanine Aminotransferase.** HCV RNA in chimpanzees was quantitatively measured by nested RT-PCR with a sensitivity of detection of approximately 50 IU/mL (COBAS Amplicor; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) and was quantified using Amplicor Monitor (Roche Molecular Systems). Serum samples were tested for anti-HCV (ORTHO version 3.0 enzyme-linked immunosorbent assay test system, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ). Serum alanine aminotransferase (ALT) values in chimpanzee's sera were established using a commercially available assay kit in accordance with the manufacturer's instructions (Drew Scientific, Dallas, TX). Cutoff values representing 95% confidence limit for the upper level of normal ALT activity were calculated individually for each chimpanzee using 10 pre-inoculation enzyme values obtained over a period of 4 to 6 weeks, and were 73 U/L in CH10274 and 76 U/L in CH10273.

**HCV Sequencing.** The total RNA was extracted from 280  $\mu$ L chimpanzee sera collected at appropriate time points by the use of QIAamp viral RNA kit, and complementary DNA was synthesized by use of Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). The complementary DNAs were subsequently amplified with TaKaRa LA *Taq* DNA polymerase (Takara Mirus Bio, Madison, WI). Five separate fragments were amplified by nested PCR covering the entire open reading frame and a part of the 5'UTR of the JFH-1 strain as follows; nt 128-1829, nt 1763-4381, nt 4278-6316, nt 6172-7904, and nt 7670-9222. The sequence of each amplified fragment was determined directly. The fragment encompassing hypervariable region 1 (HVR-1) (nt 128-1829) was cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) and 10 clones from each time point were sequenced.

**T-Cell Proliferation and Interferon- $\gamma$  Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assays.** The cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were used for immunological analysis. Standard T-cell proliferation assay was performed as described previously.<sup>14</sup> Cells were stimulated with recombinant HCV genotype 2a core or NS5a protein (Fitzgerald Industries Interna-

tional, Concord, MA) and pulsed with  $^3\text{H}$ -thymidine (GE Healthcare BioSciences, Piscataway, NJ). T-cell stimulation was expressed as a stimulation index that was calculated as the ratio of average counts per minute (CPM) of antigen-stimulated proliferation over average CPM of the medium background. A sample was considered positive when the average stimulation index was greater than 5. The numbers of antigen-specific interferon gamma (IFN- $\gamma$ )-producing cells were analyzed by enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay. PBMCs were stimulated with recombinant protein antigens (HCV core and NS5a proteins) and HCV overlapping peptide pools (15mers overlapped by 10 amino acids) from core (38 peptides, amino acids 1-195) and NS3 (56 peptides, amino acids 1031-315)(Mimotopes, Raleigh, NC). The NS3 overlapping peptide pools were divided into two sets. The number of spots was counted by using a computer-assisted AID ELISpot Reader System and AID software version 3.5 (Autoimmune Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany). Antigen-specific spot-forming unit (SFU) was calculated by subtracting the average of background values (four wells without antigen, typically fewer than 10 spots) from that of the antigen-stimulated sample. The sample was considered positive when the background-corrected SFU was greater than 10 and twice or more the mean SFU of the preinfection samples in the same animal.

To specifically evaluate the T-cell response against the NS2 region containing the G838R mutation, two peptides of 18 amino acids (NS2-G: ITLFTLTPGYKTLGQCL and NS2-R: ITLFTLTPRYKTLGQCL) were synthesized (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX). PBMCs from both chimpanzees were stimulated with the wild-type (WT) and mutant peptides (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and analyzed for IFN- $\gamma$  production by IFN- $\gamma$  ELISpot assays as described.

**Production of JFH-1 G838R Mutant Virus.** The full genome JFH-1 construct with G838R mutation in the NS2 region was generated by site-directed mutagenesis. The replication-deficient clone of JFH1 generated by introducing a point mutation into the GDD motif of the NS5B to abolish the RNA-dependent RNA polymerase activity was used as a negative control (JFH-1 GND).<sup>8</sup>

**Quantification of HCV RNA and HCV Core Antigen.** To determine the amount of HCV, total RNA was extracted with QIAamp Viral RNA Kit from 140  $\mu\text{L}$  culture medium, or with RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) from cell pellet. Copy numbers of HCV RNA were determined by real-time quantitative RT-PCR as described. HCV core antigen (Ag) in culture supernatant was quantified by highly sensitive enzyme immunoassay (Ortho HCV core antigen ELISA Kit, Ortho

Clinical Diagnostics, Tokyo, Japan).<sup>15</sup> To determine intracellular HCV core Ag, the cell pellet was resuspended with 100  $\mu\text{L}$  radioimmune precipitation assay buffer containing 1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% NP40, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM ethylenediaminetetra-acetic acid, 150 mM NaCl, and Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), then sonicated 10 minutes and subjected to the Ortho HCV core antigen enzyme-linked immunosorbent assay after centrifugation.

**Titration of HCV Infectivity.** To assess the intracellular infectivity, cells were harvested by treatment with trypsin-ethylenediaminetetra-acetic acid and pelleted by centrifugation. Cell pellets were resuspended with 500  $\mu\text{L}$  Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and lysed by four freeze-thaw cycles. The supernatant was collected after centrifugation and passage through a 0.45- $\mu\text{m}$  filter. These cell lysates and culture supernatants were serially diluted fivefold and inoculated into naïve Huh7.5.1 cells seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well flat-bottom plates and assayed for focus-forming unit (FFU) by anti-core immunofluorescence as described previously.<sup>16</sup>

**Statistical Analysis.** Data from repeated experiments were averaged and expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

**Clinical, Virological, and Immunological Profiles of JFH-1-Infected Chimpanzees.** Chimpanzee 10273 (CH10273) was inoculated with patient serum containing  $9.6 \times 10^6$  copies of HCV RNA. Chimpanzee 10274 (CH10274) was inoculated with  $1.4 \times 10^7$  copies of JFH-1cc in culture medium. In both chimpanzees, HCV RNA became detectable in serum by RT-PCR 3 days after inoculation. Viremia was low, with titers of approximately  $10^3$  copies/mL. Serum ALT levels were within normal limits, and histological observation of liver biopsy showed no evidence of hepatitis (Fig. 1). In CH10273, HCV RNA in serum fluctuated but persisted for 34 weeks after inoculation, and anti-HCV was detected from 20 weeks after inoculation (Fig. 1A). In CH10274, serum HCV RNA disappeared at 9 weeks after inoculation, and no anti-HCV seroconversion was observed (Fig. 1B).

Immunological analysis for T-cell proliferation and IFN- $\gamma$  production showed that HCV-specific immune responses were induced in both animals (Fig. 1). Their responses corresponded to the profiles of viremia and remained at low levels after disappearance of viremia. The

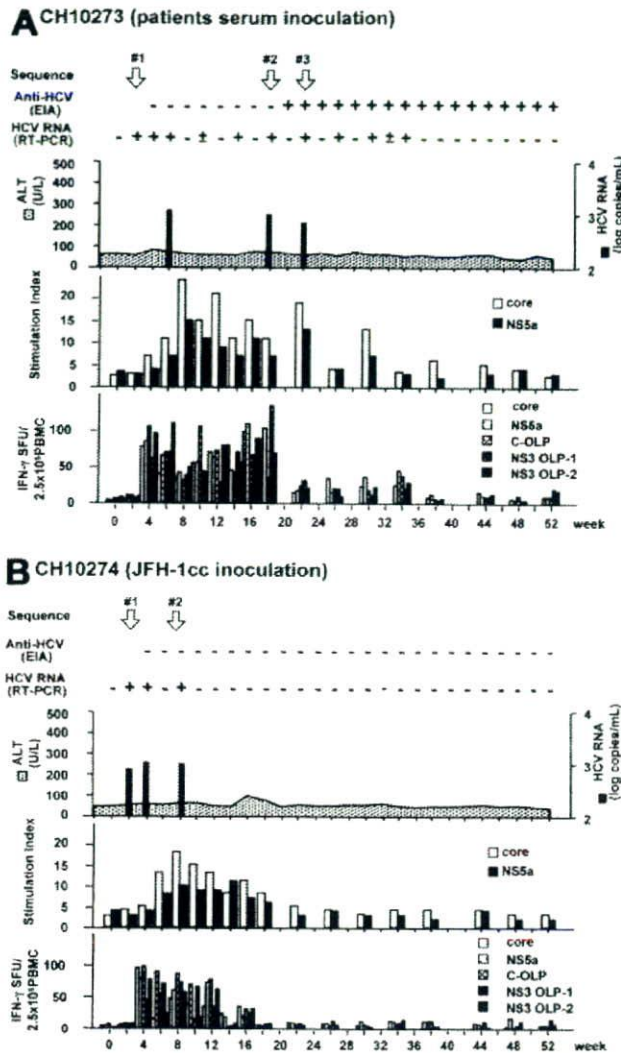


Fig. 1. Infection profiles and T cell immune responses in patient serum-inoculated and JFH-1cc-inoculated chimpanzees. (A) Chimpanzee CH10273 was inoculated with patient serum containing  $9.6 \times 10^6$  copies of HCV. (B) Chimpanzee CH10274 was inoculated with JFH-1cc containing  $1.4 \times 10^7$  copies of HCV. White arrows indicate the time points at which HCV sequences were determined. T cell proliferation assay results against HCV core and NS5a are shown as stimulation index (middle panel). IFN- $\gamma$  responses against HCV core and NS5a proteins or overlapping peptide pools of core and NS3 are shown as SFU per  $2.5 \times 10^5$  cells (bottom panel).

T-cell proliferative responses against the HCV core and NS5a proteins became positive 4 weeks after inoculation and continued up to 30 and 18 weeks in CH10273 and CH10274, respectively. Likewise, the IFN- $\gamma$  responses against HCV structural and nonstructural antigens were detected 4 weeks after inoculation and maintained 34 weeks and 16 weeks in CH10273 and CH10274, respectively (Fig. 1).

**HCV Sequence Analysis.** To investigate the difference and evolution of infected viruses, HCV sequences in

both chimpanzees were determined directly at multiple time points as indicated in Fig. 1. In CH10273, HCV sequences were determined with sera collected at weeks 2, 19, and 23. Nineteen synonymous and six nonsynonymous mutations were already observed at week 2, and the number of mutations increased gradually with time (Table 1). Conversely, CH10274 showed no mutation at the earliest time point of infection (week 2) but subsequently developed four synonymous and seven nonsynonymous mutations at week 7 (Table 1). The mutated amino acids in the JFH-1 genome were distributed in E2, NS2, NS5a, and NS5b regions (Fig. 2A). Among these mutations, only one mutation, G838R in NS2, was identified as a common mutation between the two chimpanzees. To assess the complexity of the quasispecies, the amplified fragment encompassing HVR-1 was cloned and 10 clones in each time point were sequenced. In both animals, HVR populations of isolated HCV indicated similarly low complexity of heterogeneity (Fig. 2B). HCV clones isolated from CH10273 contained one HVR-1 mutation N397S at the earliest time point of infection, and this mutation could not be found in clones of the inoculum (Fig. 2B). To exclude the possibility of PCR artifact, sequences were confirmed by independent analyses. To ensure that the common NS2 mutant was not present as a minor species at the earliest time point of CH10274 (week 2), cloning (15 clones) and sequencing was performed and showed the WT sequence.

**Effect of the NS2 Mutation on HCV Life Cycle.** To assess whether this NS2 mutation could be a result of cytotoxic T-lymphocyte escape, which has been described in acutely HCV-infected chimpanzees,<sup>17</sup> we tested the T cell response of PBMCs from various time points during the infection against 18-mer peptides encompassing this region (both the WT and mutant sequences were tested). No T cell response could be detected against either the WT or mutant peptides throughout the infection, therefore making cytotoxic T-lymphocyte escape mutation highly unlikely. To assess the phenotype of the observed common mutation, G838R in the NS2 region, JFH-1 construct with this mutation was generated (JFH-1

Table 1. Sequence Evolution of JFH-1 in Chimpanzees

	Synonymous Mutations*	Non-synonymous Mutations*	Total
CH10273			
#1 (week 2)	19	6	25
#2 (week 19)	33	15	48
#3 (week 23)	35	17	52
CH10274			
#1 (week 2)	0	0	0
#2 (week 7)	4	7	11

\*Compared with the consensus JFH-1 sequence.