

表2 肝硬変患者の入院時年齢

	飲酒群	少量群	非飲酒群
C型肝硬変 (n=368)	61.3 ± 10.7 (n=57)	65.7 ± 8.0 (n=104)	69.1 ± 8.8 (n=207)
B型肝硬変 (n=68)	52.0 ± 9.6 (n=10)	51.5 ± 12.3 (n=25)	57.4 ± 11.8 (n=33)
アルコール性肝硬変 (n=48)	61.0 ± 12.5 (n=48)	—	—

* P<0.01

(山梨大学第一内科 1997 ~ 2007 年)

均 61.0 ± 12.5 歳であった⁵⁾。C型肝硬変 368 例を 1 日飲酒量で 3 合以上の飲酒群 57 例，3 合未満の少量群 104 例，非飲酒群 207 例に分類し入院時年齢を比較すると，それぞれ 61.3 ± 10.7 歳，65.7 ± 8.0 歳，69.1 ± 8.8 歳と，飲酒量が多いほど若年であり，それぞれに統計学的有意差を認めた (p<0.01, Kruskal-Wallis-H-test, Mann-Whitney-U-test with Bonferroni Correction) (表 2)。大学病院である当科へ入院する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を始めとする合併症などへの積極治療が必要な症例であり，入院時年齢の差はこうした積極治療を要する状態へ進行する期間の違いを表すと考えられる。今回の検討では，飲酒者で C 型肝硬変は早期に完成し合併症を来し，飲酒量の程度によっても進行速度に違いがあると推測される。B 型肝硬変 68 例では飲酒群 10 例，少量群 25 例，無飲酒群 33 例での平均入院時年齢はそれぞれ 52.0 ± 9.6 歳，51.5 ± 12.3 歳，57.4 ± 11.8 歳であった (表 2)。B 型肝硬変は C 型と比較し若年で肝硬変となるため差が出にくく，また今回は少数例での検討であったため統計学的有意差は認めなかったが，飲酒群，少量群は無飲酒群に比較し若年であった。

アルコールによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖の促進

C 型慢性肝炎患者での飲酒，あるいは HCV レプリコン発現細胞へのアルコール投与により HCV の増殖は促進されとの報告が多い。Pession ら⁶⁾の C 型慢性肝炎患者 233 例中 110 例の飲酒群 (191 g/週)

では血中 HCV-RNA 量は平均 $41 \text{ meq} \cdot 10^{-5}$ であり、非飲酒群 123 例での平均 $24 \text{ meq} \cdot 10^{-5}$ と比較し有意に高値であった。Romero-Gomez ら⁷⁾ は 50 例の C 型慢性肝炎患者において、肝組織中の HCV-RNA 量を測定し飲酒量との間に正の相関を認めている。McCartney ら⁸⁾ および Zhang ら⁹⁾ は HCV レプリコン細胞へのアルコール投与によりレプリコン RNA は濃度依存性に増殖が増強され、このアルコールの作用には前者ではシトクロム P450 2E1 が、後者では NF- κ B と内因性オピオイドの活性化が必要であるとしている。こうしたアルコールによる HCV の増殖に対するメカニズムの検討はまだまだ十分とは言えないが、免疫抑制作用が 1 つの可能性として考えられている。Norkina ら¹⁰⁾ は JAK/STAT 経路を抑制する SOCS1/SOCS3 の発現がアルコール摂取により増強されることを報告している。また、Szabo ら¹¹⁾ はアルコール摂取後、単球や樹状細胞などの抗原提示細胞機能低下を介した抗原特異的 T 細胞の活性低下と、IFN γ の産生低下、インターロイキン (IL)-10, IL-13 の増加を報告している。

C 型慢性肝炎に対する IFN 治療へのアルコールの影響

C 型慢性肝炎患者に対し IFN 治療の適応を検討する際には、性、年齢、組織学的進行度、活動性、ウイルス型、ウイルス量、IFN 感受性決定領域 (ISDR) やコアタンパク変異、合併症などを総合的に評価することとなるが、常習飲酒者へは禁酒を指導し、もしも禁酒が徹底できなければ導入は見合わせるというのが一般的な対応と思われる。現在進行形での飲酒者へは通常治療を行わないため、IFN 治療と飲酒の関連についての文献も過去の飲酒量や禁酒期間の治療効果への影響についての検討がほとんどである。IFN 単独療法での報告の多くは、過去の飲酒者では非飲酒者と比較し著効率が低いと結論している^{12~14)}。Anand ら¹⁵⁾ による IFN α 2b-リバビリン併用療法での報告では、406 例の多量飲酒群 (6 杯以上/日) での著効率は 19% で、142 例の非飲酒群での著効率 20% と差を認めなかったが、早期脱落率を禁酒期間 12 ヶ月未満と 12 ヶ月以上とに分けて検討すると、前者では 40%、後者で 26% と有意差を認めている。Chang ら¹⁶⁾ による Peg-IFN α 2b-リバビリン併用療法での検討では、34 例の著効群の過去の飲酒量は平均 10 g/日、81 例の非著効群では 62 g/日であり有

表3 PEG-IFN, リバビリン併用療法における飲酒量別の治療効果と背景因子

	飲酒群 (n=15)	少量群 (n=44)	非飲酒群 (n=70)
SVR 率 (%)	46.7 %	50.0 %	57.1 %
年齢	52.4 ± 8.6	55.5 ± 7.7	54.6 ± 10.9
男：女	14：1	38：6	26：44
ウイルス量 (KIU/ml)	1682 ± 1457	1598 ± 1211	1628 ± 1253
γ-GTP (IU/L)	104.7 ± 74.2	58.7 ± 36.2	48.0 ± 34.3
ALT (IU/L)	99.5 ± 58.4	86.1 ± 65.1	87.7 ± 60.5
Plt (10 ³ /ml)	14.5 ± 5.0	14.3 ± 4.7	15.0 ± 4.9

* P<0.01

(山梨大学第一内科 2004～2008年)

略語：巻末の略語集参照

意差を認めている。しかし、intention-to-treat 解析では差を認めた
が、脱落例を除いた per-protocol 解析では有意差なしと考察してい
る。これら2つの報告から、リバビリン併用療法では、治療が完遂で
きれば過去の飲酒例においても非飲酒例と遜色ない治療効果が期待で
きるが、飲酒歴は脱落率と相関すると考えられた。

飲酒による IFN 治療効果への影響の評価のため、2004～2008 年
の間に当科にて1型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対して Peg-
IFNα2b-リバビリン併用療法を導入した129例を、過去の飲酒量別
に1日3合以上の飲酒群、3合未満の少量群、非飲酒群の3群に分類
し検討した。全例で治療期間中の禁酒は徹底された。飲酒群15例で
の著効率は46.7%、少量群44例では50%、非飲酒群70例では
57.1%であり、3群間に有意差は認めなかった(表3)。飲酒群と少
量群では非飲酒群と比較し有意に男性が多く、γ-グルタミルトラン
スフェラーゼ(γ-GT)値は飲酒群で少量群と非飲酒群に比較し有意
に高値であった。年齢、ウイルス量、アラニンアミノトランスフェラ
ーゼ(ALT)値、血小板数では3群間に有意差を認めなかった。こ
の結果から、治療期間中の禁酒が徹底されていれば過去の飲酒量にか

かわらず抗ウイルス効果が期待できるため、常習飲酒者へは禁酒指導を行い、受け入れがよければ積極的に抗ウイルス療法を検討すべきと考える。

おわりに

ウイルス性肝炎患者では飲酒により慢性肝疾患の進行が速められ、合併症の発症や死亡までの期間が短縮されると考えられる。また、C型慢性肝炎における Peg-IFN α 2b-リバビリン併用療法では禁酒の徹底により非飲酒者と変わらない抗ウイルス効果が期待できる。そのため、すべてのステージの慢性ウイルス性肝炎患者で禁酒、節酒の指導を徹底するべきで、禁酒可能なC型慢性肝炎例においては積極的なIFN治療の導入が望ましい。

井上 泰輔・坂本 穰・榎本 信幸

文 献

- 1) 堀江義則: アルコール性肝硬変の実態と性差についての研究 平成 19 年度厚生労働科学研究費報告書. わが国における飲酒の実態ならびに飲酒に関連する生活習慣病, 公衆衛生上の諸問題とその対策に関する総合的研究. p121, 2008.
- 2) Otani K, et al: Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. *Gastroenterology* 128: 96-107, 2005.
- 3) Poynard T, et al: Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349: 825-832, 1997.
- 4) Marcellin P, et al: Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: Evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption. *J hepatol* 48: 200-207, 2008.
- 5) 門倉 信, 他: 肝硬変の成因別実態. 肝硬変の成因別実態 2008 (恩地森一 監), p161. 中外医学社, 東京, 2008.
- 6) Pessione F, et al: Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1717-1722, 1998.
- 7) Romero-Gomez M, et al: Intrahepatic hepatitis C virus replication is increased in patients with regular alcohol consumption. *Dig Liver Dis* 33: 698-702, 2001.
- 8) McCartney EM, et al: Alcohol metabolism increases the replication of hepatitis C virus and attenuates the antiviral action of interferon. *J Infect Dis* 198: 1766-1775, 2008.
- 9) Zang T, et al: Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 38: 57-65, 2003.
- 10) Norkina O, et al: Acute alcohol intake induces SOCS1 and SOCS3 and inhibits cy-

21 肝炎ウイルスマーカー

Don't Forget!

- B型肝炎の診断には、HBs抗原とHBc抗体が重要である。
- HBs抗体陽性であっても、免疫抑制・化学療法によりB型肝炎の再活性化により致死的な重症B型肝炎が発症することがある。
- HCV抗体は現在のC型肝炎ウイルス(HCV)感染と過去の感染の両方で陽性になるため、現在の感染の診断にはHCVRNA検査が必要である。

肝炎ウイルスには、主に経口感染するA型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)と、主に血液感染するB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)がある。これら肝炎ウイルスは、いずれも急性肝炎を発症するため、急性ウイルス性肝炎を疑う場合にはいずれの肝炎も念頭に置く必要がある。このうち、A型肝炎やE型肝炎は急性肝炎で終焉し、慢性化することがない。一方、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎は慢性化し、肝硬変や肝癌へと進展することがあるので注意が必要である。特に、B型肝炎は乳幼児期に感染すると持続感染し、ウイルスが排除されることはまれであるのに対し、成人期での感染では急性肝炎を発症し、ウイルス排除がなされる。また、HDVはHBVと同時に感染するか、HBVキャリアに重複感染するのみでHBVの存在なしに単独では感染しない。またC型肝炎には、いわゆるALT持続正常の慢性肝炎(PNALT)が存在するものの、多くは慢性肝炎を発症する。しかし、HBV、HCVいずれも肝癌と密接に関連していることから、慢性肝炎の原因として、HBVおよびHCVを診断することは極めて重要である。急性ウイルス肝炎と慢性肝炎のウイルスマーカーによる診断を表に示す(表1, 2)。

1 A型肝炎

A型肝炎はHAVの経口感染で起こり、通常2～6週間の潜伏期の後急性肝炎を発症する。小児では肝炎を発症しない不顕性感染もみられるが、成人では60～70%が典型的な肝炎を発症する。このうち1%未満が劇症化するが、多くは一過性感染で終焉し、慢性化することはない。急性A型肝炎の血清学的診断には、IgM-HA抗体の検出が最も重要で、治療すると中和抗体であるHA抗体が陽性となる。HA抗体にはIgM型、IgA型、IgG型が含まれるが、通常検出されるのはIgG型のHA抗体である。

2 B型肝炎

HBVは感染時期により病態が異なる。すなわち、幼少期に感染すると持続感染しウイルスキャリアとなる。この多くは母児間感染によるものと考えられ、1986年6月からは、公費による妊婦のHBs抗原検査と、HBe抗原陽性者より出生した児に対するHBワクチンとHBIG投与による母児間感染予防事業が行われ、事業開始以降の世代でのHBVキャリア率は激減した。一方、成人期の感染の多くは性行為による水平感染であり、急性肝炎ないしは劇症肝炎などの一過性感染を惹起し、わが国では慢性化することはまれである。しかし、最近遺伝

表1 急性ウイルス肝炎の診断

IgM-HA 抗体	IgM-HBc 抗体	HBs 抗原	HBc 抗体	HCV 抗体	HCV RNA	
+	-	-	-	-	-	A型急性肝炎
+	-	+	+	-	-	HBVキャリアの急性A型肝炎
+	-	-	-	+	+	HCVキャリアの急性A型肝炎
-	+	+または-	-	-	-	B型急性肝炎
-	-または+	+	+	-	-	HBVキャリアからの急性発症または急性増悪
-	-	-	-	+または-	+	C型急性肝炎
-	+	+または-	-	+	+	HCVキャリアの急性B型肝炎
-	-	+	+	+または-	+	HBVキャリアの急性C型肝炎
-	-	+	+	+	+	HBVおよびHCVキャリアからのB型肝炎発症ないしは急性増悪
-	-	-	-	-	-	非A非B非C型急性肝炎

表2 慢性肝炎の診断

HBs 抗原	HBc 抗体	HCV 抗体	
+	高力価+	-	B型慢性肝炎
+	+	+	B型肝炎・C型肝炎重複感染
-	+	-	B型慢性肝炎(潜在性)
-	低力価+	-	非B非C型慢性肝炎
-	-	+	C型慢性肝炎

子型Aによる慢性化例が急増しており、社会問題となっている。

a HBs 抗原, HBs 抗体……………

HBs 抗原はHBVの表面(surface)に存在する蛋白で、この存在は現在のHBV感染を意味し、これに対するHBs抗体はHBV感染の感染防御抗体として働くため、過去のHBVの感染と治癒を意味する。

b HBe 抗原, HBe 抗体……………

HBe 抗原は、HBVの増殖の際に血中に分泌される可溶性蛋白で、HBe抗原量はHBVの増殖能やウイルス量を反映する。すなわち、HBe抗原陽性の場合にはHBV量が多く、感染性が高く、肝炎の活動性が高い。一方、これに対するHBe抗体は、HBV DNA量の減少や肝炎の沈静化に伴い出現し、このHBe抗原の seroconversion

は治療の目標とされてきた。しかし、この現象はウイルス学的には年余にわたる持続感染の結果、HBVの core-promoter(CP)ないしは pre-core(Pre-C)に変異が生じ、HBe 抗原の産生が低下するためにみられる現象であり、必ずしも肝炎の沈静化を意味するものではないことが明らかになっている。現在は、CP 変異・Pre-C 変異の検査は保険適用となっている。

c HBc 抗原(コア関連抗原), HBc 抗体……………

HBc(コア)抗原はHBVに内包される蛋白で、従来は測定困難であったが、最近、コア関連抗原量として測定できる検出系が開発された¹⁾。これは逆転写酵素阻害薬を用いた治療中でも治療に阻害されないウイルス増殖を反映するため、治療効果のモニ

ターに有用である。また、HBc 抗原に対する HBc 抗体は、感染早期から検出され血中に長期間存在することから、HBV 感染のマーカーとして用いられる。特に、HBc 抗体が高力価陽性の場合にはたとえ HBs 抗原陰性であっても HBV キャリアの可能性を意味する。また低力価陽性の場合には、HBV 感染既往を意味する。最近、免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策として、厚生労働省研究班からガイドラインが示されている。HBs 抗原陰性でも HBs 抗体陽性または HBc 抗体陽性の場合には、免疫抑制・化学療法により HBV の再活性化が起これ、致死的な重症 B 型肝炎が発症する可能性があることから、HBV DNA が検出感度以上の場合は核酸アナログ製剤による抗 HBV 療法を行うことが推奨されている²⁾。

d IgM-HBc 抗体

IgM-HBc 抗体は、急性 B 型肝炎の感染初期に一過性に血中に出現する。このため B 型急性肝炎の診断に必須の検査として用いられる。HBV キャリアからの B 型肝炎の急性発症や急性増悪の場合にも、陽性化することがあるが、この場合の抗体価は一般に低く、かつ HBc 抗体が高力価陽性を示すことから鑑別可能である。

e HBV DNA 量

HBV DNA 量が B 型肝炎の病態や予後、治療効果予測に重要であることが近年明らかになり、この測定は重要性を増している。特に ALT 正常の非肝硬変患者の追跡で HBV DNA 量は肝発癌の独立した危険因子であり、HBV DNA 5 log copies/mL 以上では相対危険度が 10 倍以上となることが報告されており³⁾、治療ガイドラインでもウイルス量別の治療方針が示されている。すなわち、B 型肝炎の治療適応は、ALT 31 以上で、HBe 抗原陽性例は 5 log copies/mL 以上、HBe 抗原陰性例では 4 log copies/mL 以上、肝硬変例では 3 log copies/mL 以上

である。

f その他の検査

上述の検査のほか、現在は保険適用ではないが、HBV 遺伝子型と HBV ラミブジン耐性変異が測定可能である。すなわち、HBV の遺伝子型は少なくとも A～H の 8 種に分類され、わが国では遺伝子型 B が約 10%、C が 85% 存在することが知られている。遺伝子型 B の B 型肝炎は、HBe 抗原の seroconversion が遺伝子型 C よりも早くみられ予後がよい。また、核酸アナログであるラミブジンに対する耐性変異である HBV の YMDD 変異を直接検出することも可能である。

3 C 型肝炎

a HCV 抗体

HCV 抗体は HCV の非構造蛋白に対する抗体で、複数の蛋白を抗原とし、感染後約 2 か月で陽性化し、その後持続する。しかし、この抗体は感染防御抗体ではなく、現在の HCV の感染と過去の感染既往の両方で陽性になる。通常は前者では高力価、後者では低力価を示すことが多いが、両者の鑑別には HCV RNA 検査が必要である。

b HCV RNA 量

HCV RNA の測定には、現在 real-time PCR 法と HCV コア蛋白量の測定法が用いられている。ウイルス量の測定は、C 型肝炎の治療法決定と治療効果判定に重要である。特に real-time PCR 法で 5 log IU/mL ないしは、HCV コア蛋白 300 fmol/L 以上は高ウイルス量とされ、C 型慢性肝炎の初回治療としてインターフェロン治療を行う際にリバビリン併用が認められている。また、real-time PCR 法の検出感度は 1.2 log IU/mL とされ、現在の測定法では最も高感度である。

c HCV セログループ、遺伝子型

HCV は遺伝子変異に富むウイルスであるため、多くの遺伝子型が存在する。わが

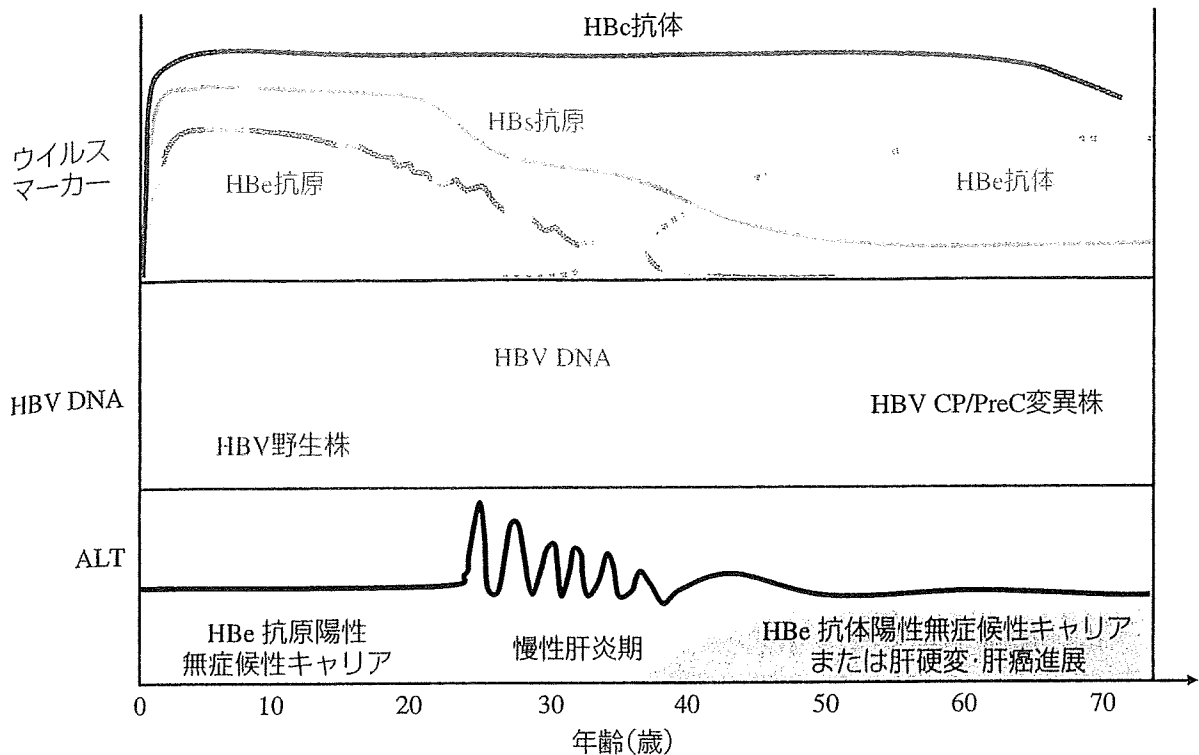


図1 B型肝炎ウイルスキャリアの自然経過

国では、1b, 2a, 2b型が存在し、1b型はセログループ1、2a/2b型はセログループ2に相当する。インターフェロン治療効果は遺伝子型により異なり、2a/2b型では治療効果が高く、1b型では低い。このため、治療方針決定や治療効果予測には極めて重要であるが、現在健康保険で測定できるのはHCVセログループ(群別判定)のみである。

d その他の検査 ……………

その他の検査として、HCV 1b NS5A (ISDR)とHCV 1b-IFN/リバビリン変異(コアアミノ酸変異)がある。このうち、ISDRは、HCVの非構造領域(NS)5Aに存在する40アミノ酸からなる領域で1b型のHCVのインターフェロン効果と密接に関連した遺伝子領域である⁴⁾。この領域に4個以上のアミノ酸変異があればIFN単独療法(24～48週)でも治療効果が高く、2個以上ではIFN+リバビリン併用療法48週間で治癒が望めることが明らかになっており、臨床的に有用であるが、現在のところ保険適用ではない。一方、HCVのコア

70番と91番目のアミノ酸変異がIFN+リバビリン併用療法の治療効果に関連することが示されており、ISDRが0ないし1個変異の難治例であっても、コア70番のアミノ酸が野生型(R:アルギニン)であると、治療効果が得られることが明らかになっている⁵⁾。

4 その他の肝炎ウイルスマーカー

このほか、D型肝炎の診断にはHDV抗体、E型肝炎の診断にはHEV抗体、HEV RNAを測定する。HDVはHBVをhelperウイルスとするため、単独では感染せずHBVの存在下でのみ感染する。HDVが重複感染するとB型肝炎が劇症化することが報告されており、B型劇症肝炎の原因検索に必要な場合がある。また、HEVは急性肝炎の原因として最近注目されており、国内での感染例や、人獣共通感染症として急性肝炎の原因の1つと考えられている。しかし、E型肝炎は不顕性感染が存在することやHEV抗体が持続することからE型

肝炎の診断には IgM-HEV 抗体や HEV RNA が用いられる。

文献

- 1) Kimura T, *et al.*: *J Clin Microbiol* 2003 ; **41** (5) : 1901-1906
- 2) 坪内博仁, ほか : 肝臓 2009 ; **50**(1) : 38-42
- 3) Chen, CJ, *et al.*: *JAMA* 2006 ; **295**(1) : 65-73
- 4) Enomoto N, *et al.*: *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81
- 5) 坂本穰, ほか : 日本消化器病学会雑誌 2009 ; **106** : 485-492,

山梨大学大学院肝疾患地域先端医療システム学 坂本 穰
山梨大学医学部内科学講座第 1 教室(消化器内科) 榎本信幸

トピックス

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス研究

今村道雄* 茶山一彰**

はじめに

近年、ウイルス性肝炎に対する治療は飛躍的に進歩し、その治療成績は向上しつつある。しかし、耐性株の出現やインターフェロン (IFN) 療法の限界など、大きな問題点が残されている。これらの問題を克服するためには、肝炎ウイルスが有効に感染する動物モデルを用いた基礎的研究が必要である。しかし有効な動物モデルはいまだ確立されておらず、その原因として肝炎ウイルスがヒトとチンパンジーにしか感染しないことがある。チンパンジーは優れた肝炎ウイルス感染モデルになりうるが、倫理的・経済的に大きな問題を抱えている。よって、チンパンジーに代わるマウスなどの小動物を用いたより実践的な感染モデルが必要である。肝炎ウイルスはヒト肝細胞に発現している受容体を介して感染すると考えられており、通常のマウスに肝炎ウイルスを投与しても感染は認められない。一方、ヒト肝細胞キメラマウスは肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたマウスであり、肝炎ウイルスの投与により、置換されたヒト肝細胞への感染が可能である。ここでは、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルスの生物学的研究および今後の展望について述べる。

ヒト肝細胞キメラマウスの作製

ヒト肝細胞キメラマウスは肝臓がヒトの肝細胞で置換されたマウスであり、マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。このマウスは、移植したヒト肝細胞が免疫反応によって拒絶されず

に肝臓中で増殖可能である必要があり、またマウス自身の肝細胞は徐々に死滅する必要がある。そこで、免疫不全の SCID マウスと肝不全を有する uPA トランスジェニックマウスを掛け合わせて uPA/SCID マウスが作製された。この uPA/SCID マウスの脾臓にヒト肝細胞を導入することで、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した (図1)。キメラマウスの肝臓のヒト肝細胞への置換率は、ヒト肝細胞に特異的な抗体であるヒトアルブミン抗体による免疫染色、およびマウス血中ヒトアルブミン濃度により算出した。その結果、90% 以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスが作製された¹⁾。

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染マウス

ヒト肝細胞キメラマウスにB型肝炎患者血清を静脈内投与すると、投与2週後よりマウス血中 HBV DNA は陽性となる。その後、血中 HBV DNA は次第に上昇し、高 titer のウイルス血症が長期間にわたり認められる (図2)²⁾。HBV 感染マウスの肝組織を免疫染色にて検討すると、ヒトアルブミン陽性のヒト肝細胞は HBc 抗原陽性であった。一方、マウス肝細胞は HBc 抗原陰性であり、置換されたヒト肝細胞に特異的に HBV が感染していることが確認された (図3)²⁾。HBV 感染マウスに核酸アナログを経口投与すると、血中 HBV DNA の著明な低下が認められ (図2)、HBV 感染マウスが抗ウイルス薬の評価に有用であることが確認された。

B型肝炎患者では核酸アナログ投与中、変異株の出現による薬剤耐性獲得が問題となっている。これらの問題を解決するためには、人工的に種々の変異を組み込んだウイルスに感染す

* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
分子病態制御内科学

** 同 教授

図1 uPA/SCID マウスおよびヒト肝細胞を用いたキメラマウスの作製法
(Hepatoday 10:3, 2005 より改変引用)

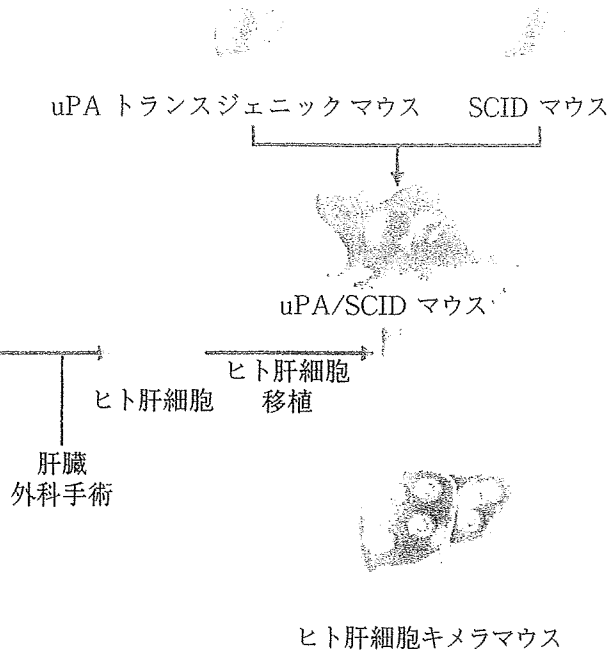
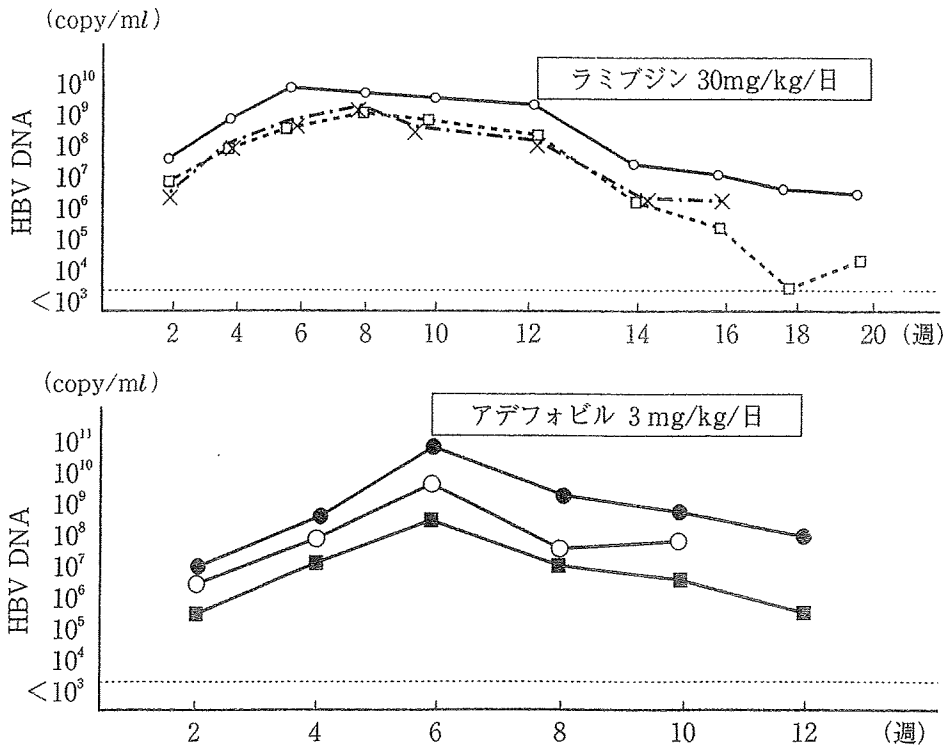


図2 血清を用いたマウスへのHBV 感染



るマウスが必要である。このため、1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだプラスミドを作製し、HepG2 細胞に恒常発現させ、上清中に HBV を

恒常的に産出する細胞を作製した。野生型の YMDD 株と同時に、ラミブジン耐性である YVDD 株を恒常的に産出する細胞も作製した。

図3 HBV 感染マウスの肝組織

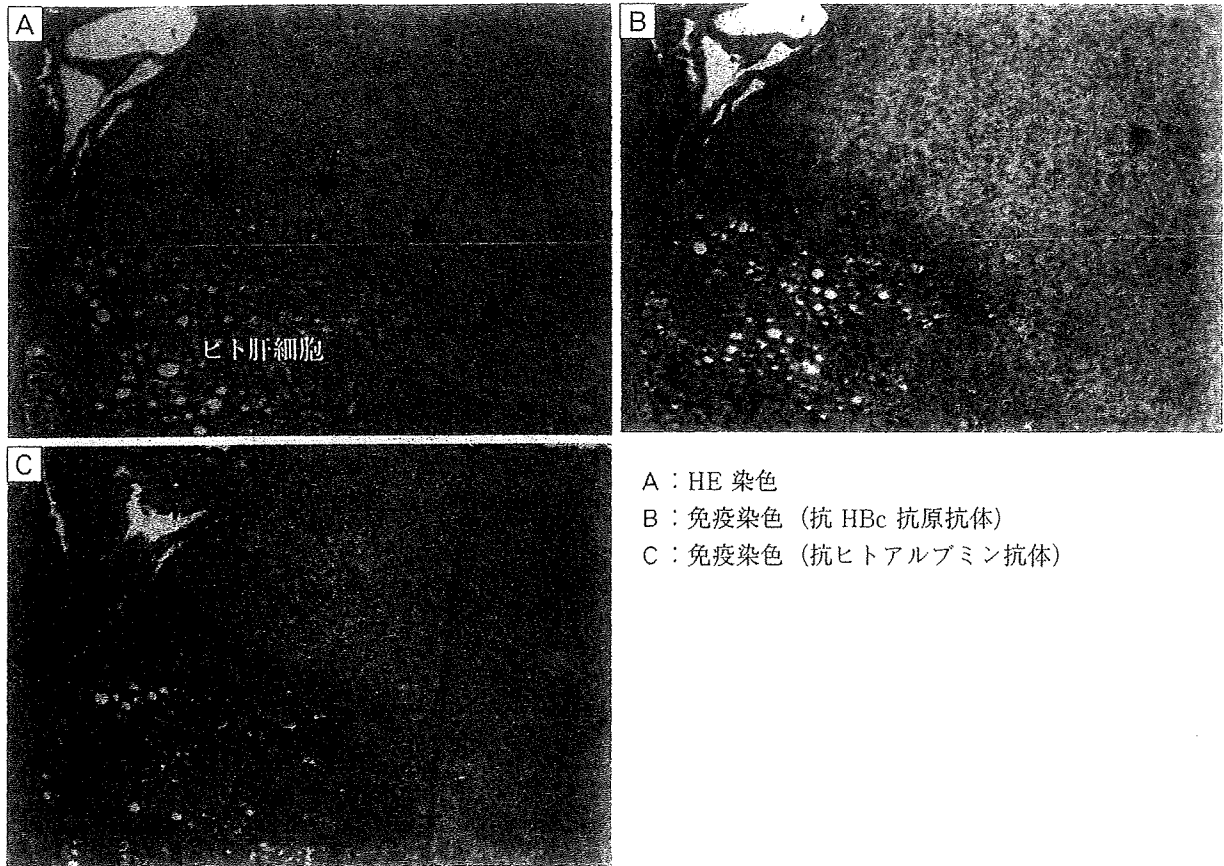
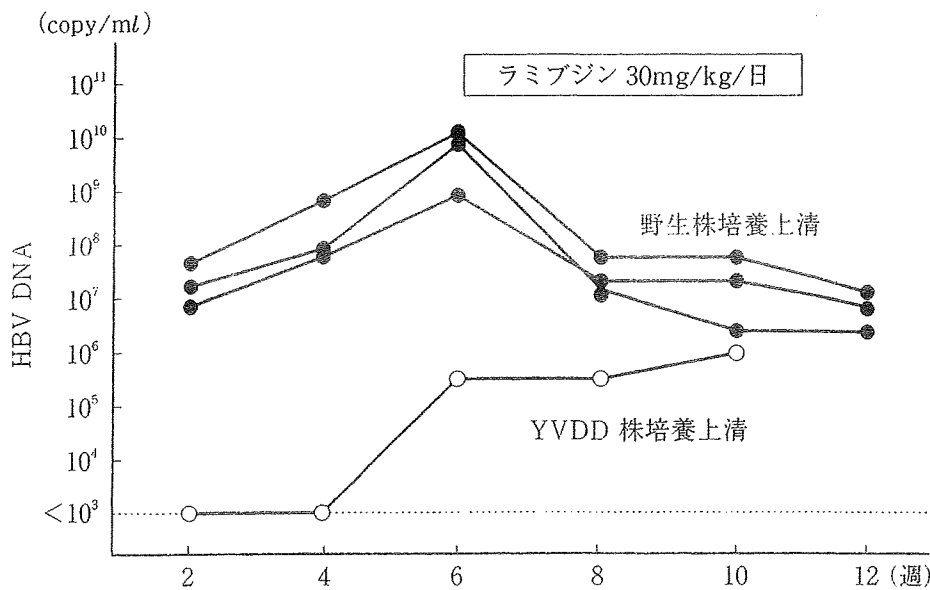


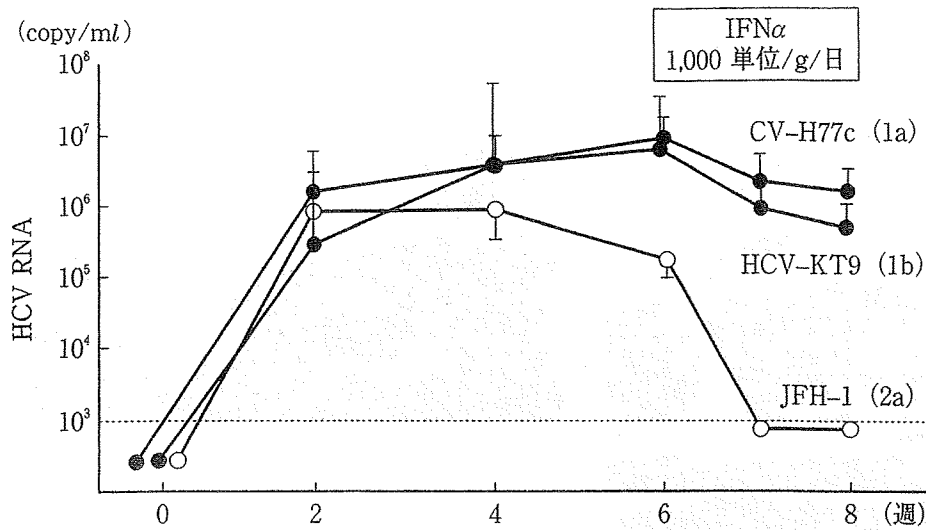
図4 培養上清を用いたマウスへのHBV感染



これらの培養上清をキメラマウスへ投与すると、野生株および YVDD 株ともに HBV 感染が確認され、人工的に作製した変異ウイルスに感染したマウスが作製される (図4)。これら

HBV 感染マウスにラミブジンを経口投与すると、野生株感染マウスでは血中 HBV DNA の低下が認められたが、YVDD 株感染マウスでは低下を認めなかった (図4)。このことは、

図5 クローンを用いたマウスへの HCV 感染



感染性クローンを用いた HBV 感染マウスが薬剤の効果判定に有用であることを示している。この手法を用いて新規のラミブジン耐性株の評価も可能であり³⁾, HBV 遺伝子型間でのウイルス感染・増殖, 肝線維化の違いも報告されている⁴⁾⁵⁾。

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染マウス

ヒト肝細胞キメラマウスに HCV 感染患者の血清を投与すると, マウス血中に高 titer の HCV RNA が長期間検出される⁶⁾。この HCV 感染マウスに IFN を投与すると, マウス血中 HCV RNA は低下する。これは HCV 感染マウスが抗ウイルス薬の評価に有用であることを示しており, 新規候補となる抗 HCV 薬の効果判定にも用いられている⁷⁻¹⁰⁾。

HCV は, 遺伝子型間で IFN の感受性が異なることが知られている。すなわち, 遺伝子型 1 型は 2 型に比べて IFN 抵抗性である。また, 同じ遺伝子型であっても患者によって IFN の治療効果が異なっている。これらの原因として HCV のアミノ酸配列が重要と考えられており, 実際に HCV の Core¹¹⁾, E2¹²⁾, NS5A¹³⁾ 領域のアミノ酸変異と IFN 感受性の違いが報告されている。しかし, これらの変異がなぜ IFN 抵抗性と関与しているのかはいまだ明らかではな

い。種々のアミノ酸変異を持つ HCV 感染マウスの作製が可能となれば, これらの解明の足掛かりになると思われる。そこで我々は, 遺伝子型 1a 型クローンである CV-H77C¹⁴⁾, 遺伝子型 1b 型クローンである HCV-KT9¹⁵⁾, および遺伝子型 2a 型クローンである JFH-1¹⁶⁾ を用いてマウスへの感染を行った。これらの cDNA を発現するプラスミドより *in vitro* トランスクリプション法にて HCV RNA を合成した。マウスへの遺伝子型 1a および 1b 型 HCV の感染は, 合成した RNA をマウス肝臓内に直接注入して行った。一方, 遺伝子型 2a 型の JFH-1 は細胞内で感染性ウイルス粒子を作製することが報告されており¹⁶⁾, 合成 RNA を Huh7 細胞にトランスフェクション後, ウイルス粒子を含む培養上清をマウスに静脈内投与した。いずれの手法においても, 投与 2 週後に血中 HCV RNA は定量可能となり, 合成 RNA を用いた遺伝子型 1a, 1b および 2a 型の HCV 感染マウスが作製された (図 5)⁶⁾¹¹⁾。これらウイルス感染マウスの血清をナイーブなマウスに投与すると HCV 感染が確認され, マウス血中に感染性 HCV が含まれていることが確認された。さらに, これらの感染マウスに IFN を連日投与すると, 遺伝子型 1a, 1b 型の感染マウスでは投与 2 週後に血中 HCV RNA はそれぞれ 0.7

log, 1.2 log 低下した。一方, 遺伝子型 2a 型の感染マウスでは, 投与 1 週後にすべて感度以下に低下した (図 5)。これらの結果より, 遺伝子型 1 型は 2 型に比べて IFN 抵抗性であることが確認された。

おわりに

ヒト肝細胞キメラマウスは, 扱いが簡便であること, ウイルスの感染・複製がヒト肝細胞内で生じることなどの点より, 優れた肝炎ウイルス感染モデルになりうると思われる。今後, 肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて, 肝炎ウイルスの感染・増殖のメカニズムの解明, ウイルス性肝炎患者の病態解明, さらに新規抗ウイルス薬や感染予防薬の開発などに応用していきたいと考える。

文 献

- 1) Tateno C, et al: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 (3): 901-912, 2004.
- 2) Tsuge M, et al: Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42 (5): 1046-1054, 2005.
- 3) Yatsuji H, et al: Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (11): 3867-3874, 2006.
- 4) Sugiyama M, et al: Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 44 (4): 915-924, 2006.
- 5) Sugiyama M, et al: Early dynamics of hepatitis B virus in chimeric mice carting human hepatocytes monoinfected or coinfecting with genotype G. *Hepatology* 45 (4): 929-937, 2007.
- 6) Hiraga M, et al: Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* 581 (10): 1983-1987, 2007.
- 7) Umehara T, et al: Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 346 (1): 67-73, 2006.
- 8) Kneteman NM, et al: Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* 43 (6): 1346-1353, 2006.
- 9) Vanwolleghem T, et al: Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse. *Gastroenterology* 133 (4): 1144-1155, 2007.
- 10) Inoue K, et al: Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice *in vivo*. *Hepatology* 45 (4): 921-928, 2007.
- 11) Akuta N, et al: Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 46 (3): 403-410, 2007.
- 12) Chayama K, et al: Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 32 (5): 1138-1144, 2000.
- 13) Enomoto N, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334 (2): 77-81, 1996.
- 14) Yanagi M, et al: Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious *in vivo*. *Virology* 244 (1): 161-172, 1998.
- 15) Kimura T, et al: Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 89 (9): 2108-2113, 2008.
- 16) Wakita T, et al: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 (7): 791-796, 2005.

Hepatitis Virus-infected Animal Model by Using Human Hepatocyte Chimeric Mice

Michio Imamura, Kazuaki Chayama
Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of
Biomedical Sciences, Hiroshima University

動物モデルを用いたウイルス性肝炎研究 最前線

キメラマウス

今村道雄・柘植雅貴・茶山一彰

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学/いまむら・みちお つげ・まさたか ちゃやま・かずあき

ヒト肝細胞キメラマウス●

肝炎ウイルスは、ヒトとチンパンジーにしか感染しない。そのため、生体を用いた肝炎ウイルス研究は困難であり、マウスなどの小動物を用いたより実践的な感染モデルが必要である。ヒト肝細胞キメラマウスは、肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたマウスであり、B型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎ウイルス(HCV)の投与により置換されたヒト肝細胞への感染が可能である。

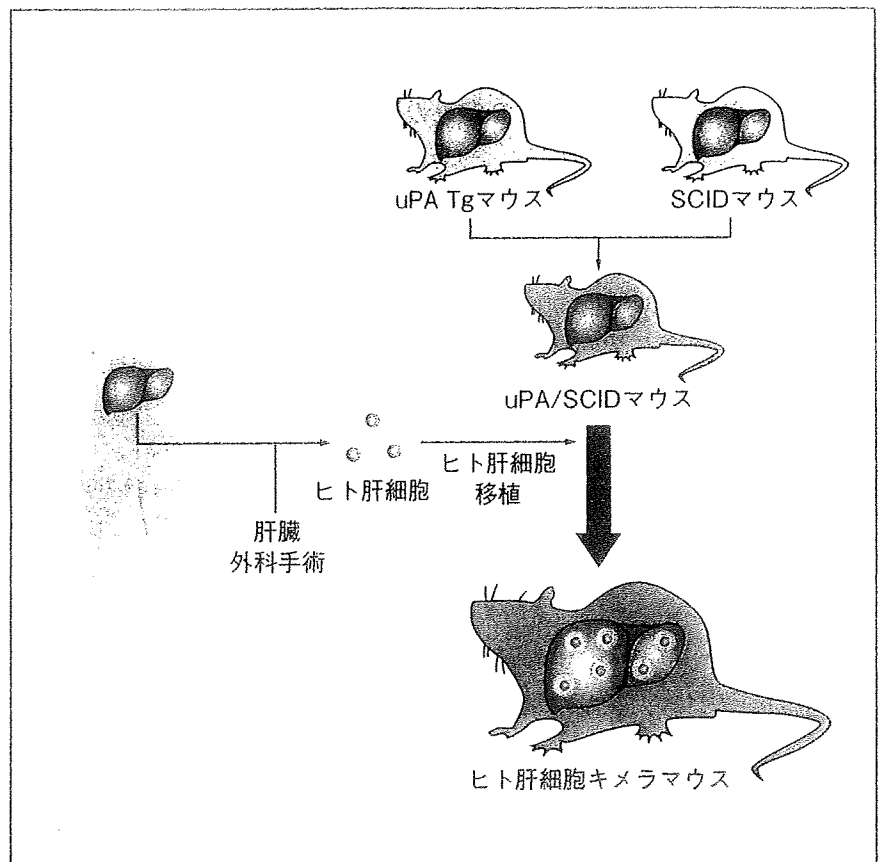
ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。免疫不全のSCIDマウスと、肝不全を有するurokinase-type plasminogen activator (uPA)トランスジェニックマウスを掛け合わせてuPA/SCIDマウスが作製される。こ

のuPA/SCIDマウスの脾臓にヒト肝細胞を注入することでマウス肝臓の90%以上がヒトの肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作製される(図1)¹⁾。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス研究●

ヒト肝細胞キメラマウスにHBVあるいはHCV感染患者の血清を経静脈的に投与すると、 $10^6 \sim 10^8$ copy/mlのウイルス血症が12週間以上継続する。HBVあるいはHCVを感染させたマウスに核酸アナログやインターフェロンなどの抗ウイルス薬を投与すると血中ウイルス量は低下することより、本マウスが抗ウイルス薬の効果判定

図1 uPA/SCIDマウスおよびヒト肝細胞を用いたキメラマウスの作製法 (茶山一彰: Hepatoday 10:3, 2005, 図1より引用)



ヒト肝細胞キメラマウスに肝炎ウイルス患者血清や合成ウイルス核酸を投与することにより、肝炎ウイルスの感染が可能となる。肝炎ウイルス感染マウスは肝炎ウイルスの生物学的検討および抗ウイルス薬の効果判定に有用である。

に有用であると思われる^{2,3)}。本マウスに種々の抗ウイルス薬を組み合わせ投与し、より有効な治療法の開発が可能になり、また新規候補となる抗ウイルス薬や感染予防薬の効果判定にも有用である⁴⁾。

近年、HCVのcore領域やNS5A領域のアミノ酸変異とインターフェロン療法の治療効果の関係が明らかとなってきた。これらのアミノ酸変異がどのような原因でインターフェロンの効果と関係しているのか、あるいは難治性のHCVに対してどのような治療を行っていくべきかの検討は重要な課題である。そこで種々のHCVクローンから合成した全長RNAをマウス肝臓内に直接投与することにより、モノクローナルなHCV感染マウスを作製した^{3,5)}。さらに、最も課題となっているgenotype 1b型のHCVクローンにあらかじめ変異を導入することにより、種々の変異型HCV感染マウスの作製も可能である。これらマウスはHCVの変異と抗ウイルス薬の効果の関係の解明

や、難治性HCVに対する新規治療法の開発に有用であると思われる。

文 献

- 1) Tateno, C. et al. : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 : 901-912, 2004
- 2) Tsuge, M. et al. : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42 : 1046-1054, 2005
- 3) Hiraga, M. et al. : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts* 581 : 1983-1987, 2007
- 4) Matsumura, T. et al. : Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 137 : 673-681, 2009
- 5) Kimura, T. et al. : Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 89 : 2108-2113, 2008

Chapter Forty-Four

44

Natural killer cells and hepatitis C virus infection

Michael A. Nalesnik, Tatsuya Kanto

CHAPTER CONTENTS

Introduction	572
Hepatitis C virus	572
Classification and viral genome	572
HCV proteins and structure	572
Life cycle of HCV	573
Host response to HCV infection	574
Innate immune response to HCV	574
Hepatocyte infection, IFN production and HCV countermeasures	574
NK cells and HCV infection	575
Introductory comments	575
NK cell receptors and HCV infection	575
Interactions and crosstalk between NK cells and DC in the presence of HCV	579
Additional cytokine and chemokine studies relevant to the role of NK cells in HCV infection	580
Current therapy of HCV infection	582
Acknowledgement	582

What is of supreme importance in war is to attack the enemy's strategy.

Sun Tzu

If you want to understand the immune system, look to the viruses—they have been studying it for eons

Michael T. Lotze

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infects more than 170 million people, 80% of whom develop chronic disease. Viral

interference with host innate immune response, in particular natural killer (NK) cells, may set the stage for subsequent ineffective adaptive immune response and viral persistence.

Viral NS3/4a protease interferes with hepatocyte type I interferon (IFN) production via several mechanisms. NS5A protein may also interfere with this pathway via IL-8 upregulation. These and related changes, along with suboptimal dendritic cell (DC) response, possibly contributed to by IL-15 deficit, may impair NK cell activation. Viral E2 protein can directly engage NK cells via cellular CD81 and inhibit NK cell response to activation signals. HCV core protein upregulates hepatocyte HLA class I expression, serving as a likely deterrent of NK cell cytotoxicity. Core protein can also upregulate HLA-E on hepatocytes, and interaction of this molecule with inhibitory NKG2A receptors may downregulate NK cell activity.

In chronic HCV infection, both NK cells and DCs may produce increased IL-10, skewing the adaptive immune response towards Th2 type. In this condition, Cytotoxic CD56^{dim} NK cells may be decreased, and cytokine-producing CD56^{bright} NK cells may be increased. Population studies of polymorphisms affecting cytokine production or NK cell inhibitory receptor binding have shown associations with viral clearance, suggesting that these represent important factors of the host immune response.

Many current efforts towards control of HCV infection focus on antiviral agents or T-cell response. However, the virus itself seems to have expended a great deal of evolutionary effort in attempting to evade multiple aspects of the host innate immune response. A greater understanding of the role of NK cells may lead to interventions that facilitate early viral clearance and subsequently decrease the frequency of chronic infection.

KEY WORDS

Hepatitis C virus (HCV), Natural killer (NK) cells, Innate immune response

Introduction

It is currently estimated that about 170 million people, representing 3% of the world's population, are infected with hepatitis C virus (HCV) (1999). These individuals are at significant risk for the development of cirrhosis, the emergence of hepatocellular carcinoma and the possibilities of other complications such as cryoglobulinemia or renal disease. The incidence of infection is expected to rise in the immediate future, underscoring the fact that this virus represents a significant world public health problem.

HCV was identified in 1989 as a specific agent responsible for what had been known up to that time as non-A, non-B hepatitis (NANBH) (Choo et al., 1989). Its discovery entailed construction of a cDNA library from plasma derived from a chimpanzee with a high infectious titre of the then unknown virus. This library was used to express polypeptides that were in turn screened with serum from a NANBH patient. An assay derived from this approach showed that approximately 80% of patients with chronic transfusion-associated NANBH had antibody to HCV (Kuo et al., 1989).

As is the case with most viruses, a dynamic interplay exists between pathogen and host, with a variety of moves and countermoves by both partners. The success of the virus in this regard is reflected in the fact that approximately 80% of patients will fail to control the primary infection and go onto chronic disease (Bode et al., 2007). This chapter will briefly review the makeup and life cycle of HCV, outline some aspects of the host: virus interaction and discuss the role of natural killer (NK) cells in this venue.

Hepatitis C virus

Classification and viral genome

HCV is an enveloped RNA virus classified as a distinct genus *Hepacivirus* in the family *Flaviviridae*. It is divided into 6 genotypes and more than 50 subtypes based on genomic variability (Bukh et al., 1995). The virus has a single-stranded positive-sense genome of around 9600 nucleotides with a single open reading frame flanked on either end by conserved untranslated regions (UTRs).

The 5' UTR is highly conserved and contains an internal ribosome entry site (IRES) that allows the virus to usurp the cell translation machinery (Otto and Puglisi, 2004). The efficiency of translation control varies among different genotypes and quasispecies (Honda et al., 1999; Laporte et al., 2000; Soler et al., 2002). The 3' UTR is considered essential for viral replication (You and Rice, 2008) and has an additional role in enhancing the translation of viral RNA mediated by the 5' UTR IRES (Song

et al., 2006). It interacts with the cellular La and polypyrimidine tract-binding proteins (Domitrovich et al., 2005) and, in one study, was found to bind more than 70 host proteins (Harris et al., 2006).

The bulk of the genome is comprised of a single open reading frame that encodes a 3010 amino acid polypeptide that is cleaved in a cotranslational and posttranslational fashion to give rise to 10 viral proteins (core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Dubuisson, 2007). In addition, a frameshift involving the core region gives rise to an alternate reading frame protein known as F protein (Branch et al., 2005).

HCV proteins and structure

The mature HCV core protein ranges from 19 kDa to 21 kDa molecular weight and is thought to comprise the viral nucleocapsid. This RNA-binding protein is mainly found attached to the endoplasmic reticulum, in association with lipid droplets (Dubuisson, 2007). The protein is thought to have a role in hepatocyte steatosis and to render the host cell more susceptible to injury and carcinogenesis. Core protein contains epitopes recognized by both T cells and B cells (Barban et al., 2000; Beld et al., 1999; Jackson et al., 1999; Nattermann et al., 2005; Pirisi et al., 1995). A direct modulating effect on the T-cell response is likely. Yao et al. (2007) concluded that this protein led to an inhibition of T-cell function. Separately, Chung et al. (2001) suggest that it may cause an accelerated inflammatory response. HCV core protein acts as a ligand for toll-like receptor 2 (TLR-2) (Dolganic et al., 2004; Duesberg et al., 2002), and this may contribute to monocyte/macrophage activation in chronic infection (Dolganic et al., 2007). Ciccaglione et al. (2007) found that this protein was capable of inhibiting interferon (IFN) regulatory factor 1 (IRF-1) expression, leading to repression of subsequent target genes such as IL-12 and IL-15. It has been suggested that some of the effects attributed to the core protein may be due in part or in whole to an overlapping alternate reading frame protein expressed during natural HCV infection (Branch et al., 2005).

The glycoproteins E1 (gp31) and E2 (gp70) have been demonstrated on the surface of HCV virions (Kaito et al., 2006), confirming their role as major envelope glycoproteins. E1 and E2 form heterodimers and are found largely in the endoplasmic reticulum. E2 contains a hypervariable region HVR1 that can form quasispecies during the course of infection, possibly due to immune pressure leading to the development of escape mutants. E2 is thought to represent the main ligand of the mature virion for cell surface binding and has been found *in vitro* to link CD81 (tetraspanin) and SR-B1 (scavenger receptor class B type I), two putative cell

receptors for HCV (Heo et al., 2006). The interaction with CD81 is also thought to affect dendritic cell (DC) function during HCV infection (Nattermann et al., 2006; Zhao et al., 2007).

The p7 polypeptide is found either as a C-terminal portion of the E2 glycoprotein or as a separate protein (Major et al., 2001). In vitro studies show that it is membrane-localized and forms ion channels (StGelais et al., 2007) that can be inhibited by amantadine. This protein is necessary for infectivity in a chimpanzee model and has been found to be important for the efficient assembly and release of virions (Steinmann et al., 2007). The ability to enhance virus production varies among different isolates, suggesting that it may function as a virulence factor (Steinmann et al., 2007).

The NS2 protein is a membrane protein localized within the endoplasmic reticulum. A role in virus assembly and release has been proposed (Dubuisson, 2007), and a recent study found the protease domain of NS2 to be necessary for viral infectivity (Jones et al., 2007). NS2 has been shown to inhibit apoptosis mediated by the hepatocyte CIDE-B protein in vitro (Erdtmann et al., 2003).

The NS3 region is responsible for encoding a serine protease activity that cleaves the HCV polyprotein at multiple sites, in conjunction with a protein from the NS4 region. NS3 also encodes for RNA helicase and NTPase activity. Thoren et al. (2004) demonstrated that this protein was capable of inducing oxygen radical formation in mononuclear and polymorphonuclear phagocytes, which were then able to induce dysfunction or apoptosis in T cells, NK cells, and NK T cells. The NS3/4 protease also plays a role in the response of the virus to host type I IFN production (Hiscott et al., 2006).

The NS4 region encodes viral proteins NS4A and NS4B. NS4A is a cofactor that enhances the activity of the protease encoded by NS3. It also joins with viral proteins NS4B and NS5A to form a stable heterotrimer.

NS4B contains a nucleotide binding motif with GTPase activity that appears to be important for efficient RNA replication (Einav et al., 2004). It also induces a 'membranous web' comprised of vesicles in a membrane matrix that is thought to represent the viral replication complex (Egger et al., 2002). It may also contribute, along with NS3/4 A, to interference with hepatocyte type I IFN production (Tasaka et al., 2007).

The NS5 region encodes viral proteins NS5A and NS5B. NS5A is thought to play a role in replication of RNA and exists as hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms. The hypophosphorylated form appears to support efficient viral replication in vitro, whereas the hyperphosphorylated form is inhibitory (Neddermann et al., 2004). Of interest, the mTOR inhibitor Rapamycin reduces the phosphorylation status of NS5A (Coito et al., 2004). NS5A has a separate domain referred to as the IFN sensitivity-determining

region that inhibits the action of IFN-induced protein kinase PKR, an effector of IFN-induced antiviral activity (Gale et al., 1997).

NS5B protein contains the RNA-dependent RNA polymerase activity that is essential for viral replication (Luo et al., 2000), and it is likely that the interaction of this protein with the 3' terminus of the viral genome leads to the synthesis of negative strand RNA. It may also serve to modulate the phosphorylation status of NS5A (McCormick et al., 2006). Choi et al. (2006) demonstrated that this protein may modulate TNF α signalling pathways.

The HCV virion has a spherical appearance and is approximately 50nm in diameter. It is enveloped, and, in the peripheral blood, is found in probable association with LDL, and in another form either free or complexed with immunoglobulin, as determined by sucrose gradient centrifugation (Hijikata et al., 1993; Kanto et al., 1995). It is thought that association with LDL may protect against antibody neutralization.

Life cycle of HCV

Until recently, there was not an effective cell culture system for HCV (Lindenbach et al., 2005; Yi et al., 2006). Thus, most studies were performed using either standard mammalian cell expression in vitro or in vivo with chimpanzees, as the chimpanzee is the only animal model that mimics most but not all aspects of the human infection. The development of permissive cell culture models has allowed progress in the study of the viral life cycle and has facilitated the testing of drugs and neutralizing antibodies against HCV.

HCV generally is spread through parenteral routes and reaches the liver via the bloodstream. Virions may circulate as free particles or as particles bound to immunoglobulins, low density or very low density lipoproteins (Nielsen et al., 2006). The viral surface protein E2 can bind cellular CD81 (tetraspanin) as well as scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Zeisel et al., 2007), both of which are found on hepatocytes and appear to function in viral entry. The LDL receptor (Nahmias et al., 2006) and the lectins L-SIGN and DC-SIGN (Lozach et al., 2004) may also facilitate entry of the virus into the hepatocyte. Further entry is dependant upon the presence of claudin-1, 6 or 9 (Meertens et al., 2008), and the virion is endocytosed into clathrin-coated pits. Viral surface membrane and endosomal fusion occur in the context of acidification, and the nucleocapsid is released into the cytoplasm where uncoating occurs. The positive strand RNA initiates translation by means of an internal ribosomal entry site (IRES) that is located in the 5' noncoding region and binds the 40S ribosome. This leads to the formation of a single polyprotein that is processed into individual