

適した抗体測定系を確立すべく検討し、IgM-HEV 抗体を測定する系よりも IgA-HEV 抗体測定系の方が特異性と感度の点で優れていることを示した(研究発表 1, 2)。また、ブタでは IgM クラスの抗 HEV 抗体反応は弱く、感染成立後の抗体価の変動は軽微であるが、IgA-HEV 抗体はウイルス血症との高い相関を示すことを明らかにした(研究発表 3)。ALT の上昇を伴わない不顕性 HEV 感染例(スクリーニング検査時に IgG-HEV 抗体が陽性で、観察開始時に陰性であった健常人 2 例)について、保存検体(月 1 回採血)を用いた retrospective study を行い、HEV 抗体反応のプロフィールを検討した。2003 年 5 月 23 日の血清中で HEV RNA が検出された 1 例では、同年 6 月 18 日以降、IgG-HEV 抗体が持続陽性となったが、IgM-HEV 抗体と IgA-HEV 抗体はともに経過中陰性のままであった。一方、あとの 1 例では、HEV RNA は検出されなかったが、1978 年 10 月 23 日以降 IgG-HEV 抗体が持続陽性となり、1978 年 10 月 23 日の 1 ポイントで IgA-HEV 抗体が陽性となった(OD 値: 1.181)。それに対して、IgM-HEV 抗体は終始陰性のままであった。顕性感染例に比べると不顕性感染例では IgG-HEV 抗体の力価も著しく低く、IgM-HEV 抗体は経過中すべて cut-off 値以下であったが、IgA-HEV 抗体については cut-off 値以上の有意な上昇を示す例があることが分かった。したがって、不顕性 HEV 感染例でも IgA クラス HEV 抗体測定系はより有用である可能性が示唆された(研究発表 4)。

## 2. 飼育ブタと野生イノシシでの HEV 感染

初年度は、国内 25 農場で飼育されていた 2,500 頭のブタでの HEV 感染状況を調査し、報告したが、それらは 7 道県に由来するに過ぎなかった。そこで、今年度は調査地域を拡大し、北海道と沖縄を含む 20 道県の 92 農場に由来する 1425 頭の飼育ブタについて HEV の感染状況を血清レベルと遺伝子レベルで調査した。初年度と今年度とで調査対象とした農場に重複はない。調査したどの道県でもブタでの HEV 感染が蔓延状態にあることは前回の調査と同様であり、1,425 頭中 794 頭(56%)で IgG-HEV 抗体が検出され、生後 4-6 ヶ月のブタでは 76% (531/699)の陽性率であった。HEV RNA は月齢 2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月および 5 ヶ月

のブタから検出され、それぞれ 6%, 10%, 6%, 0.5% の陽性率であった。分離された HEV(全 55 株)は genotype 3、ないし genotype 4 に分類され、諸外国の HEV 株よりもこれまでに国内の E 型肝炎患者やブタから分離された HEV 株に遺伝子配列のより高い類似性を示したが、株間の多様性は顕著であった(研究発表 3)。

昨年度に引き続き、本州、四国、九州の 12 県で捕獲された 87 頭の野生イノシシの血清と肝臓を用い、HEV の感染状況を調査した。87 頭中 2 頭(2.3%)で HEV RNA が検出され、genotype はともに 3 型であった。これら徳島県と山口県で捕獲された 2 頭および昨年度佐賀県で捕獲された HEV RNA 陽性の 1 頭、合計 3 頭の野生イノシシから HEV を分離し、全塩基配列を決定し、比較解析した。これらは相互に 8.5-11.2%異なるだけでなく、既報の 3 型 HEV 株とも 8.6-18.4%異なり、多様性に富む HEV 株が野生イノシシに感染していることが示唆された。

## 3. 国内感染 E 型肝炎の特徴

初年度から蓄積された国内感染 E 型肝炎症例について、臨床的、分子ウイルス学的特徴を検討した。国内で E 型肝炎症例が最も多い北海道では、ブタのレバーやホルモン摂食後の E 型肝炎発症事例が約 90%を占め、ブタ内臓肉の喫食が重要な感染危険因子であることが示唆された(研究発表 2)。また、E 型肝炎の重症化、劇症化の因子として、高齢や基礎疾患の有無などの宿主因子が重要であると同時に、genotype 3 よりも genotype 4 の方が重症度と密接な関連があることが示唆された(研究発表 2)。HEV の血清マーカーやウイルスマーカーを測定しなければ、薬剤性肝炎や自己免疫性肝炎として診断し、E 型肝炎を見逃してしまう症例もあることを示した(研究発表 5)。

## D. 考察

E 型肝炎の血清診断には IgA-HEV 抗体測定系が IgM-HEV 抗体測定系よりも適していることが前年度の研究から明らかになったが、ヒトのみならず、ブタでも現在の HEV 感染の血清学的診断に、IgA-HEV 抗体測定系の方が IgM-HEV 抗体測定系よりも優れていることが分かった。その理由は不明であるが、HEV が腸管感染するウイルス

であり、かつ肝臓のみならず腸管でも増殖することが、外回りの免疫応答としての IgA クラスの抗体産生を高めている可能性が推測される。

飼育ブタや野生イノシシが HEV の感染宿主であり、ヒトへの感染源となりうることは確かである。しかし、国内でも感染源・感染経路には地域差があり、北海道の北見市や札幌市のように、E 型肝炎患者の約 90%が発症の 1-2 ヶ月前にブタ内臓肉の摂食既往を有する地域もある一方で、東北地方や関東地方のように感染源・感染経路を特定できていない症例が少なくない地域もあり、さらなる究明に向けた努力が必要である。

HEV 感染の多くは不顕性であると推測されるが、なかには E 型肝炎発症後に重症化し、劇症肝炎により不幸な転帰をとる症例もある。重症化の因子として、高齢であることやそれに付随して生活習慣病や肝疾患などの基礎疾患を有することなどの宿主側の因子が重要であることは容易に推測できるが、**genotype** というウイルス因子も重症化と密接な関連があることが示唆された。これは、昨年度の班長報告のなかでも指摘された知見であるが、北海道の患者 32 例を対象にした調査でも、統計学的な有意差をもって、4 型は 3 型に比べて重症化との関連性が高いことが示された。そのウイルス学的機序の解明は今後の重要な課題である。

#### E. 結論

1. IgA クラス抗 HEV 抗体測定系は、IgM クラス抗 HEV 抗体測定系に比べ、ヒトのみならず、ブタでも現在の HEV 感染の血清診断に有用であることが示された。
2. ブタや野生イノシシなど複数種の動物が HEV の感染宿主であり、多様性に富む 3 型ないし 4 型の HEV 株が感染していることが示された。
3. E 型肝炎の重症化のウイルス因子として、**genotype** が重要であり、3 型に比べて 4 型がより重症度と密接な関係にあることが示唆された。そのウイルス学的機序の解明は重要である。

#### F. 研究発表

1. Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y,

Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H: Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49-56, 2005

2. Mizuo H, Yazaki Y, Sugarawa K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76:341-349, 2005
3. Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, Tsatsralt-Od B, Inoue J, Okamoto H: Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 86:1807-1813, 2005
4. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Tsatsralt-Od B, Nishizawa T, Okamoto H: Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples from healthy individuals. *J Med Virol* 76:526-533, 2005
5. Nagasaki F, Ueno Y, Kanno N, Okamoto H, Shimosegawa T: A case of acute hepatitis with positive autoantibodies who actually had hepatitis E virus infection. *Hepato Res* 32:134-137, 2005
6. Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H, Sato Y, Bando M, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86:3321-3326, 2005

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策事業）  
「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班  
平成 17 年度分担研究報告書

## 家畜に於ける HEV 及び HEV-like virus 感染の実態把握

分担研究者：山口成夫（動物衛生研究所 感染症研究部 部長）

研究要旨：E 型肝炎ウイルス（HEV）は養豚に広く浸潤し人獣共通感染症と考えられる。養豚以外にも多数の動物種が HEV に反応する抗体を持ち、HEV あるいは類似ウイルス（HEV-like virus）に感染していると推測されている。日本ではイノシシ、シカなど野生動物の肉の摂食による急性 E 型肝炎発症例が報告され、野生動物での HEV 感染実態の把握が望まれる。我々は 4 県で捕獲されたイノシシの血清について IgG クラスの抗 HEV 抗体保有調査を行った。各県の抗体陽性率は 6.5%、6.9%、13.3%、14.7% で、全体では 9.2% (118/1287) であった。調査範囲では、地域差、性差、年齢差はほとんど見られなかった。

### 研究協力者

池田秀利（動物衛生研究所）  
恒光 裕（動物衛生研究所）  
加藤花名子（動物衛生研究所）  
宮崎綾子（動物衛生研究所）  
吉井雅晃（動物衛生研究所）

### A. 研究目的

急性 E 型肝炎症例の幾つかはイノシシ、ブタ、シカなど肉の摂食によって E 型肝炎ウイルス（HEV）に感染したことが疑われている。養豚場で飼育されているブタには HEV が広く浸潤している。さらに HEV に対する抗体が、イノシシ、シカ、ドブネズミ、サルなどの野生動物から、また、イヌ、ネコ、鶏などの家畜など広範囲の動物種から検出される。これはそれらの動物が HEV 又は HEV-like virus に感染していることを示唆している。イノシシは日本では北海道、本州北部以外の地域に広く生息し、近年生息数が増加し人間との接触の機会も増えている。農作物を食い荒らすため有害鳥獣として駆除対象野生動物とされ、年間 15 万頭が駆除又は狩猟されている。そのためイノシシ肉は食品として積極的な利用を推奨されている。イノシシは養豚と遺伝的に近く、病原体に対する感受性はブタと大差ない。HEV

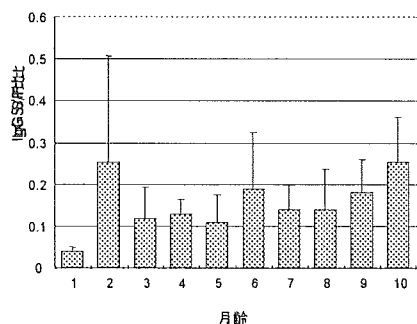
も養豚と同様にイノシシ集団で感染環を形成していると考えられるが、イノシシを経由して他の野生動物や家畜、ヒトへの伝播の可能性も考えられる。日本のイノシシが HEV に感染していることは既に報告されているが、本研究ではさらに各地のイノシシについて抗 HEV 抗体保有状況調査を行った。

### B. 方法と成績

各地の家畜保健衛生機関から分与されたイノシシ血清を解析した。IgG クラス抗 E 型肝炎ウイルス抗体は国立感染研・武田、李氏より分与された組換え E 型肝炎ウイルス ORF2 蛋白を抗原とした ELISA 法で測定した。

- 1) 日本の養豚場のブタは抗体保有率が高く、これまで我々が用いた ELISA 法の条件で抗体陰性と陽性を判定するカットオフ値の設定が困難であった。今年度、HEV の汚染がないと考えられる農場から 1-10 ヶ月令 91 頭の血清を入手して反応性を調べた。各個体の S/P 比は、-0.15~0.51 の範囲にあり、平均値 0.005、標準偏差 0.091 であった。月齢ごとの抗体価の比較では、1 ヶ月令のブタが他の月齢より若干低い値を示すが、それ以降ほぼ一定の値を維持していた（図 1）。この集団の S/P 比の分布を基に今回の測定系では平均値+6x 標準偏差値（0.55）をカットオフ値とした。

図1 HEV非汚染と推測される養豚場のブタにおける抗体価

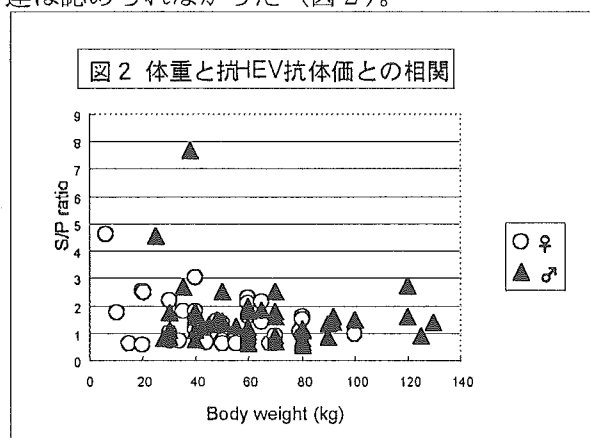


2) 調査した合計 1287 頭イノシシのうち、設定したカットオフ値以上の値を示す抗体陽性個体は9.2% (118/1287)であった。これらのイノシシは4県で採取されたもので、県ごとの抗体陽性率は6.5%, 6.9%, 13.3%, 14.7%であり、これらの地域では抗体陽性率に大きな差はないと考えられた(表1)。

表1 抗HEV抗体保有率

	検査頭数	陽性頭数	陽性率
A県	557	36	6.5%
B県	449	60	13.3%
C県	247	17	6.9%
D県	34	5	14.7%
全体	1287	118	9.2%

3) ヒトでは抗E型肝炎ウイルス抗体陽性率や急性E型肝炎の重篤度は加齢と共に増加し、男性が多い傾向が知られている。日本の野生ドブネズミ、野生ニホンザルにも抗E型肝炎ウイルス抗体が検出され、抗体保有率と加齢との相関が認められている。調査した野生イノシシ個体の実年齢は不明であるが、仮に年齢が体重に反映されるとすると、調査した個体の多くは体重分布が20kg~100kgで、大まかに1才以上の年齢と推定される。その中で抗体陽性個体はオス51頭、メス43頭であり、S/P比の平均±SDはオス1.49±1.11、メス1.33±0.80と、雌雄で抗体陽性率や抗体価に大きな差は認められなかった(図2)。さらに雌雄各群の抗体陽性個体における体重と抗体価との間にも明確な関連は認められなかった(図2)。



### C. 考案と結語

4地域でのイノシシの抗体陽性個体は平均9.2% (118/1287)であった。これは既に報告されている日本のイノシシの抗体保有率9%(3/35) [Sonodaら, 2004]とも近い値である。多種類のHEV遺伝子が日本のイノシシから、又はイノシシ肉の摂食によって感染したと思われるヒト患者から検出されているので[Matsudaら, 2003] [Sonodaら, 2004] [Nishizawaら, 2005] [Takahashiら, 2004] [Tamadaら, 2004]、ヒトや養豚と同様にイノシシにも多様なHEVが広く浸潤していると思われる。

養豚では2-3ヶ月令で抗体保有率が上昇し、肉として出荷される5-6ヶ月令で90%程度の抗体陽性率になるのが一般的だと思われる[Takahashiら, 2003]。調査したイノシシはその体重から多くは1才以上の成獣と思われるが、体重増加しても抗体陽性率の変化は少ない。ブタにおけるHEV感染後の抗体持続期間が明確ではないが、イノシシでは感染時期は特定な年齢ではなく1才未満からそれ以上まで散発的に起きているのではないかと推測する。

日本人がイノシシ肉を食べる機会は豚肉を食べる機会より非常に少ないが、イノシシ肉による事故が目立つ。その理由は不明であるが、可能性の一つとして、イノシシでは抗体保有率が低く、また感染時期が不特定なため感染初期のウイルス力価の高い時期の個体に当たる確率が高いことも考えられる。

### D. 研究発表

学会発表

- 1) イノシシにおけるE型肝炎ウイルス抗体保有状況 宮崎綾子ら、第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月

和文解説

- 1) 動物に感染しているE型肝炎ウイルス 池田秀利 消化器科 141(2) 173-178, 2005

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
 本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班  
 平成 17 年度分担研究報告書

## 本邦の非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の位置づけ

分担研究者 矢野 公士 国立病院長崎医療センター

研究要旨：毎年急性肝炎の全国調査（国立病院機構共同研究班による）を解析し、非 ABC 型と診断された症例の中から、E 型肝炎の症例を抽出し臨床的解析を加えることを本研究の目的としている。本年度は 1980-2005 年に蓄積された非 ABC 型急性肝炎 1041 例中、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 789 例を対象とし、ELISA 法にて HEV-IgM 抗体、HEV-IgG 抗体を測定した。HEV-IgM 陽性は 38 例 (4.8%)、HEV-IgG 陽性は 101 例 (12.8%)であった。このうち、HEV-IgM 単独陽性は 8 例 (8/789, 1.0%)、HEV-IgG 単独陽性は 71 例 (71/789, 9.0%)で、両抗体陽性は 30 例 (30/789, 3.8%)であった。26 年間の期間中、年次別 HEV-IgG 単独陽性率、年次別両抗体陽性率は各々 0%~20%、0%~13%の間で推移し、有意な流行の時期は認めなかった。過去 26 年間における E 型急性肝炎の感染状況は、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していたと考えられた。

### 共同研究者

玉田 陽子 国立病院長崎医療センター  
 八橋 弘 国立病院長崎医療センター  
 石橋 大海 国立病院長崎医療センター

### A. 研究目的

日本国内における E 型肝炎日本固有株の位置づけは未だ明確でない。国内感染例や日本固有株の報告がなされているものの、E 型肝炎が「何時」日本に持ち込まれたのか、過去に国内でも流行があったのか、といったことに関して未解決の問題が多く残され

ている。本研究では、昨年度の 1980-2003 年の推移に加え、2004 年、2005 年の E 型肝炎発症数を調査し、過去 26 年間にわたる年次推移を検討することとした。このことにより、これまで本邦で非 A 非 B 非 C 型とされてきた原因不明急性肝炎に占める E 型肝炎の発生頻度を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

全国 26 の国立病院急性肝炎共同研究班参加施設において 1980-2005 年にウイルス性急性肝炎として登録された症例は 3,984 例であ

り、A型 1,553 例(39.0%)、B型 1055 例(26.5%)、C型 335 例(8.4%)、非 ABC 型 1041 例(26.1%)であった。このうち、発症後 3 ヶ月以内の保存血清が存在した 789 例を対象に、コスミックコーポレーション社製 ELISA を用いて、IgG 型、IgM 型 HEV 抗体を測定した。

C. 研究結果

HEV-IgM 陽性は 38 例 (4.8%)、HEV-IgG 陽性は 101 例 (12.8%)であった。このうち、HEV-IgM 単独陽性は 8 例 (8/789, 1.0%)、HEV-IgG 単独陽性は 71 例 (71/789, 9.0%)で、両抗体陽性、すなわち E 型急性肝炎の可能性が濃厚である症例は 30 例 (30/789, 3.8%)であった。男性 26 例、女性 4 例、平均年齢は 49.7±14.0 歳であった (図 1)。

E 型肝炎 内訳 (1980-2005 年)					
№	発症年	年齢 (歳)	性別	居住地域	海外渡歴
1	1980	74	男	長崎	中国
2	1981	51	男	横浜	なし
3	1981	38	男	長崎	中国
4	1983	48	男	横浜	中国
5	1984	39	男	横浜	中国
6	1984	35	男	横浜	中国
7	1984	46	男	長崎	中国
8	1985	73	男	習志	なし
9	1986	62	男	相模	中国
10	1986	21	女	習志	中国
11	1987	53	男	相模	中国
12	1987	48	男	習志	中国
13	1987	52	男	金沢	中国
14	1992	55	男	習志	なし
15	1996	45	女	横浜	なし
16	1996	58	男	長崎	中国
17	1998	45	男	横浜	タイ
18	2000	51	女	横浜	なし
19	2000	79	女	大分	なし
20	2002	26	男	新宿バングラ	なし
21	2002	54	男	相模	なし
22	2002	52	男	大分	なし
23	2003	22	男	新宿	イン
24	2004	44	男	札幌	中国
25	2004	34	男	埼玉	なし
26	2004	55	男	長崎	中国
27	2005	54	男	新宿	中国
28	2005	55	男	大阪	なし
29	2005	69	男	佐賀	なし
30	2005	52	男	長崎	なし

図 1. 1980-2005 年の期間、非 ABC 型急性肝炎のうち E 型急性肝炎と考えられる症例

発生地域は関東 (18 例)、九州 (9 例) 地域に集中しており、それぞれの非 ABC 型肝炎に占める E 型急性肝炎の割合は 5.5%、3.6%であったが、統計的に有意な差は認められなかった (図 2)。

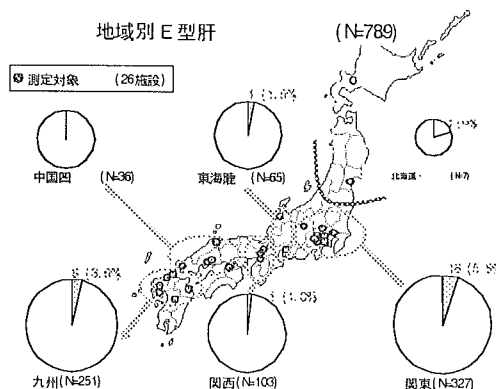


図 2. E 型急性肝炎の地理的分布

1980-2005 年の年次推移を検討 (図 3) したところ、26 年間、E 型肝炎発生率は、1980 年代から 0-13%代で推移している。また、90 年代に入ってもこのペースは変わらず、数%の間で推移しており、特別の流行の時期は認めなかった。

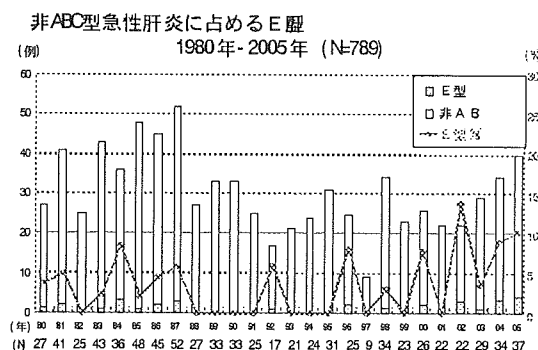


図 3. 非 ABC 型に占める E 型急性肝炎発生頻度年次推移 (棒は実数 (左軸) 折れ線は割合 (右軸) を示す)

D. 考察

これまで、散発的に日本国内の E 型肝炎症例が報告されているが、多数例、年度別発生頻度に関する知見は不足しているのが現状である。今回、全国 26 の国立病院の急性肝炎共同研究班参加施設によって集積された血清を解析することにより、疫学的な動向分析を行った。

今回の解析により、本邦においてこれま

で非 ABC 型肝炎とされてきた急性肝炎症例のうち 3.8%ほどが E 型急性肝炎であることがわかった。また、既往感染と考えられる IgG 単独陽性例は 9.0%であり、日本人健常者における IgG 抗体陽性率よりもやや高い傾向にある。IgM 単独陽性例の解釈は困難であるが、IgG 出現以前の早期症例である可能性、偽陽性の可能性がある。同 ELISA 系を用いたこれまでの検討では IgM 単独陽性例からの HEV-RNA 検出例はなく、後者の可能性が高いと考えている。

これまでに報告されているように、発症例は圧倒的に男性に多く、平均年齢は 49.7 歳と他のどの急性肝炎のカテゴリー（A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、非 ABCD 型肝炎）よりも高いのが特徴である。

当共同研究班の地理的分布が西日本地区にシフトしており、E 型肝炎多発地区とされる北海道地区の症例が正確にモニターされていないが、その中でも地理的不均一性が認められ、食生活その他の環境因子の違いが要因と考えられる。家畜や野生動物などの動物からの感染が報告されており、このことと地域性との関連も否定できない。90 年以前の症例については海外渡航歴が明らかにできていないが、海外渡航のエピソードはいずれの症例にも記載されておらず、多くは国内株による感染と考えている。

2004-05 年の特徴としては、国内発症例もさることながら、輸入感染と考えられる例も散見されることである（症例 24, 26, 27）。グローバル化に伴い、これまでさほど頻繁とは考えられなかった輸入感染症としての E 型肝炎も今後重要性を増すと考えられる。

本研究により、E 型急性肝炎の発生状況は、80 年代から 20 余年にわたって、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していたと考えられた。E 型肝炎日本国内株がいつごろ、どのようにして日本国内に持ち込まれたかは明らかでないが、この発生状況から類推するに、1980 年ごろには既に日本各地に振

盪していたと考えられる。また、2000 年以降の増加傾向は、顕著ではないが確かに認められ、今後も本研究班でモニターする必要がある。

## E. 結論

1, E 型急性肝炎の発生状況は、80 年代から 20 余年にわたって、少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返していた

2, 2004-05 年の特徴としては、国内発症例もさることながら、輸入感染と考えられる例も散見されることである。

3, E 型肝炎は本邦においてまれな疾患ではあるが、動向については今後も本研究班でモニターする必要がある

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

①玉田陽子、矢野公士、八橋弘、福田実可、大黒学、石橋大海

過去 25 年間における E 型肝炎発生頻度の年次推移の検討—日本肝臓学会大会、大阪市 2005 年 6 月

### 2. 論文発表

1, Masuda JI, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S.

Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan.

Hepatol Res. 2005 (31) 178–183

2, 矢野公士、八橋弘、石橋大海 -急性肝炎の診断と治療(各論)-E 型肝炎

最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC27 消化器 3 98-105 2005

3, 矢野公士、八橋弘、石橋大海 -新興感染症としての E 型肝炎

総合臨床 2005 54 (3) 463-470

4, 矢野公士、八橋弘、石橋大海 -食を介する感染症 E 型肝炎 (A 型肝炎を含む)

化学療法の領域 2005 21 (4) 26-33

5, 矢野公士: 日本における E 型肝炎

Medical Practice 2005 22 (5) 860-862

6, 矢野公士、玉田陽子、八橋弘: 本邦に  
おける E 型肝炎の実態

月刊消化器科 2005 41 (2) 149-155

G. 知的所有権の取得状況

特許申請:

実用新案登録: なし

その他: なし



厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策事業）  
「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班  
平成 17 年度分担研究報告書

## 我が国の劇症肝炎，LOHF における HEV 感染の実態（2003 年）

分担研究者 持田 智 埼玉医科大学消化器・肝臓内科教授

研究要旨：2003 年に発症した劇症肝炎 82 例（急性型 44 例，亜急性型 38 例），LOHF 12 例のうち A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が証明されたのは，47 例（50%）であった。その他の 47 例（50%）は自己免疫性，薬物性，成因不明例に分類されるが，これらの中で血清 HEV-RNA が測定されていたのは 12 例（26%）であり，何れも陰性であった。血清 HEV-RNA が測定されていない 35 例のうち 18 例（51%）と各施設で Takahashi の方法以外で測定が実施されていた 11 例から保存血清の供与をいただき，HEV-RNA，IgM-HEV，IgG-HEV を測定したが，全例が陰性であった。HEV 感染の有無を検索した 32 例のうち，北海道地域からの登録例は 1 例のみであった。以上より，わが国における劇症肝炎，LOHF では，北海道地域を除くと HEV 感染の頻度は極めて低いことが確認された。

### 研究協力者

小池 雅美	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 助手）
中山 伸朗	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 講師）
稲生 実枝	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 講師）
名越 澄子	（埼玉医科大学 消化器・肝臓内科 助教授）
藤原 研司	（横浜労災病院 院長）

### 註：

本研究で対象とした症例は，特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班（戸田剛太郎班長，藤原研司班員）による全国調査の登録例である。

### A. 研究目的

国内固有の HEV 株による急性肝疾患が注目されている。厚生労働省「難治性の肝疾患に関する研究」班が実施している劇症肝炎，LOHF の全国集計でも，2001 年の発症例として E 型症例が登録された<sup>1)</sup>。そこで，「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班では 2001~2002 年の発症例のうち，肝炎ウイルス感染の明らかでない症例を対象に保存血清を供与いただき，HEV-RNA を測定したところ 1 例が陽性であった。各施設で血清 HEV-RNA を測定した症例も含めると計 4 例が E 型と診断され，何れも北海道地域から登録例であった<sup>2)</sup>。

以上の検討から，わが国の劇症肝炎，LOHF では北海道地域を除くと E 型症例の頻度は極めて低いと考えられた。本年度はこの成績を確認するために，2003 年の発症例を対象に血清 HEV-RNA の測定状況を調査し，未測定例に関しては保存血清を供与いただき，HEV 感染の実態を調査した。

### B. 方法と成績

日本肝臓学会，日本消化器病学会の理事及び評議員が所属する 621 施設を対象にアンケート調査を

実施したところ，2003 年に発症した劇症肝炎 82 例（急性型 44 例，亜急性型 38 例），LOHF 12 例が登録された。調査用紙を基に成因を分類すると，ウイルス性 47 例（50%），自己免疫性 2 例（2%），薬物性 11 例（12%），成因不明例 32 例（34%），評価不能例 2 例（2%）であった。ウイルス性は急性型の 75%，亜急性型の 32%，LOHF の 17%を占めており，A 型 2 例，サイトメガロウイルス感染 1 例を除いた 44 例は B 型であった。また，B 型は急性感染例 32 例，キャリア例 10 例に分類され，2 例は判定不能であった。

ウイルス感染の明らかでなかった 47 症例（50%）のうち，12 例（26%）で血清 HEV-RNA が測定されていた。IgM-HEV の測定された症例も含めると 19 例（40%）で HEV 感染の検索がなされたが，陽性例は認められなかった。血清 HEV-RNA を測定されなかった 35 例を対象に保存血清の供与を依頼し，18 例（51%）の検体を回収した。また，既に HEV-RNA が測定されていた症例も Takahashi の方法を採用していない場合は保存血清の供与を依頼し，11 例（58%）で再検査を実施した。計 29 例の保存血清で Takahashi らの方法によって HEV-RNA，IgM-HEV，IgG-HEV を測定したが<sup>3)</sup>，陽性例は認め

られなかった。これら検体のうち、北海道地区からの登録例のものは1例のみであった(図1)。

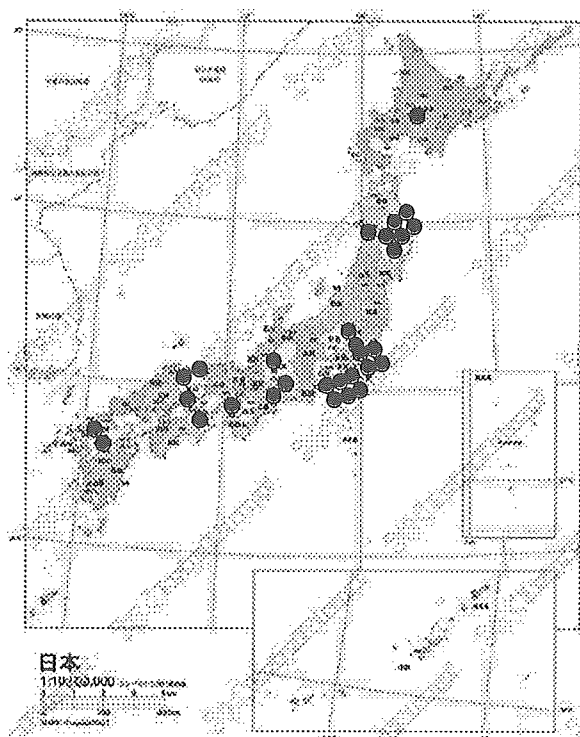
### C. 考案と結語

わが国の劇症肝炎, LOHF における成因診断では, HEV に関する検索が普及しつつある。2003 年は A, B, C 型肝炎ウイルスの感染が明らかでない症例の 26% で HEV-RNA が測定されており, IgM-HEV を測定した症例も含めると HEV 感染を検索した症例の比率は 40% に達していた。また, 本年度は保存血清を用いた検討も 29 例で実施できたため, ウイルス感染が明らかでない症例の 64% で HEV 感染の有無を検討することが可能であった。しかし, 血清 HEV-RNA が陽性の症例は存在せず, わが国の劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の頻度は低いことが確認された。2001-2002 年の症例における検討では, Takahashi の方法に準拠しないと HEV-RNA が偽陰性になる場合が見られた<sup>4)</sup>。今回は 18 例で保存血清を用いて HEV-RNA の再測定を実施したが, 再検後に陽性となる症例は見られなかった。なお, 今回の検討では, ウイルス感染が明らかでなかった症例のうち, 北海道地区から登録例は 1 例に過ぎなかった。Genotype IV 型の多く見られる北海道地域では, HEV 感染に起因する劇症肝炎, LOHF は決して稀でない可能性があり, 今後も検討を続ける必要があると考えられた。

### D. 参考文献

- 1) 藤原研司, 持田 智, 松井 淳. 劇症肝炎及び遅発性肝不全の全国集計 (2003 年). 厚生労働省特定疾患対策事業「難治性の肝疾患に関する研究班」平成 16 年度報告書, pp93-107, 2005.
- 2) 持田 智, 松井 淳, 稲生実枝, *et al.* 我が国の劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の実態. 輸入感染症としての E 型急性肝炎の: 中国株の塩基配列の解析. 厚生労働省肝炎等克服緊急対策事業「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班, 平成 16 年度報告書, pp42-45, 2005.
- 3) Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Miyakawa H, Miyakawa Y, Maekubo H, Mishiro S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 308-318.
- 4) 持田 智, 松井 淳, 稲生実枝, *et al.* 我が国の劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の意義: 全国集計からの検討. 厚生労働省肝炎等克服緊急対策事業「本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究」班, 平成 15 年度報告書, 2004; pp33-34.

図 1. 我が国の劇症肝炎, LOHF における HEV 感染の実態 (2003 年): 黒=陰性, 灰色=陽性



厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
 本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究班  
 平成 17 年度分担研究報告書

## HEV キャプシド蛋白質を発現する形質転換植物の開発

分担研究者 津田 新哉 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター

研究要旨：本研究の目的は、HEV 中間宿主である豚の飼料として利用することが考えられる「食べるワクチン」を開発するために、HEV のキャプシド蛋白質(CP)を植物細胞内で発現させ、経口で効率的に免疫を賦与するためのウイルス様中空粒子を形成させる発現系を開発することである。本年度は、HEV CP の塩基配列を改変・修飾（植物型コドンへの変換、プロテアーゼ切断部配列の除去、小胞体移行・局在化シグナルの付加）することで、より効率的に安定して発現させる方法を比較・検討した。また、植物細胞内にて発現させた CP をショ糖密度勾配遠心法により沈降させ、中空粒子形成の有無を確認した。

共同研究者

大西 純 リサーチ・レジデント

### A. 研究目的

ヒト E 型肝炎ウイルス (HEV) は「人獣共通感染ウイルス」であり、HEV 感染の reservoir である野生のイノシシ、シカ、または飼育ブタなどの精肉を摂食するとその後に肝炎を発症した事例が報告されている (Tei et al., 2003, Yazaki et al., 2003)。その感染経路を遮断するひとつの方法は、中間宿主となるブタなどに HEV に対する免疫を賦与することが効果的と思われる。

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞内で発現させた組換え HEV キャプシド蛋白質 (CP) は、細胞内で集積することで球状の中空粒子を自動的に形成し、さらに、組換え HEV CP をネズミに経口投与することによりワクチン効果が発揮されるとの報告がある (Li et al., 1997)。

本研究では、飼育ブタの HEV 感染化予防を目的とした経口ワクチンを開発するため、まずは HEV CP 遺伝子を導入した形質転換タバ

コを作製し、タバコ細胞で発現された HEV CP から成る中空粒子の生産系を開発する。本生産系は、HEV CP を発現する飼料作物の開発さらに経口投与ワクチン飼料の創出へと繋がり、飼育ブタの reservoir 化を阻止することで HEV 伝染環を遮断し、精肉を介した経口感染による E 型肝炎を予防する技術となる。

### B. 研究方法

#### B-1 HEV CP 塩基配列の改変

遺伝子の翻訳過程においてコドン使用頻度は動物-植物間では大きく異なることが知られている。動物を宿主とする HEV のコドン使用頻度は動物型であり、植物で同ウイルス蛋白質を発現させる際には、コドン使用頻度の違いにより翻訳効率が低いと予想された。また、翻訳された蛋白質を細胞内に安定して蓄積させ、さらに植物細胞特有のプロテアーゼによる切断の回避も必要と考えられた。導入遺伝子として、Genotype III 型の JRA、Genotype IV 型の JSN から PCR にて増幅した HEV CP 遺伝子を用いた。HEV CP は N 末端 111 アミノ酸が欠失していても中空粒子が形成されることが知られている (Li et al., 1997)。植物細

胞内発現 HEV CP 遺伝子もその報告と同様の短い配列を用いた。HEV とタバコ植物 (*Nicotiana benthamiana*) のコドン使用頻度を比較し、両者間で使用頻度が大きく異なるコドンを選び、下記のアミノ酸を指定するコドンを改変した (図 1)。Ala (GCC→GCA)、Gly (GGC→GGA/T)、Arg (CGC→AGG/A)、Thr (ACC→ACT/A)、Pro (CCC→CCA/T)。これらの改変を施すために、HEV CP 遺伝子の全長を分断化するように合成オリゴ DNA (平均鎖長 100mer、両末端 20mer が互いにオーバーラップする 20~22 断片) をデザインし改変型 HEV CP 遺伝子を overlapping PCR により *in vitro* にて人工合成した。その際に、5' 及び 3' 末端に小胞体移行・滞留シグナルペプチド配列を付加した。また、プロテアーゼによる消化を回避するため、予想される認識配列を除去した。これにより GC 含量は改変前後で 57.1% から 45.5% となった。

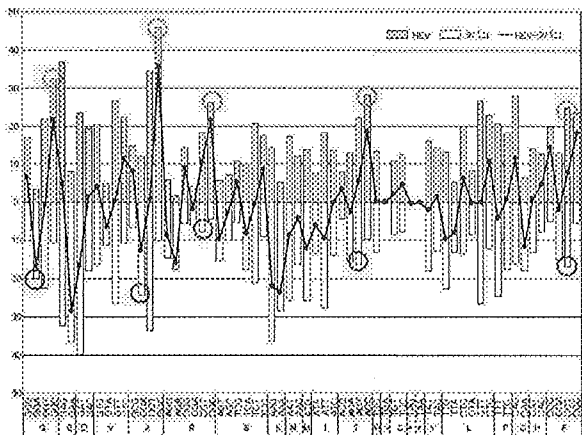


図 1 HEV とタバコ植物のコドン使用頻度の比較 (各アミノ酸の指定コドンのうち、HEV で使用頻度が高く植物で低いコドン (黄丸) は、植物にて使用頻度が高いコドン (赤丸) へと変更した。グラフは使用頻度 (%), 実線は両者間の差 (HEV-タバコ) を示す。改変対象となるコドン (赤字) は本文参照。コドン使用頻度は Codon Usage Database (CUTG www version:かずさ DNA 研究所) を用いて算出した。)

## B-2 改変型 HEV CP の一過性発現とシヨ糖密度勾配遠心法による分画

形質転換植物中での発現を確認するため、昨年度までに開発した植物細胞形質転換用バ

イナリーベクターに、改変型 HEV CP 遺伝子を導入しアグロバクテリウムを形質転換した。さらに、転写後型遺伝子サイレンシングによる外来遺伝子の発現抑制を回避するために、昨年度までに開発した遺伝子サイレンシング抑制用バイナリーベクターも利用した。改変型 HEV CP を有するバイナリーベクター、または遺伝子サイレンシング抑制用バイナリーベクターを有するそれぞれのアグロバクテリウムを混合して、アグロインフィルトレーション法 (Kubota et al., 2003) により植物体に接種した。

アグロインフィルトレーション法により接種植物葉に発現された改変型 HEV CP を E 型肝炎患者の血清を用いてウェスタンブロット法にて反応させ、同タンパク質の抗原性・蓄積量・発現量等を確認した。また、同感染植物葉の破碎液をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、植物体内で発現した改変型 HEV CP の中空ウイルス様粒子への会合を解析した。

## C. 研究結果

### 改変型 HEV CP の形質植物細胞内での発現

アグロインフィルトレーション法により形質転換させた植物細胞中において、植物型コドンへ改変した HEV CP 遺伝子の発現が確認された。小胞体移行シグナルペプチド配列を付加した HEV CP でも、植物細胞内において安定して蓄積していることが判明した (図 2)。また、改変型 HEV CP は、E 型肝炎患者血清と良好な反応性を示したことより、血清学的にも抗原性を維持したウイルス蛋白質であることが確認された。

さらに、同感染植物細胞中で発現された HEV CP の性状を確認するため、シヨ糖密度勾配遠心法にて分画した結果、改変型 HEV CP は 60%シヨ糖上に沈降帯を形成したことが確認された。同沈降帯を含む画分を ELISA 法及びウェスタンブロット解析した結果、E 型肝炎患者血清と良好な反応性を示し、推定され

る分子量にバンドが確認された (図 2)。

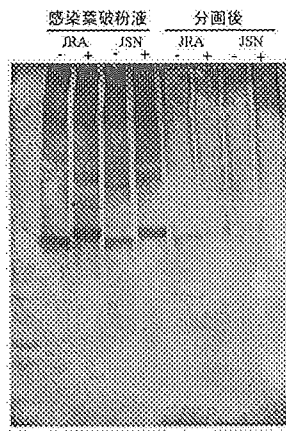


図 2 アグロバクテリウムインフィルトレーション法により発現した改変型 HEV CP 抗原のウェスタンブロット法による解析 (E 型肝炎患者血清による抗原抗体反応後に Anti-human IgG 二次抗体により HEV CP を検出。シヨ糖密度勾配遠心により沈降した同抗原の画分: レーン 6-7)

#### E. 考察

今回の研究により、E 型肝炎ウイルスの CP を植物にて発現させるシステムが構築され、多量に安定して同ウイルス蛋白質を植物細胞内に蓄積させることに成功した。こうした動物ウイルスを植物細胞内で発現させる際には、今回の研究で明らかになったように、動物-植物間でのコドン使用頻度の違いによる障害 (codon bias) を回避する必要がある、また発現蛋白質を安定して蓄積させるためには小胞体などに移行させるシグナルペプチドを付与するなどの工夫措置が必要である。さらには、高効率に発現させるためには、生来的に植物が持つ転写後型遺伝子サイレンシングを抑制する措置も必要となる。これらの事項を組み合わせ、研究では動物型遺伝子を持つ HEV CP の発現を植物で可能とした。

本研究は、将来的に「食べるワクチン」の開発を目指し行われた。実験モデル植物としてのタバコ植物で HEV CP 蛋白質の発現が成功したことにより、今後は実際に食餌可能な農作物などへの転用が期待される。HEV CP 発現野菜・作物を食餌した動物体内において

腸管免疫の誘導によるワクチン効果の確認が今後の課題となるであろう。E 型肝炎ウイルスの中間宿主の予防対策の一助になると期待される。

#### F. 参考論文

Kubota, K., et al., 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77(20): 11016-11026.

Li, T.C., et al., 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 71(10): 7207-7213.

Tei, S., et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-373.

Yazaki, Y., et al., 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 84: 2351-2357.

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 17 年度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）

『本邦に於ける E 型肝炎の診断・予防・疫学に関する研究』

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Original articles: (班員・班友を下線で示す)

Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1958-1960.

Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006;in press.

Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH: Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 2005;79:1299-3006.

M. Takahashi, S. Kusakai, H. Mizuno, K. Suzuki, K. Fujimura, K. Masuko, Y. Sugai, T. Aikawa, T. Nishizawa, and H. Okamoto. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 2005;43:49-56

Masuda JI, Yano K, Tamada Y, Takii Y, Ito M, Omagari K, Kohno S. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepato Res* 2005; 31: 178-183.

Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda E, Takahashi M, Tsatsalt-Od B, Nishizawa T, Okamoto H: Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples from healthy individuals. *J Med Virol* 76:526-533, 2005

Mizuo H, Yazaki Y, Sugarawa K, Tsuda E, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H: Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76:341-349, 2005

Nagasaki F, Ueno Y, Kanno N, Okamoto H, Shimosegawa T: A case of acute hepatitis with positive autoantibodies who actually had hepatitis E virus infection. *Hepato Res* 32:134-137, 2005

Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepato Res* 2006; 34: 137-140.

Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H, Sato Y, Bando M, Okamoto H: Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86:3321-3326, 2005

Surya IGP, Kornia K, Suwardewa TGA, Mulyanto, Tsuda E, Mishiro S. Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 2005; 75: 499-503.

Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H: Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43:49-56, 2005

Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, Tsatsralt-Od B, Inoue J, Okamoto H: Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. J Gen Virol 86:1807-1813, 2005

Tanaka Y, Takahashi K, Orito E, Karino Y, Kang JH, Suzuki K, Matsui A, Hori A, Matsuda H, Sakugawa H, Asahina Y, Kitamura T, Mizokami M, Mishiro S. Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. J Gen Virol 2006; 87: 949-54.

高橋和明, 岡田克夫, 姜貞憲, 狩野吉康, 市田隆文, 松田裕之, 大西幸代, 豊田成司, 山際訓, 前久保博士, 安倍夏生, 三代俊治. 重症肝炎との関連性濃厚な E 型肝炎ウイルス genotype IV 内の広域分布型一系統 鳥取, 新潟, 札幌から得られた 3 本の完全長および 1 本の準完全長 HEV 塩基配列. 肝臓 2005; 46: 389-90.

織田聡, 新敷吉成, 清水幸裕, 岩本真也, 工藤浩, 平野克治, 矢田豊, 安村敏, 峯村正実, 高原照美, 高橋和明, 安倍夏生, 三代俊治, 杉山敏郎. 富山県からは初報告例となる散発性 E 型急性肝炎の 1 例. 肝臓 2005; 46: 647-52.

宮地克彦, 本合泰, 山田慶朋, 藤原新也, 有坂好史, 藤山徹, 小来田幸世, 田辺敬明, 福井秀雄, 福田彰, 勝健一, 高橋和明, 安倍夏生, 三代俊治. タイ出張後に発症し抗体陽転が遅延し且つ分離株塩基配列がギリシャ・スペイン株に近似していた日本人 E 型肝炎の 1 例. 肝臓 2005; 46: 290-1.

新井雅裕, 橋本直明, 宮川浩, 阿部敏紀, 山中太郎, 柴田実, 安倍夏生, 高橋和明, 三代俊治. 京浜地区 E 型肝炎国内感染例 10 例の疫学的特徴と HEV 分離株塩基配列. 肝臓 2005; 46: 224-5.

飯野四郎, 狩野吉康, 前久保博士, 姜貞憲, 三代俊治, 新井雅裕, 北嶋直人, 市田隆文, 岡本宏明. E 型急性肝炎の血清診断における IgA クラス抗 HEV 抗体測定用試薬「イムニス IgA anti-HEV EIA」の有用性の検討. 医学と薬学 2005; 53: 461-9.

中原徳弥, 新井雅裕, 岩田滉一郎, 中尾國明, 馬場清, 高橋和明, 三代俊治, 太田裕彦. 当院における原因不明の急性肝炎の中にみられた国内発症 E 型急性肝炎の検討. 医学と薬学 2005; 53: 74-7.

中村正治, 平良勝也, 大野 惇, 平良雅克, 高橋和明, 三代俊治. 西表 (イリオモテ) の野生リュウキュウイノシシから検出された genotype 4 HEV. 肝臓 (in press)

## 2. Reviews: (班員・班友を下線で示す)

遠藤龍人, 八角有紀, 鈴木一幸, 他: 原因不明の急性肝炎および劇症肝炎の実態と病態. 消化器科 2005;40:174-179.

熊谷一郎, 葛西幸穂, 鈴木一幸, 他: ウイルス性肝障害- E 型肝炎の重症例. 肝・胆・膵 2005;51:61-67.

三代俊治. 【肝炎診療を見直す】人畜共通感染症としての E 型肝炎. 日本医師会雑誌 2005; 134: 597-601.

三代俊治. 【肝疾患の実地診療: エビデンスに基づいた最新の治療の進めかた】本邦における E 型肝炎の動向. Medical Practice 2006; 23: 113-4.

三代俊治. 新興・再興感染症-疾患の理解と新しい知見-疾患解説: E 型肝炎. カレントセラピー 2005; 23: 946-9.

大西幸代, 姜貞憲, 前久保博士, 荒川智宏, 狩野吉康, 豊田成司, 高橋和明, 三代俊治. 【本邦における E 型肝炎の実態】札幌地域における E 型肝炎. 消化器科 2005; 41: 161-7.

滝川康裕, 佐藤彰宏, 鈴木一幸, 他: 劇症肝不全の全国統計. 肝・胆・膵 2005;51: 7-15.

池田秀利. 【本邦における E 型肝炎の実態】動物に感染している E 型肝炎ウイルス. 消化



器科 2005; 41:173-178.

田中靖人, 高橋和明, 三代俊治, 溝上雅史. 【本邦における E 型肝炎の実態】 E 型肝炎ウイルスの進化速度と本邦における拡散時期の推定. 消化器科 2005; 41: 179-84.

道堯浩二郎, 堀池典生. 人獣共通感染症としての E 型肝炎 - イノシシにおける E 型肝炎ウイルス感染. 臨床消化器内科 (in press)

矢野公土. 日本における E 型肝炎. Medical Practice 2005; 22: 860-862.

矢野公土, 玉田陽子, 八橋弘. 本邦における E 型肝炎の実態. 月刊消化器科 2005; 41: 149-155.

矢野公土, 八橋弘, 石橋大海. 急性肝炎の診断と治療(各論)-E 型肝炎. 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC27 消化器 3. pp98-105, 2005

矢野公土, 八橋弘, 石橋大海. 食を介する感染症 E 型肝炎 (A 型肝炎を含む). 化学療法の領域 2005; 21: 26-33.

矢野公土, 八橋弘, 石橋大海. 新興感染症としての E 型肝炎. 総合臨床 2005; 54: 463-470.

鈴木一幸: E 型肝炎の臨床. 日本農村医学会雑誌 2005;53:919-923.

鈴木一幸, 滝川康裕, 林 世徳: 急性肝不全をめぐる最近の話題. 岩手医誌 2005 ; 57 : 455-462.

姜貞憲. 輸血により発症した E 型肝炎の症例. 今日の治療 2005;13: 17-23.

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

(前掲一覧表のうちの一部を収載)

基礎

## Short Communication

Correspondence  
Masashi Mizokami  
mizokami@med.nagoya-cu.ac.jp

Received 6 November 2005  
Accepted 7 December 2005

# Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses

Yasuhito Tanaka,<sup>1</sup> Kazuaki Takahashi,<sup>2</sup> Etsuro Orito,<sup>1</sup> Yoshiyasu Karino,<sup>3</sup> Jong-Hon Kang,<sup>4</sup> Kazuyuki Suzuki,<sup>5</sup> Atsushi Matsui,<sup>6</sup> Akiko Hori,<sup>7</sup> Hiroyuki Matsuda,<sup>8</sup> Hiroshi Sakugawa,<sup>9</sup> Yasuhiro Asahina,<sup>10</sup> Tsuneo Kitamura,<sup>11</sup> Masashi Mizokami<sup>1</sup> and Shunji Mishiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Molecular Informative Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi, Mizuho, Nagoya 467-8601, Japan

<sup>2</sup>Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital, Tokyo 140-8522, Japan

<sup>3</sup>Department of Hepatology, Sapporo Kosei General Hospital, Sapporo 060-0033, Japan

<sup>4</sup>Center for Gastroenterology, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo 006-8555, Japan

<sup>5</sup>First Department of Internal Medicine, Iwate Medical University, Iwate 020-8505, Japan

<sup>6</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Saitama Medical University, Saitama 350-0495, Japan

<sup>7</sup>Department of Internal Medicine, Kokuho Central Hospital, Nara 636-0302, Japan

<sup>8</sup>Department of Internal Medicine, Tottori Red Cross Hospital, Tottori 680-8517, Japan

<sup>9</sup>Transfusion Section, University of the Ryukyus School of Medicine, Okinawa 903-0215, Japan

<sup>10</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo 180-8610, Japan

<sup>11</sup>Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine Urayasu Hospital, Chiba 279-0021, Japan

The ancestor(s) of apparently Japan-indigenous strains of *Hepatitis E virus* (HEV) was probably of foreign origin, but it remains unclear when and from where it made inroads. In this study, 24 genotype 3 and 24 genotype 4 HEV strains recovered in Japan each showed a significant cluster, clearly distinct from those of foreign strains, in the phylogenetic tree constructed from an 821 nt RNA polymerase gene fragment. The evolutionary rate, approximately  $0.8 \times 10^{-3}$  nucleotide substitutions per site year<sup>-1</sup>, enabled tracing of the demographic history of HEV and suggested that the ancestors of Japan-indigenous HEV had made inroads around 1900, when several kinds of Yorkshire pig were imported from the UK to Japan. Interestingly, the evolutionary growth of genotype 3 in Japan has been slow since the 1920s, whereas genotype 4 has spread rapidly since the 1980s. In conclusion, these data suggest that the indigenization and spread of HEV in Japan were associated with the popularization of eating pork.

Transmission of *Hepatitis E virus* (HEV) occurs primarily by the faecal–oral route through contaminated water supplies in developing countries (Purcell & Emerson, 2001). Additionally, increasing evidence has indicated that hepatitis E is a zoonosis (Harrison, 1999; Kabrane-Lazizi *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 1997, 1998, 2002; Nishizawa *et al.*, 2003;

Okamoto *et al.*, 2001; Tei *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2003). It has recently been suggested that zoonotic, food-borne transmission of HEV from domestic pigs, wild boars or wild deer to humans plays an important role in the occurrence of domestic infections of hepatitis E in Japan, where people have unique habits of ingesting raw fish (sushi or sashimi) and uncooked or undercooked meat (also organ meats, such as raw liver) (Matsuda *et al.*, 2003; Tamada *et al.*, 2004). Thus, it seems that HEV infection is now autochthonous in Japan. It remains unclear, however, when and from where the ancestral HEV strains made inroads and have spread in

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the HEV nucleotide sequences reported in this paper are shown in Fig. 1.

Supplementary tables are available in JGV Online.