

based on the common 280 nt ORF2 sequence of genotype 3 HEV isolates confirmed that the three genotype 3 isolates obtained in the present study were located on the same branch as 11 human and swine HEV isolates obtained in the UK (Fig. 2b).

As of 27 January 2006, the nucleotide sequences of 1217 HEV isolates have been deposited in the GenBank/EMBL/DBJ databases, but entire or almost entire sequences account for only 5.5% of them. In the present study, we determined the full-length genomic sequences of three genotype 3 HEV isolates; they were found to be only 80.7–83.0% similar to known HEV isolates of the same genotype over the entire genome. We also compared them with all reported HEV isolates whose partial sequences are known including those circulating in European countries. A total of 70 entire or almost entire HEV sequences (17 in genotype 1, one in genotype 2, 24 in genotype 3 and 28 in genotype 4), including those of the three genotype 3 isolates obtained in the present study, were available for comparison. Among the four genotypes of HEV, genotype 1 has up to 11.8% intra-genotype diversity, whilst genotype 3 shows a wider degree of intra-genotype diversity than genotype 4 ($12.9 \pm 4.8\%$ vs $10.9 \pm 5.6\%$, $P = 0.0028$, Mann–Whitney U-test). In addition, genotype 3 HEV isolates are widespread (Table 1) and have been recovered from not only humans but also from various animals such as swine (Meng *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 2001), wild deer (Tei *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004), wild boar (Nishizawa *et al.*, 2005; Sonoda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004) and a wild mongoose (Nakamura *et al.*, 2006). In contrast, genotype 4 HEV strains circulate mainly in Asian countries and have been recovered so far from humans, swine and wild boar (Hsieh *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

The genotype 3 HEV isolates in Japan segregate into three clusters: the most predominant cluster ($n = 203$, as of 27 January 2006) represented by the JRA1 isolate is apparently indigenous to Japan; the second most predominant cluster ($n = 97$) consists of US-isolate-like HEV isolates; and the third minor cluster ($n = 24$) is represented by the HE-JA04-1911, swJ8-5 and swJ12-4 isolates whose entire nucleotide sequences were determined in the present study. Inter-cluster and intra-cluster divergences were 11.9–19.3 and 0–11.4%, respectively, over the entire genome. Pairwise comparison revealed that the HE-JA04-1911, swJ8-5 and swJ12-4 isolates belonging to the third cluster within genotype 3 are most closely related to human and swine HEV isolates circulating in the UK among the HEV isolates reported outside Japan (Table 1). On phylogenetic analysis, these three isolates were interspersed among 11 UK human and swine isolates and four other Japanese human and swine isolates in the third cluster within genotype 3 (shaded box in Fig. 2b). In the UK, sporadic cases of hepatitis E (Ijaz *et al.*, 2005; McCrudden *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) and the existence of a close genetic relationship between human and swine HEV strains (Banks *et al.*, 2004) have been reported. As swine are one of the major reservoirs

of HEV (Meng, 2003; Smith, 2001; Takahashi *et al.*, 2003), it is conceivable that UK-isolate-like HEV isolates represented by the HE-JA04-1911, swJ8-5 and swJ12-4 isolates entered Japan via importation of pigs from the UK. This speculation is supported by the historical evidence that the Japanese government started to import several kinds of Yorkshire and Berkshire pigs from the UK in 1900 to introduce high-quality domestic pigs for food [http://www.pig-pins.or.jp/youton/shiryō.html (in Japanese)]. Evidence that swine HEV can be imported through international trading of pigs was reported in Taiwan (Wu *et al.*, 2002). However, in addition to the UK isolates, a Greek isolate (Gr2) also falls into the third divergent cluster within the genotype 3 (Fig. 2a). Therefore, it is possible that, as more genotype 3 HEV isolates are identified worldwide, this third cluster may expand to include isolates from other geographical regions.

In conclusion, the present study indicates that genotype 3 HEV strains are markedly heterogeneous with an intra-genotype divergence of up to 19.3% over the entire genome and that the indigenization of UK-isolate-like HEV strains of genotype 3 represented by the human and swine isolates of HE-JA04-1911, swJ8-5 and swJ12-4 in Japan may be associated with the importation of pigs for food from the UK since 1900. Further studies are needed to provide more concrete data on the origin of these divergent genotype 3 Japanese swine and human HEV strains.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J. & Dalton, H. (2004). Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10, 953–955.
- Emerson, S. U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.-J., Purdy, M., Schlauder, G. G. & Tsarev, S. A. (2004). *Hepevirus*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 851–855. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Harrison, T. J. (1999). Hepatitis E virus – an update. *Liver* 19, 171–176.
- Hsieh, S.-Y., Meng, X.-J., Wu, Y.-H., Liu, S.-T., Tam, A. W., Lin, D.-Y. & Liaw, Y.-F. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37, 3828–3834.
- Huang, F. F., Sun, Z. F., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Shivaprasad, H. L., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X.-J. (2004). Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol* 85, 1609–1618.
- Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M. & 13 other authors (2005). Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic,

- clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 192, 1166–1172.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X.-J. & Hill, V. R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65–71.
- Li, T.-C., Chijiwa, K., Sera, N. & 8 other authors (2005). Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11, 1958–1960.
- Lu, L., Drobeniuc, J., Kobaynikov, N., Usmanov, R. K., Robertson, B. H., Favorov, M. O. & Margolis, H. S. (2004). Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J Med Virol* 74, 556–562.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. & Mishiro, S. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188, 944.
- McCrudden, R., O'Connell, S., Farrant, T., Beaton, S., Iredale, J. P. & Fine, D. (2000). Sporadic acute hepatitis E in the United Kingdom: an underdiagnosed phenomenon? *Gut* 46, 732–733.
- Meng, X.-J. (2003). Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 278, 185–216.
- Meng, X.-J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9860–9865.
- Meng, X.-J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714–9721.
- Meng, X.-J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U. & Purcell, R. H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40, 117–122.
- Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y. & 8 other authors (2002). Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 40, 3209–3218.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M. & Mishiro, S. (2006). Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 34, 137–140.
- Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y. & Okamoto, H. (2003). Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84, 1245–1251.
- Nishizawa, T., Takahashi, M., Endo, K. & 7 other authors (2005). Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 86, 3321–3326.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U. & Yoshikawa, A. (2001). Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 929–936.
- Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2001). Hepatitis E virus. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 3051–3061. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Schlauder, G. G. & Mushahwar, I. K. (2001). Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 65, 282–292.
- Smith, J. L. (2001). A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64, 572–586.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T. & 7 other authors (2004). Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 42, 5371–5374.
- Takahashi, K., Iwata, K., Watanabe, N., Hatahara, T., Ohta, Y., Baba, K. & Mishiro, S. (2001). Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 287, 9–12.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., Gotanda, Y., Iita, T., Tsuda, F. & Okamoto, H. (2003). Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84, 851–862.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N. & Mishiro, S. (2004). Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330, 501–505.
- Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H. & 7 other authors (2005). 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.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C.-C., Bradley, D. W., Fry, K. E. & Reyes, G. R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120–131.
- Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., Inoue, O., Mawatari, F. & Ishibashi, H. (2004). Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40, 869–870.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J. C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I. K. & Harrison, T. J. (1999). A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 80, 169–177.
- Wang, Y., Levine, D. F., Bendall, R. P., Teo, C. G. & Harrison, T. J. (2001). Partial sequence analysis of indigenous hepatitis E virus isolated in the United Kingdom. *J Med Virol* 65, 706–709.
- Wu, J.-C., Chen, C.-M., Chiang, T.-Y., Tsai, W.-H., Jeng, W.-J., Sheen, I.-J., Lin, C.-C. & Meng, X.-J. (2002). Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol* 66, 488–492.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y. & Okamoto, H. (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.

Short
CommunicationMolecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E
viruses

Yasuhiro Tanaka,¹ Kazuaki Takahashi,² Etsuro Orito,¹ Yoshiyasu Karino,³
Jong-Hon Kang,⁴ Kazuyuki Suzuki,⁵ Atsushi Matsui,⁶ Akiko Hori,⁷
Hiroyuki Matsuda,⁸ Hiroshi Sakugawa,⁹ Yasuhiro Asahina,¹⁰
Tsuneo Kitamura,¹¹ Masashi Mizokami¹ and Shunji Mishiro²

Correspondence

Masashi Mizokami

mizokami@med.nagoya-cu.ac.jp

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

²Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital, Tokyo 140-8522, Japan

³Department of Hepatology, Sapporo Kosei General Hospital, Sapporo 060-0033, Japan

⁴Center for Gastroenterology, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo 006-8555, Japan

⁵First Department of Internal Medicine, Iwate Medical University, Iwate 020-8505, Japan

⁶Department of Gastroenterology and Hepatology, Saitama Medical University, Saitama 350-0495, Japan

⁷Department of Internal Medicine, Kokuho Central Hospital, Nara 636-0302, Japan

⁸Department of Internal Medicine, Tottori Red Cross Hospital, Tottori 680-8517, Japan

⁹Transfusion Section, University of the Ryukyus School of Medicine, Okinawa 903-0215, Japan

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

¹¹Department 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 0.8×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year, 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.

Received 6 November 2005

Accepted 7 December 2005

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.

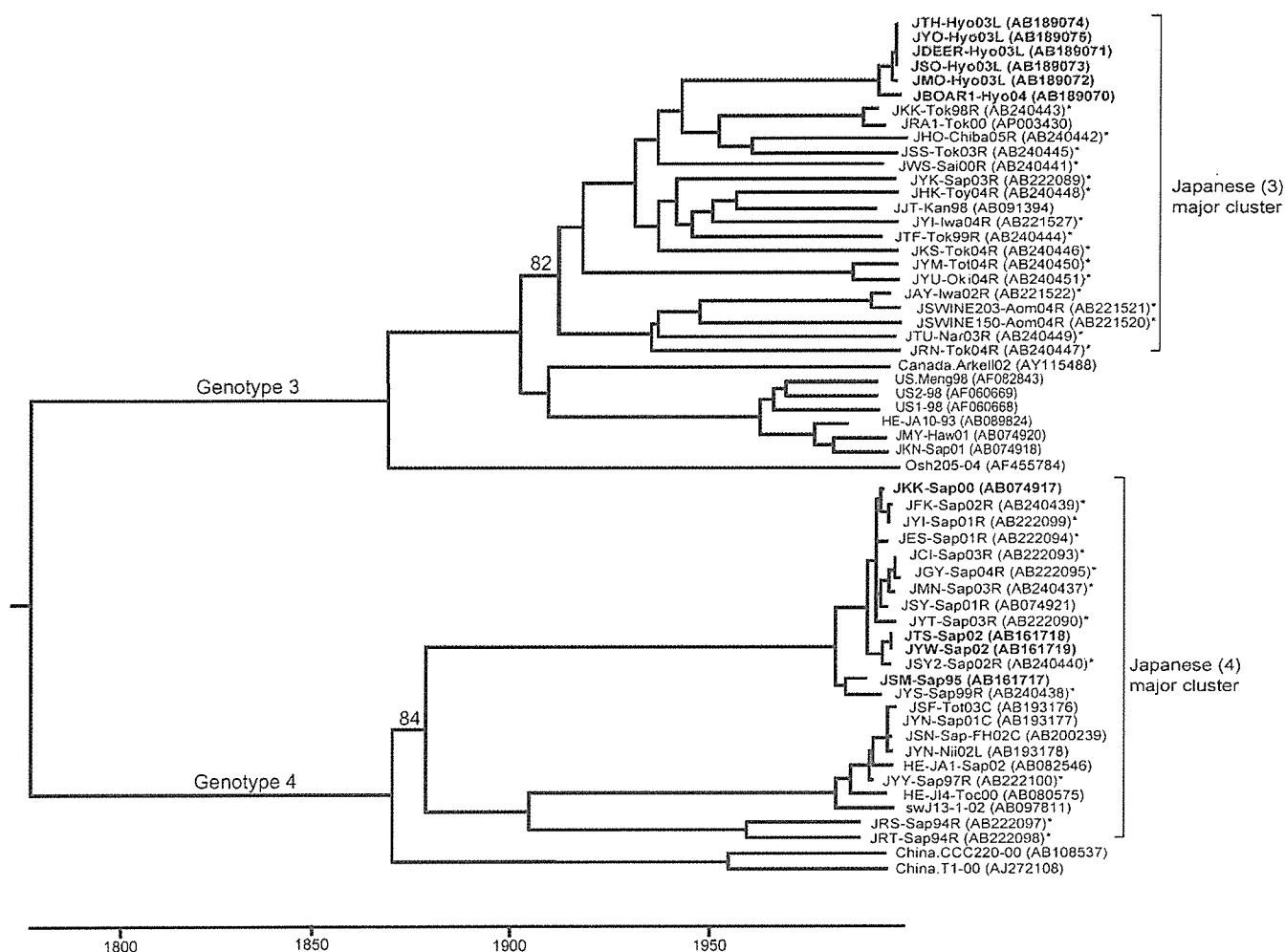


Fig. 1. Phylogenetic tree of the partial RNA polymerase region of the HEV genome. Twenty-four genotype 3 and 24 genotype 4 strains in Japan showed each significant cluster to have a high bootstrap value and to be distinct from other reference sequences (USA, Canada and Japanese minor strains in genotype 3; Chinese strains in genotype 4). Genetic distances have been transformed into a time scale of years by using estimates of the molecular clock (0.84×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year). Ten strains in bold are used for linear regression in Fig. 2. Strain names are followed by prefecture or city names in Japan: Hyo, Hyogo; Tok, Tokyo; Sai, Saitama; Sap, Sapporo; Iwa, Iwate; Kan, Kanagawa; Oki, Okinawa; Aom, Aomori; Nar, Nara; Tot, Tottori; Nii, Niigata; Toc, Tochigi; Toy, Toyama. Asterisks indicate strains that were newly sequenced in this study.

Japan. In this study, we first estimated the evolutionary rate of HEV by using Japan-indigenous genotype 3 and genotype 4 strains, which were phylogenetically distinct from the other strains in foreign countries. Then, based on this evolutionary rate, we traced the demographic history of HEV in Japan.

For linear-regression analyses within significant clusters, two independent datasets were applied: one was a Hyogo cluster (genotype 3) with JMO-Hyo03L, JTH-Hyo03L, JSO-Hyo03L, JYO-Hyo03L, JDEER-Hyo03L (these five isolates were obtained in April 2003) and JBOAR1-Hyo04 (April 2004) (Takahashi *et al.*, 2004a), and another was a Sapporo cluster (genotype 4) with JSM-Sap95 (March 1995), JKK-Sap00 (November 2000), JYWSap02 (August 2002) and

JTS-Sap02 (September 2002) (Takahashi *et al.*, 2004b). GenBank accession numbers for these strains are given in Fig. 1. To elucidate the epidemiological history of the HEV population in Japan, 48 known and newly sequenced HEV strains ($n=24$ for each of genotype 3 and 4) were used for molecular-evolutionary analyses. The nucleotide sequences of 28 strains for the molecular-clock analyses were determined in this study (the other 20 sequences dealt with in this paper were available from GenBank).

Nucleic acids were extracted from serum samples (50 μ l) by using a commercial Smitest EX-R & D kit (Genome Science) and precipitated in a 2 ml tube. The pellet was air-dried for 15 min and then suspended in 10 μ l autoclaved distilled water containing 10 U RNase inhibitor ml^{-1} (TaKaRa

Shuzo). A sequence spanning 821 nt in the RNA-dependent RNA polymerase region (corresponding to nt 3961–4781 of the prototype Burmese HEV strain; GenBank accession no. M73218), including the GDD motif, was amplified by PCR in three overlapping regions with 20-mer primers deduced from known HEV sequences. Reverse transcription was performed at 50 °C for 60 min with the Thermo-Script RT system (Invitrogen), and the first- and second-round PCRs were carried out in the presence of Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The final products were sequenced in an ABI 377 DNA sequencer (PE Biosystems) with an ABI Prism BigDye kit (Applied Biosystems). The sequences determined were utilized to confirm HEV genotypes and to construct phylogenetic trees. The reliability of the phylogenetic tree was assessed by bootstrap-resampling tests.

A reconstructed tree was built on the RNA polymerase region by using a heuristic maximum-likelihood (ML) topology search with stepwise addition and nearest neighbour-interchange algorithms. Tree likelihood scores were calculated by using the HKY85 model (Hasegawa *et al.*, 1985) with the molecular clock enforced, using PAUP version 4.0b8. Using the estimated topology, all possible root positions were evaluated under a single-rate dated-tips (SRDT) model with the computer software TipDate v1.2 and the root that yielded the highest likelihood was adopted (Rambaut, 2000). The program provided an ML estimate of the rate and also the associated date of the most recent common ancestor of the sequences, using a model that assumed a constant rate of nucleotide substitution. The molecular clock was tested by a likelihood-ratio test between the SRDT model and a general unconstrained branch-length model [different-rate (DR) model].

For estimates of demographic history, a non-parametric function $N(t)$, also known as a skyline plot, was obtained by transforming the coalescent intervals of an observed genealogy into a piecewise plot that represented an effective population size through time (Pybus *et al.*, 2001; Pybus & Rambaut, 2002). A parametric ML was estimated by several models with the computer software GENIE v3.5 to build a statistical framework for inferring the demographic history of a population on phylogenies reconstructed from sampled DNA sequences (Pybus & Rambaut, 2002). This model assumes a continuous epidemic process in which the viral transmission parameters remain constant through time. Model fitting was evaluated by likelihood-ratio tests of the parametric ML estimates (Lemey *et al.*, 2003; Pybus *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2005). Approximate 95 % confidence intervals for the parameters were estimated by using the likelihood-ratio test statistics.

A phylogenetic tree in the partial RNA polymerase region of the HEV genome is represented in Fig. 1. A functional gene, such as the RNA polymerase gene, is suitable for molecular-evolutionary analyses based on the neutral theory, because the substitution of functional genes is based on the neutral theory. The 24 genotype 3 and 24 genotype 4 strains in Japan

showed a significant cluster with a high bootstrap value, which was the major Japanese cluster distinct from other strains found in foreign countries by molecular-evolutionary analyses. Such a significant cluster is suitable for the following coalescent analysis. Additionally, the tree topology based on the RNA polymerase region, including functional genes, was quite similar to that based on complete genomes (data not shown).

To determine the evolutionary rate of HEV, the 48 Japan-indigenous HEV strains (Fig. 1) were subjected to further molecular-evolutionary analyses. The molecular-evolutionary rate was estimated by two independent methods. In brief, linear-regression analyses using highly similar strains, i.e. six genotype 3 strains in Hyogo and four genotype 4 strains in Sapporo, indicated that a molecular-evolutionary rate was $(0.81\text{--}0.88) \times 10^{-3}$ nucleotide substitutions per site per year (Fig. 2). Second, TipDate (v1.2) was used to compare the DR model with the single-rate (SR) and SRDT models. The SRDT model provided an adequate fit to the data ($P > 0.05$; see Supplementary Table S1, available in JGV Online). Based on the SRDT model, the mean rate of nucleotide substitutions was estimated to be $(0.81\text{--}0.94) \times 10^{-3}$ nucleotide

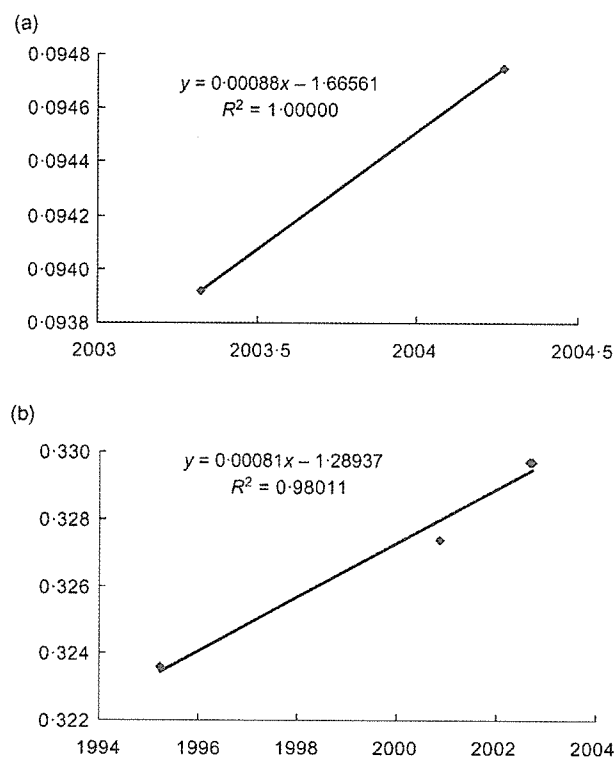


Fig. 2. Linear-regression analyses within the partial RNA polymerase region for evolutionary rate of HEV. (a) The evolutionary rate of genotype 3 in the Hyogo cluster is estimated to be 0.88×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year; (b) the evolutionary rate of genotype 4 in the Sapporo cluster is estimated to be 0.81×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year.

substitutions per site per year, which was similar to the rate for *Hepatitis C virus* (Ina *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2002). When we used 0.84×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year, which was based on all 48 sequences (24 genotype 3 and 24 genotype 4), the time of the most recent common ancestor of Japan-indigenous genotype 3 was estimated to be in the 1900s (95% confidence interval, 1902–1917) and that of genotype 4 was approximately in the 1880s (1881–1898) (Fig. 1).

Based on the phylogenetic tree, the effective number of HEV infections through time, $N(t)$, was analysed by using a skyline plot for the Japan-indigenous HEV strains. The parameters for several models in GENIE v3.5 were examined (see Supplementary Table S2, available in JGV Online). Time t was then transformed to year by using the constant rate (0.84×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year), assuming the collecting time to be the present. Fig. 3 shows the skyline plots and population growth for the HEV strains, according to a specific demographic model in GENIE v3.5 with three parameters and a piecewise-expansion growth model, which was evaluated by likelihood-ratio testing (Ina *et al.*, 1994; Lemey *et al.*, 2003; Pybus *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2005). Our estimates of the effective numbers of HEV infections showed a transition from constant size to exponential growth in the 1920s (95% confidence interval, 1916–1930) among the genotype 3 population (Fig. 3a), whereas the rapid exponential growth among the genotype 4 population was dated in the 1980s (1978–1990) (Fig. 3b).

Because the natural course of HEV infection in human beings and animals is usually transient, not persistent as in the cases of hepatitis B and C viruses, it is almost impossible to estimate the molecular-evolutionary rate of HEV by using serial samples from an individual host. However, even though HEV does not persist in individual hosts, it could persist in the community by hopping from host to host successively. The first study attempting to estimate the number of synonymous mutations per synonymous site (k_s) of *Hepatitis A virus* (HAV) was reported by Sánchez *et al.* (2003). The estimated k_s values from HAV strains isolated from a clam-associated outbreak varied from 0.038 for VP0 to 0.29 for VP1. Similarly, we estimated the evolutionary rate of HEV by using Japan-indigenous genotype 3 and genotype 4 strains isolated over time. The rate was estimated to be approximately 0.8×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year by two independent methods, which was around half of our previously estimated rate (Takahashi *et al.*, 2004b). One of the reasons is that the molecular-evolutionary rate would depend on estimated genes; the previous report (Takahashi *et al.*, 2004b) used complete sequences, whereas this study used only RNA polymerase sequences. Another reason is that the previous extrapolation of substitution rate on pairwise (direct) comparisons can give overestimates of the molecular clock and hence divergent times of HEV species, as reported previously (Ina *et al.*, 1994). Based on the molecular clock, we traced the demographic history of HEV in Japan and the indigenization time

was suggested to be similar (approx. 1900), but the spread time was quite different, between HEV genotypes 3 and 4 (1920s versus 1980s). Interestingly, in addition, the evolutionary growth of genotype 3 has been quite slow since the 1920s, whereas genotype 4 strains have spread rapidly in Sapporo since the 1980s.

Zoonosis has been implicated in HEV transmission. The first animal strain of HEV to be isolated and characterized was a swine HEV from a pig in the USA in 1997 (Meng *et al.*, 1997). Since then, many swine HEV strains, which exhibit extensive genetic heterogeneity, have been identified worldwide and shown to be genetically related closely to strains of human HEV (Chandler *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Recent findings suggested an interspecies HEV transmission between boar and deer in their wild life (Takahashi *et al.*, 2004a) and that both animals might serve as an infection source for human beings. More recently, wild mongoose was newly added to the list of HEV-reservoir animals in Japan

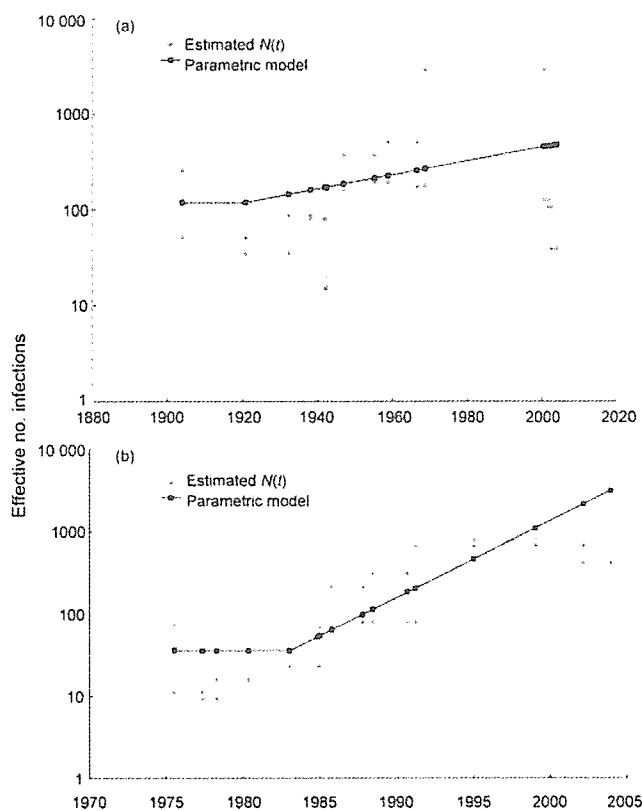


Fig. 3. ML estimates of $N(t)$ on the effective number of (a) HEV genotype 3 and (b) HEV genotype 4 infections in Japan. The parametric model is indicated by the black line and step-wise plots by the grey line, which represents corresponding non-parametric estimates of $N(t)$ (number as a function of time). Genetic distances have been transformed into a time scale of years by using estimates of the molecular clock in the partial RNA polymerase region of HEV.

(Nakamura *et al.*, 2006). Notwithstanding the importance of these wild animals, pigs for food must be the major reservoirs of HEV: a recent Japanese study indicated that anti-HEV antibodies were detected in 1448 (58 %) of 2500 pigs from 2 to 6 months of age at 25 commercial swine farms in Japan (Takahashi *et al.*, 2003). The importance of transmission of HEV from pigs to humans was further supported by a recent field study in Indonesia: Muslim people, for whom it is a taboo to eat or contact pigs, were significantly less frequently positive for anti-HEV than Hindu people (2.0 vs 20 %) (Surya *et al.*, 2005).

Our molecular-evolutionary analyses suggested that HEV entered Japan around 1900. If we have traced the origin of Japan-indigenous HEV correctly back to about 100 years ago, what happened at that time in relevance to HEV's indigenization? Several kinds of Yorkshire pig were imported for the first time in the history of Japan from the UK in 1900, by the Japanese government's policy to introduce excellent domestic animals for food in Western countries to Japan, as a measure to nutritionally strengthen the people (especially soldiers) of this formerly vegetarian country. Since then, the Yorkshire pigs have been propagated in Japan and, in the 1930s, thousands of pigs were reported all over Japan (<http://okayama.lin.go.jp/history/2-3-1-2.htm>), suggesting that the domestic spread of HEV might have been associated with the popularization of pigs for food in Japan. Indeed, a previous phylogenetic analysis of a 304 bp nucleotide sequence (ORF2) obtained from the two UK swine strains showed a close relationship with Japanese swine strains in genotype 3 (Banks *et al.*, 2004), indicating that Japanese genotype 3 may have been imported from the UK. On the other hand, Japanese genotype 4 strains were related phylogenetically to Asian strains in Taiwan and China. As the HEV found in wild boars living in the Iriomote Island, near Taiwan, was of genotype 4 (unpublished results), the source of Japanese genotype 4 might be from Taiwan or the mainland of China. Note that a phylogenetic analysis showed that the Japanese swine and human HEV strains segregated into four clusters [three genotype 3 clusters (one major Japanese and two minor clusters) and one genotype 4 cluster], with the highest nucleotide identity being 94.4–100 % between swine and human strains in each cluster (Takahashi *et al.*, 2003), suggesting that swine have served as one of the most important reservoirs for HEV to be transmitted to humans. The possible risk factor for transmission of HEV was to have eaten uncooked or undercooked pig liver and/or intestine 1–2 months before the onset of hepatitis E in Hokkaido, Japan (Mizuo *et al.*, 2005). Such eating habits, which are particularly unique to those living in Hokkaido (Sapporo is one of the big cities there) in recent decades, might be one of the reasons that HEV has been widespread in this area since 1990, as supported by our molecular-evolutionary analyses in this study.

In conclusion, based on our present data, the indigenization and domestic spread of HEV in Japan are proposed to have been associated with the importation and popularization of

pigs for food in Japan. However, there still remains a possibility of different scenarios. Another animal(s) might have carried the virus to Japan: for example, mongoose was imported from India to Japan in 1910 (Nakamura *et al.*, 2006).

Acknowledgements

Contributions of authors are as follows: Y. T. performed molecular-clock analyses and wrote the manuscript; K. T. amplified and sequenced viral isolates; E. O. helped Y. T. with the molecular-clock analyses; Y. K., J.-H. K., K. S., A. M., A. H., H. M., H. S., Y. A. and T. K. provided HEV RNA-positive sera to K. T. for sequence determinations; M. M. supervised the molecular-clock analyses; and S. M. designed the study and helped Y. T. to write the manuscript. This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (200400676A) and from the United States–Japan Collaborative Medical Science Program (Hepatitis Panel). We greatly appreciate Dr Oliver G. Pybus (Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK) for his enlightening advice on molecular-evolutionary analyses using GENIE v3.5.

References

- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J. & Dalton, H. (2004). Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* **10**, 953–955.
- Chandler, J. D., Riddell, M. A., Li, F., Love, R. J. & Anderson, D. A. (1999). Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* **68**, 95–105.
- Harrison, T. J. (1999). Hepatitis E virus – an update. *Liver* **19**, 171–176.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* **22**, 160–174.
- Hsieh, S.-Y., Meng, X.-J., Wu, Y.-H., Liu, S.-T., Tam, A. W., Lin, D.-Y. & Liaw, Y.-F. (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* **37**, 3828–3834.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2002). Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* **40**, 1326–1332.
- Ina, Y., Mizokami, M., Ohba, K. & Gojbori, T. (1994). Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* **38**, 50–56.
- Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J. B., Elm, J. & 7 other authors (1999). Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 331–335.
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M. & Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6588–6592.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K. & Mishiroy, S. (2003). Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* **188**, 944.
- Meng, X.-J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9860–9865.

- Meng, X.-J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714–9721.
- Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U. & Purcell, R. H. (2002). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 40, 117–122.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2005). 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.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M. & Mishiro, S. (2006). Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* (in press).
- Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y. & Okamoto, H. (2003). Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *J Gen Virol* 84, 1245–1251.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U. & Yoshikawa, A. (2001). Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 929–936.
- Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2001). Hepatitis E virus. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 3051–3061. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pybus, O. G. & Rambaut, A. (2002). GENIE: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics* 18, 1404–1405.
- Pybus, O. G., Charleston, M. A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E. C. & Harvey, P. H. (2001). The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 292, 2323–2325.
- Pybus, O. G., Drummond, A. J., Nakano, T., Robertson, B. H. & Rambaut, A. (2003). The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 20, 381–387.
- Rambaut, A. (2000). Estimating the rate of molecular evolution: incorporating non-contemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. *Bioinformatics* 16, 395–399.
- Sánchez, G., Bosch, A. & Pintó, R. M. (2003). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol* 77, 452–459.
- Surya, I. G. P., Kornia, K., Suwardewa, T. G. A., Mulyanto Tsuda, F. & Mishiro, S. (2005). 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* 75, 499–503.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., Gotanda, Y., Iita, T., Tsuda, F. & Okamoto, H. (2003). Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84, 851–862.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N. & Mishiro, S. (2004a). Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330, 501–505.
- Takahashi, K., Toyota, J., Karino, Y., Kang, J.-H., Maekubo, H., Abe, N. & Mishiro, S. (2004b). Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 29, 212–215.
- Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., Inoue, O., Mawatari, F. & Ishibashi, H. (2004). Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 40, 869–870.
- Tanaka, Y., Hanada, K., Mizokami, M., Yeo, A. E. T., Shih, J. W.-K., Gojobori, T. & Alter, H. J. (2002). A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15584–15589.
- Tanaka, Y., Hanada, K., Orito, E. & 8 other authors (2005). Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan. *J Hepatol* 42, 47–53.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K. & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Wang, Y.-C., Zhang, H.-Y., Xia, N.-S. & 11 other authors (2002). Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 67, 516–521.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y. & Okamoto, H. (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.

<Editorial>

我が国に於ける E 型肝炎の現況

岡本 宏明

索引用語： E 型肝炎 E 型肝炎ウイルス 人獣共通感染症 食感染 遺伝子型

はじめに

E 型肝炎ウイルス (HEV) は主として肝臓で増殖し、胆管を經由して腸管に排出され、糞便とともに体外に放出されることから、不備な衛生環境下では糞口 (fecal-oral) ルートによる感染が成立・拡大しうる。そのため、アジア、アフリカおよび中米の熱帯・亜熱帯地域では、風土病的疾患として、河川の氾濫などによる水系感染 (water-borne transmission) に伴う大小様々な規模の流行性 E 型肝炎が、これまでに繰り返し発生してきた。発展途上国では現在でもなお、E 型肝炎は医学的、公衆衛生学的、社会的に重要な問題の一つである。一方、日米欧等の先進諸国での E 型肝炎は、稀な「輸入感染症」の一つであると理解され、最近まで殆ど注目されていなかった。ところが、Kwo ら¹⁾は、流行地への渡航歴がない急性肝炎患者 (米国在住の 62 歳白人男性：1995 年発症) から新種の HEV (US1 株) が分離されたことを 1997 年発行の雑誌 *Mayo Clinic Proc* に発表した。それが契機となって、先進国での E 型肝炎は、必ずしも輸入感染のみならず、渡航歴のない患者での「国内感染型」もあることが次第に明らかになった。我が国でも 2001 年以降、輸入感染によらない散発性 E 型肝炎症例の存在が認識され²⁾³⁾、国内の飼育ブタで HEV 感染が蔓延していることが明らかになるとともに⁴⁾、ブタや野生動物の肉・内臓摂食後の E 型肝炎発症事例が相次いで報告され⁵⁾⁶⁾、重症化例や劇症肝炎による死亡例の存在もあって⁷⁾、「人獣共通感染症 (zoonosis)」としての E 型肝炎がこの 5~6 年の間に急速に注目を集めることになった。実際、本誌にも症例報告や短報、あるいは速報としてこれまでに少なくとも 10 編の論文に 23 例の「国内感染型」E 型肝炎症例が紹介されている^{8)~17)}。しかしながら、我が国に於ける E 型肝炎の大規模な実態調査報告はこれまでになかった。その意味で、我が国に於ける HEV 感染 254 例の集計・解析結果を報告し

た本号の阿部ら¹⁸⁾の成績は貴重である。

我が国に於ける土着 HEV 感染の認識

HEV は約 100 年前に富国強兵政策の一環として軍人に体力を付けるため英国から輸入したブタによって国内に持ち込まれ、肉食文化の普及とともに全国に拡大し、土着化したらしいと推測されているが¹⁹⁾、患者の保存血清を用いた解析によって、ウイルス学的に存在が実証されているのは 20 数年前の感染事例である。Aikawa ら²⁰⁾は、1982 年に原因不明 (非 A 非 B 型) の急性肝炎を発症した水戸在住の 38 歳男性患者の保存血清から土着株と考えられる 3 型 HEV を分離した。また、Mitsui ら²¹⁾は、1979 年と 1980 年の 2 例の透析患者での不顕性 HEV 感染の存在と 3 型土着 HEV 株の同定について報告している。興味深いことに、1979 年の感染が確認された症例は輸血感染例であり、保存されていた 2 本のパイロットのうち 1 本から患者の HEV と 100% 一致する HEV が分離され、当時既に輸血による HEV 感染があったことの直接証拠を示す貴重な 1 例である。Balan 等²²⁾が、中央アジアで飲料水を介して集団感染した急性期の患者糞便抽出液を実験的に飲んだのち、患者回復期血清を用いた免疫電顕法によって、自らの便中から A 型肝炎ウイルスとは異なる流行性肝炎ウイルス粒子を初めて同定したのが 1983 年のことであるが、それ以前に我が国に既に土着 HEV が存在していたのである。

我が国に於ける HEV 感染の実態把握の現状

E 型肝炎は、2003 年 11 月 5 日より施行されている改正感染症法 (感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律) に於いて 4 類感染症に分類されており、第 12 条の規定により、「診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断がなされたものについて、直ちに最寄りの保健所長を經由して都道府県知事へ届け出なくてはならない」とされている。報告件数を公表している国立感染症研究所感染症情報センターの Web site (<http://idsc.nih.gov.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>) にア

クセスし、感染症報告数一覧（その 1：全数把握）で 4 類感染症のなかの E 型肝炎について見てみると、7 月 24 日現在、1999 年から 2005 年までの報告数が記載されている。しかし、1999 年と 2001 年は「ゼロ」、2000 年は 3 件、2002 年は 16 件、そして 2003 年以降年ごとに 30 件、37 件、41 件と徐々に増えているが、これら全体を合計しても 127 件であり、阿部ら¹⁸⁾の今回の報告数の約半数に過ぎない。これら感染症情報センターでの把握例と阿部ら¹⁸⁾の 254 例とがどの程度重複しているのかは不明であるが、全数把握の難しさが伺える。これを解決するためには、届け出義務の周知徹底が重要であり、さらに急性肝炎症例について全数 HEV マーカーを測定できるような環境が整うこと、すなわち保険適用になった検査試薬が一日も早く使えるようになることが重要である。

国立遺伝学研究所のデータバンク (DDBJ/GenBank/EMBL databases) に登録されている HEV 配列データから感染事例数を推測できる。本年 6 月末現在での我が国のヒト由来 HEV 株の登録数は 177 件 (genotype 1 [n=3], genotype 3 [n=83], genotype 4 [n=91]) である。E 型肝炎患者について、確定診断が下されたあと、研究目的で塩基配列を決定し国立遺伝学研究所のデータバンクに登録するという作業は一部の症例についてのみなされているものと推測されることから、登録件数が阿部ら¹⁸⁾が報告した症例数 254 よりも少ないのは止むを得ないであろう。しかし、そういう制約があるなかでも、我が国での「国内感染型」E 型肝炎症例由来 HEV 株は、諸外国に較べると桁違いに多い。ちなみに、本年 6 月末現在での登録数はオランダの 24 件、英国の 14 件、スペインの 9 件、アルゼンチンの 5 件、米国の 3 件等に過ぎない。

我が国に於ける HEV 感染の動向

我が国での E 型肝炎が最近増加傾向にあるのか、それとも過去に較べて大きく変わっていないのか、その動向は興味のあるところであるが、残念ながら阿部ら¹⁸⁾の論文ではそれについて言及されていない。矢野ら²³⁾は、定点観測により、感染例数が近年増加傾向にあるか否かについて否定的な報告をしている。すなわち、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 1980 年から 2005 年までの 26 年間に集積された血清を解析し、非 A 非 B 非 C 型急性肝炎の 3.8% (30/789) が E 型肝炎と診断されたこと、そして E 型肝炎発生率の年次推移は 0~13% (年平均 1.2 例) で、1990 年以降も同様の傾向 (年平均 1.1 例) であったことから、E 型肝炎

は国内で少数ながら持続的に、散発的発生を繰り返してきていると結論している。しかし、その調査には国内で E 型肝炎発生数が多いことが判明している北海道や岩手県が含まれていない。手稲溪仁会病院と札幌厚生病院の症例を集計している前久保らの報告²⁴⁾と、勤医協中央病院とその道内関連病院および小林病院 (北見市) の症例を集計している水尾らの報告²⁵⁾を総合すると、北海道での E 型肝炎患者数は、1994 年から 2000 年の 7 年間で合計 18 例 (年平均 2.6 例) であったのに対し、2001 年と 2002 年にそれぞれ 17 例、2003 年に 14 例、2004 年と 2005 年にそれぞれ 7 例であった。2000 年以前はまだ我が国での「国内感染型」E 型肝炎の存在が認識されていなかった時期であり、retrospective に把握できる E 型肝炎患者数は検体保存状況に大きく依存していることから、単純には比較できないと思われるが、1998 年以降の遡及調査が共通に可能であった手稲溪仁会病院と札幌厚生病院、勤医協中央病院の 3 施設での E 型肝炎患者数の合計が 1998 年に 4 例、1999 年に 2 例、2000 年に 5 例であったのに対して、2001 年と 2002 年にはそれぞれ 16 例、12 例へと急増している。また、岩手県でも遡及調査が可能であった 1998 年から 2000 年までの 3 年間ではわずか 2 例 (0.7 例/年) に過ぎなかったが、2001 年から 2005 年までの 5 年間で 13 例 (2.6 例/年) に増えている^{31,26,27)}。したがって、我が国では E 型肝炎発生数は最近、増加傾向にあると看做するのが妥当かと思われる。

我が国に於ける HEV 感染の特徴

著者らは 2002 年に、A 型肝炎ウイルスや B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの感染の証拠がなく、海外渡航歴もないことから、過去に原因不明と診断されていた 87 例の急性肝炎症例 (北海道、岩手県、福島県、東京都、山梨県の 5 施設の患者) から 11 例 (13%) の E 型肝炎患者を見出し、それら 11 例の背景を検討することにより、我が国での E 型肝炎の特徴を推測した³⁾。すなわち、男性優位 (男性 82%) および中高年優位 (40~71 歳、平均 52 歳) で、地域的偏りが見られる (北海道と岩手県に多い) という傾向である。この 2002 年の報告以降、症例の蓄積により、急性肝炎や急性肝炎重症型、劇症肝炎を含む顕性 HEV 感染 (E 型肝炎) 88 例の特徴²⁸⁾として、i) 年齢は 25 歳から 86 歳に分布するが (平均 56 歳)、50 歳以上の患者が約 70% を占めること、ii) 男性優位 (約 80%)、iii) 患者は北海道から沖縄まで全国に遍在するが、地理的分布には顕著な偏りがあり、北海道在住の患者が全体の 43% を占め、次い

で、東北・関東地方に多いこと、iv) 大多数は比較的短期間のうちに軽快治癒するが、劇症肝炎による死亡例や、黄疸遷延や血液凝固能異常(プロトロンビン活性: 40% 以下)を示す重症化例が少なからず認められること、v) A 型肝炎と異なり、患者発生時期に季節的な偏りが認められないこと、などを列記してきた。また、北海道以外の地域では 3 型 HEV の感染患者が圧倒的多数を占め、北海道では 4 型 HEV が過半数を占めるという遺伝子型分布の地域性も明らかにできた²⁸⁾。これらの特徴と、阿部ら¹⁸⁾の 172 例の顕性 HEV 感染例についての解析結果はよく符号している。興味深いことに、先進国での「国内感染型」E 型肝炎が中高年の男性に多いという特徴は、英国やフランスからも報告されている²⁹⁾³⁰⁾。

インドやネパールなどの E 型肝炎の流行地域 (1 型 HEV の侵淫地域) では、妊婦がとくに妊娠第 3 期に HEV に感染した場合、15-25% が劇症肝炎により死亡することが知られているが、わが国の E 型劇症肝炎による死亡例の大多数は中高年の男性で⁶⁾⁷⁾¹²⁾³¹⁾、これまでに妊婦の E 型劇症肝炎例は 1 例も経験されていない。重症化には、高齢であることや、生活習慣病や肝疾患などの基礎疾患の存在などの宿主側の因子も重要であるが、HEV 遺伝子型と肝炎重症度との相関は注目に値する。わが国では 3 型 HEV の感染患者の方が多くにも拘わらず、E 型劇症肝炎患者では 4 型が優位であること、さらに 3 型 HEV 感染例に比べて 4 型 HEV 感染例の方が、初診時、あるいはピーク時の総ビリルビン値やトランスアミナーゼ値が有意に高く、経過中のプロトロンビン活性の最低値は 4 型 HEV 感染例の方が有意に低いことから、遺伝子型 4 と肝炎重症化との関連性が示唆されている²⁵⁾。加えて、阿部ら¹⁸⁾が指摘するように、4 型 HEV の頻度が不顕性感染群 (12% [7/59]) から急性肝炎群 (37% [48/130])、重症肝炎群 (急性肝炎重症型と劇症肝炎を含む) (23/31 [74%]) の順に有意差をもって上昇していたことは 4 型 HEV と肝炎重症化との関連性を強く示唆するものである。HEV ゲノムの 5' 末端から 3148 番目の塩基が U (ウラシル) に置換された 4 型 HEV が、「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」¹⁴⁾を含め、急性肝炎患者よりも劇症肝炎患者から有意に多く分離されている³²⁾。ウイルス側から見た重症化機序の解明は今後の HEV 研究の重要なテーマの一つである。

我が国の E 型肝炎患者における HEV の 感染源・感染経路

E 型肝炎が人獣共通感染であることに異論を唱える人

はもはやいない。我が国の飼育ブタでは HEV 感染が全国的に蔓延状況にあること⁴⁾³³⁾³⁴⁾、E 型肝炎患者が居住する地域の食料品店で販売されていた生の食用ブタ肝臓の 1.9% (7/363) から HEV RNA が検出されたこと⁶⁾、野生のイノシシでも HEV 感染が広く認められ^{31)~39)}、地域によっては HEV 抗体陽性率が 25.5% (100/392) に達し、約 3% に相当する 12 頭の野生イノシシから HEV RNA が検出されること⁴⁰⁾、など動物宿主での HEV 感染が明らかになっている。また、我が国では、ブタや野生のイノシシ、シカなどの動物の肉や内臓を摂食したあとの E 型肝炎発症事例があり⁵⁾⁶⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾²⁵⁾²⁷⁾、食物を介しての HEV 感染、あるいは濃厚な接触による感染が強く疑われている。北海道では E 型肝炎の患者数が国内で最も多いことは先に述べたが、その北海道の E 型肝炎患者では、ブタ内臓肉を生、あるいは加熱不十分な状態で喫食し、感染したと推測される患者が 93% (27/29) を占めており²⁵⁾、北見市の焼肉店での集団感染の事例も報告されている¹²⁾。また、金光は⁴¹⁾、HEV-NAT スクリーニングで HEV RNA 陽性と判定された北海道内の献血者 30 名に対して、過去 3 カ月間の喫食歴に関するアンケート調査を実施したところ、回答があった 21 名中 19 名 (90%) が献血前に動物内臓肉を食しており、内臓肉摂取と HEV 感染との因果関係が強く示唆されたと報告している。Zoonotic food-borne transmission によって HEV 感染動物から感染するというルートのほか、これまでに確認されているものに、稀な頻度ではあるが輸血感染がある²¹⁾²⁴⁾⁴²⁾。動物からの感染と輸血による感染が確認されたとは言え、阿部ら¹⁸⁾が指摘するように、我が国での「国内感染型」E 型肝炎症例のなかで感染源や感染経路を特定あるいは推定できていない症例は少なくない。特に北海道以外の地域で、したがって、解明に向けてのさらなる研究が重要である。

おわりに

今や、E 型肝炎は世界に遍在し、我が国でも身近な疾患である。2001 年以降、我が国での「国内感染型」E 型肝炎の存在を認識してからは、本来 real-time および prospective な調査に基づく患者発生動向を把握できるはずであり、さらに 2003 年 11 月 5 日に改正感染症法が施行されてからは、より厳密な把握が可能になっているはずであるが、現実には真の実態把握には至っていない。そのような状況のもとでの、本号の阿部らのはじめての全国集計報告¹⁸⁾は、学術的な価値は言うまでもなく、実態把握とさらなる感染源・感染経路の解明の必要性を読者諸氏に強くアピールする時宜を得た報

告である。

本 Editorial を書く機会を与えて下さった三代俊治編集長に深謝するとともに、保険適用になった HEV 抗体や HEV RNA の検査試薬が一日も早く臨床現場に登場し、真の意味の全数把握が可能となり、感染源および感染経路の解明がさらに進展することを切に望むものである。

文 献

- 1) Kwo P, Schlauder GG, Carpenter HA, et al. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 1133—1136
- 2) Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, et al. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 2001; 287: 9—12
- 3) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3209—3218
- 4) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 929—936
- 5) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371—373
- 6) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. 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* 2003; 84: 2351—2357
- 7) Suzuki K, Aikawa T, Okamoto H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N Engl J Med* 2002; 347: 1456
- 8) 佐藤 慎, 井戸健一, 磯田憲夫, 他. 海外渡航歴のない E 型急性肝炎の 1 例. *肝臓* 2002; 43: 332—335
- 9) 姜 貞憲, 吉田晴恒, 桜井康雄, 他. 原因が不明または特定困難であった劇症肝炎症例 E 型急性肝炎重症型の 1 例. *肝臓* 2002; 43: 597—598
- 10) 渡邊尚子, 岩田滉一郎, 中尾國明, 他. E 型肝炎ウイルス日本土着株に感染し発症したと推定される急性肝炎の 1 例. *肝臓* 2003; 44: 80—84
- 11) 齊藤奈津子, 土山寿志, 大森俊明, 他. 北陸地方で確認された散発性 E 型急性肝炎の 1 例. *肝臓* 2004; 45: 268—273
- 12) 加藤 将, 種市幸二, 松林圭二. 焼肉店での会食後に発生した E 型肝炎ウイルス集団感染. *肝臓* 2004; 45: 688
- 13) 新井雅裕, 橋本直明, 宮川 浩, 他. 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—225
- 14) 高橋和明, 岡田克夫, 姜 貞憲, 他. 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—390
- 15) 岩室雅也, 川口光彦, 寺田 亮, 他. 薬剤性肝障害との鑑別が問題となった E 型急性肝炎の例. *肝臓* 2005; 46: 512—515
- 16) 織田 聡, 新敷吉成, 清水幸裕, 他. 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—652
- 17) 藤山洋一, 山岸由幸, 菊池真大, 他. 人工肝補助療法を施行し救命し得た E 型劇症肝炎の 1 例. *肝臓* 2005; 46: 681—682
- 18) 阿部敏紀, 相川達也, 赤羽賢浩, 他. 本邦に於ける E 型肝炎ウイルス感染の統計的・疫学的・ウイルス学的特徴: 全国集計 254 例に基づく解析. *肝臓* 2006; 46: 384—391
- 19) Tanaka Y, Takahashi K, Orito E, et al. Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. *J Gen Virol* 2006; 87: 949—954
- 20) Aikawa T, Kojima M, Takahashi M, et al. Identification of indigenous hepatitis E virus from a Japanese patient who contracted sporadic acute hepatitis in 1982. *J Infect Dis* 2002; 182: 1535—1536
- 21) Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol* 2004; 74: 563—572
- 22) Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20: 23—31
- 23) 矢野公士. 本邦の非 ABC 型肝炎に占める E 型肝炎の位置付け. 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. 平成 17 年度総括研究報告書 (主任研究者: 三代俊治). 平成 18 年 4

- 月. p49—52
- 24) 前久保博士. 輸血により感染発症した E 型肝炎急性症例の検討. 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. 平成 17 年度総括研究報告書 (主任研究者 : 三代俊治). 平成 18 年 4 月. p41—43
- 25) Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, et al. 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* 2005; 76: 341—349
- 26) 鈴木一幸. 岩手県における E 型肝炎の最近の動向. 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. 平成 17 年度総括研究報告書 (主任研究者 : 三代俊治). 平成 18 年 4 月. p22—25
- 27) Sainokami S, Abe K, Kumagai I, et al. Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 2004; 39: 640—648
- 28) 岡本宏明. E 型肝炎の現況. *日本内科学会雑誌* 2006 ; 95 : 137—143
- 29) Ijaz S, Arnold E, Banks M, et al. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 2005; 192: 1166—1172
- 30) Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 2004; 74: 419—424
- 31) Matsuda H, Okada K, Takahashi K, et al. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003; 188: 944
- 32) Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J Med Virol* 2006; 78: 476—484
- 33) Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, et al. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 851—862
- 34) Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, et al. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 2005; 86: 1807—1813
- 35) Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5371—5374
- 36) Takahashi K, Kitajima N, Abe N, et al. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004; 330: 501—505
- 37) Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, et al. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 2005; 86: 3321—3326
- 38) Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, et al. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 2004; 40: 869—870
- 39) Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1958—1960
- 40) 道堯浩二郎. 愛媛県におけるイノシシの感染状況に関する実態調査. 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. 平成 17 年度総括研究報告書 (主任研究者 : 三代俊治). 平成 18 年 4 月. p20—21
- 41) 金光公浩. 献血者集団における HEV 感染の実態解明. 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. 平成 17 年度総括研究報告書 (主任研究者 : 三代俊治). 平成 18 年 4 月. p36—40
- 42) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004; 44: 934—940

<原 著>

本邦に於ける E 型肝炎ウイルス感染の統計学的・疫学的・ ウイルス学的特徴：全国集計 254 例に基づく解析

阿部 敏紀¹⁾ 相川 達也²⁾ 赤羽 賢浩³⁾ 新井 雅裕⁴⁾ 朝比奈靖浩⁵⁾
 新敷 吉成⁶⁾ 茶山 一彰⁷⁾ 原田 英治⁸⁾ 橋本 直明⁹⁾ 堀 亜希子¹⁰⁾
 市田 隆文¹¹⁾ 池田 広記¹²⁾ 石川 晶久¹³⁾ 伊藤 敬義¹⁴⁾ 姜 貞憲¹⁵⁾
 狩野 吉康¹⁶⁾ 加藤 秀章¹⁷⁾ 加藤 将¹⁸⁾ 川上 万里¹⁹⁾ 北嶋 直人²⁰⁾
 北村 庸雄²¹⁾ 正木 尚彦²²⁾ 松林 圭二²³⁾ 松田 裕之²⁴⁾ 松井 淳²⁵⁾
 道堯浩二郎²⁶⁾ 三原 弘²⁷⁾ 宮地 克彦²⁸⁾ 宮川 浩²⁹⁾ 水尾 仁志³⁰⁾
 持田 智³¹⁾ 森山 光彦³²⁾ 西口 修平³³⁾ 岡田 克夫³⁴⁾ 齋藤 英胤³⁵⁾
 佐久川 廣³⁶⁾ 柴田 実³⁷⁾ 鈴木 一幸³⁸⁾ 高橋 和明⁴⁾ 山田剛太郎³⁹⁾
 山本 和秀⁴⁰⁾ 山中 太郎⁴¹⁾ 大和 弘明⁴²⁾ 矢野 公士⁴³⁾ 三代 俊治^{4)*}

要旨：極く最近まで殆んど不明状態にあった我国の E 型肝炎の実態を明らかにする目的で、我々は全国から総数 254 例の E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染例を集め、統計学的・疫学的・ウイルス学的特徴を求めてこれを解析した。その結果、[i] HEV 感染は北海道から沖縄まで全国津々浦々に浸透していること；[ii] 感染者の多くは中高年（平均年齢約 50 歳）で、且つ男性優位（男女比約 3.5 対 1）であること；[iii] 我国に土着している HEV は genotype 3 と genotype 4 であるが、後者は主に北海道に偏在していること；[iv] 年齢と肝炎重症度との間に相関があること；[v] Genotype 3 より genotype 4 による感染の方が顕性化率も重症化率も高いこと；[vi] 発生時期が無季節性であること；[vii] 集積症例全体の約 30% は動物由来食感染、8% は輸入感染、2% は輸血を介する感染に帰せしめ得たものの、過半の症例（約 60%）に於いては感染経路が不明のままであること；等の知見を得た。

索引用語： E 型肝炎 E 型肝炎ウイルス 疫学 日本

1) 一心病院, 2) 相川内科病院, 3) 甲府市立甲府病院, 4) 東芝病院, 5) 武蔵野赤十字病院, 6) 富山大学三内, 7) 広島大学分子病態制御内科, 8) 国立療養所東京病院, 9) 東京通信病院, 10) 国保中央病院, 11) 順天堂大学静岡病院, 12) 関西医大三内, 13) 日立総合病院, 14) 昭和大学二内, 15) 手稲溪仁会病院, 16) 札幌厚生病院, 17) 豊川市民病院, 18) 北海道大学二内, 19) 鳥取大学二内, 20) 市立加西病院, 21) 順天堂大学浦安病院, 22) 国立国際医療センター, 23) 北海道赤十字血液センター, 24) 松田内科医院, 25) 至聖病院, 26) 愛媛大学三内, 27) 高岡市民病院, 28) 大阪医大二内, 29) 帝京大学溝口, 30) 勤医協中央病院, 31) 埼玉医大消化器肝臓内科, 32) 日本大学消化器肝臓内科, 33) 兵庫医大肝胆膵科, 34) 鳥取県立中央病院, 35) 慶應大学消化器内科, 36) ハートライフ病院, 37) NTT 東日本関東病院, 38) 岩手医大一内, 39) 川崎医大川崎病院, 40) 岡山済生会総合病院, 41) 板橋中央総合病院, 42) 北見赤十字病院, 43) 国立病院機構長崎医療センター

*Corresponding author: shunji.mishiro@potoshiba.co.jp

<受付日2006年5月10日><採択日2006年6月26日>

Table 1 Remarkable predominance of male over female, irrespective of severity of the disease.

Gender	Total n = 243	Disease categories			
		Subclinical n = 71	AH ^a n = 135	ASH ^a n = 21	FH ^a n = 16
Female	55 (23%)	18 (34%)	29 (21%)	4 (19%)	4 (25%)
Male	188 (77%)	53 (66%)	106 (79%)	17 (81%)	12 (75%)
F/M ratio	1 / 3.4	1 / 2.9	1 / 3.7	1 / 4.3	1 / 3

^aAbbreviations : AH, acute hepatitis ; ASH, acute severe hepatitis (defined by prolonged prothrombin time, i.e., PT value < 40%) ; FH, fulminant hepatitis.

Table 2 Age of the subjects, possibly influencing clinical manifestations.

Age in yrs	Total n = 242	Disease categories			
		Subclinical n = 70	AH n = 135	ASH n = 21	FH n = 16
Less than 40	63 (26%)	38 (54%) ^a	21 (16%)	3 (14%)	1 (6%)
40 to 59	105 (43%)	20 (29%)	70 (52%)	11 (53%)	4 (25%)
60 or more	74 (31%)	12 (17%)	44 (32%)	7 (33%)	11 (69%) ^b
Mean ± SD	50.1 ± 15.6	42.3 ± 15.9 ^c	52.8 ± 14.4	52.8 ± 15.6	58.9 ± 10.1 ^d

^a P < 0.001, 0.003, < 0.001 against "AH", "ASH", "FH" respectively ; ^b P = 0.010, < 0.001 against "AH", "Subclinical" (Chi square test). ^c P < 0.001, 0.009, < 0.001 against "AH", "ASH", "FH" (t test) ; ^d P = 0.047 against "AH" (Welch test).

緒 言

我国や西欧諸国は、アジア・アフリカの熱帯亜熱帯地域諸国と異なり、E型肝炎が頻発する地域ではないから、相当数の症例を集積するには時間と手間がかかる故、100例以上の症例を纏めて解析した報告は、我々の知る限り英文であれ和文であれ一報だけに存在しない。我々は、約3年の歳月をかけて、共著者の夫々が過去およびリアルタイムに経験した症例の情報と検体を持ち寄り、更にはこれに我国から学会や論文で発表された症例の情報をも追加し、2006年1月末までに総数254例の、国内で経験されたHEVヒト感染例を集積することを得た。かほどの多数例を纏めて解析した仕事は未見であるし、聊か興味深い知見も得られたので、以下にそれを報告する。

方 法

症例の任意登録

共著者の夫々が、過去及び現在進行形で経験したHEV感染例について、地域、年齢、性、発病年、発病月、病型診断(Subclinical, Acute Hepatitis, Acute Severe

Hepatitis, Fulminant Hepatitisのいずれか)、経過中最高ALT値、経過中最高総ビリルビン値、経過中最延長プロトロンビン時間値、ウイルス学的診断根拠(HEV RNA陽性、あるいはIgM抗体・IgG抗体共陽性)、HEV genotype、推定あるいは確定された感染経路、海外渡航歴の有無、等の情報を任意登録した。2006年1月末の時点で、この『任意登録』によって集積し得た症例数はn=206である。尚、HEV RNAが陽性でありながらgenotypingが未施行であった症例については、可能な限り検体の入手に努力し、sequencingを行った(方法後出)。

既報告例の引用登録

国内学会での過去の報告例については、抄録から上記調査項目に相当するデータを拾い集めた。論文発用例^{1)~16)}については、一部は、当該論文著者自身から上記調査項目に相当するデータを任意登録して貰ったが、それが不可能であった場合には論文中の記載から該当データを引用登録した。この『引用登録』によって集積し得た症例数はn=48であり、そのうち最古の症例

Table 3 Geographical distribution of HEV genotypes, showing a significant predominance of type-3 over type-4 in the areas other than Hokkaido.

Areas ^a	Total n = 228	HEV genotype			
		1	2	3	4
Hokkaido	123	—	—	58(47%)	65(53%) ^b
Tohoku	18	—	—	17(94%)	1(6%)
Kanto-Koshin'etsu	48	5(10%) ^c	—	31(65%)	12(25%)
Chuhbu-Hokuriku	8	1(9%) ^c	—	7(91%)	—
Kinki	10	1(10%) ^c	—	9(90%)	—
Chuh-Shikoku	10	1(10%) ^c	—	7(70%)	2(20%)
Kyushu-Okinawa	11	—	—	9(82%)	2(18%)

^a Japan was divided, from northeast to southwest, into 7 areas, each of which includes the following prefectures. "Hokkaido": Hokkaido alone. "Tohoku": Aomori, Iwate, Miyagi, Akita, Yamagata, and Fukushima. "Kanto-Koshin'etsu": Ibaraki, Tochigi, Gunma, Saitama, Chiba, Tokyo, Kanagawa, Shizuoka, Yamanashi, Nagano, and Niigata. "Chuhbu-Hokuriku": Toyama, Ishikawa, Fukui, Gifu, Aichi, and Mie. "Kinki": Shiga, Kyoto, Osaka, Hyogo, Nara, and Wakayama. "Chuh-Shikoku": Tottori, Shimane, Okayama, Hiroshima, Yamaguchi, Kagawa, Ehime, Tokushima, and Kochi. "Kyushu-Okinawa": Fukuoka, Saga, Nagasaki, Kumamoto, Oita, Miyazaki, Kagoshima, and Okinawa.

^b P < 0.001 against other areas (Chi square test).

^c All but one were from cases of imported infection.

Table 4 HEV genotype and clinical manifestation: the severer the disease the higher the frequency of genotype 4.

HEV genotype	Disease categories	Disease categories		
		Subclinical	AH	ASH + FH
1 (n = 7)	—	—	6	1
2 (n = 0)	—	—	—	—
3 (n = 135)	52	76	7	
4 (n = 78)	7	48	23	
Rate of type-4 ^a	7/59(12%)	48/130(37%)	23/31(74%)	

^a P < 0.001 between "Subclinical" and "AH" as well as between "AH" and "ASH+FH" (Chi square test).

は 1979 年に発生したものであった¹³⁾。

HEV genome 塩基配列解析

ORF1 内の異なる 3 領域の、それぞれ 69 nt¹⁷⁾, 326 nt¹⁸⁾, 821 nt¹⁹⁾の全てあるいは少なくとも一つの断片を PCR で増幅し, direct sequencing することにより genotype を決定した。

統計学的有意差検定

群間の比率の差や平均値の差の有意性検定の為に用いた統計学的方法は各々の Table の脚注の中に記す。

結 果

HEV 感染者の居住地

居住地情報が得られた症例の地域別内訳 (括弧内は

例数) は、北海道 (n=130), 岩手 (15), 宮城 (1), 山形 (1), 福島 (1), 茨城 (4), 栃木 (3), 群馬 (1), 埼玉 (6), 千葉 (6), 東京 (23), 神奈川 (5), 静岡 (1), 山梨 (1), 長野 (1), 新潟 (2), 富山 (3), 石川 (1), 愛知 (3), 京都 (1), 大阪 (2), 奈良 (2), 兵庫 (5), 鳥取 (4), 岡山 (4), 広島 (2), 愛媛 (2), 福岡 (1), 長崎 (12), 熊本 (1), 大分 (2), 沖縄 (3), であった。

HEV 感染者の性と年齢

性別情報不明あるいは病型情報不明であった 11 名を除いた 243 名に基づく、性差の成績を Table 1 に示す。同様に、年齢不詳あるいは病型情報不明の 12 名を除外

Table 5 Liver function test levels differed by HEV genotype.

Parameters ^a	Genotype 3			Genotype 4			P
	n	mean	SD	n	mean	SD	
peak ALT (IU/L)	101	1676	1390	75	3048	2501	< 0.001 ^b
peak T.B. (mg/dL)	80	7.1	8.6	71	11.8	8.9	0.01 ^c
nadir P.T. (%)	74	79.6	26.3	67	63.3	27.7	< 0.001 ^c

^a Abbreviations : ALT, alanine amino transferase ; T.B., total bilirubin ; P.T., prothrombin time. ^b By Welch. ^c By *t* test.

Table 6 Month when the infection occurred, suggesting that there was no seasonality.

Month	Number of cases	Adjusted number
January	20	
February	16	
March	21	20 ^a
April	37	24 ^b
May	11	
June	17	
July	20	
August	22	
September	26	21 ^c
October	17	
November	23	
December	18	

^a Of the 21 cases in March, 2 were infected simultaneously by eating the same *namaqimo* (raw liver) of wild boar²¹⁾ while the other 19 were exposed to respective infection-sources, and hence the number of independent infections should be 20, not 21 ; ^b Similarly, of the 37 cases in April, 11 were from a mini-outbreak that occurred after wild boar barbecue party²⁰⁾ and 4 were from deer-*sashimi* sharing²²⁾ ; ^c Of the 26 in September also included 6 individuals from a mini-outbreak¹⁰⁾.

した 242 名に基づく、年齢分布の成績を Table 2 に示す。男性優位、中高年優位が一見して顕著であるのみならず、不顕性感染群と顕性感染群(特に劇症肝炎群)との間に、年齢分布の顕著な有意差が認められた。即ち、高齢になるほど重症化率が高かった。逆に言えば、不顕性感染群には若年者が多く存在した。

Genotype 分布の地域差

HEV genotype が判明した 228 例について、居住地

(全国を北海道、東北、関東甲信越、中部北陸、近畿、中国四国、九州沖縄の 7 ブロックに分割)ごとの genotype 分布を Table 3 に示す。

北海道以外の地域では genotype 3 が圧倒的多数を占めたが、北海道に於いては genotype 3 と 4 がほぼ同数存在した。Genotype 1 が検出された 8 名中 7 名はインド (n=4)、バングラデシュ (2)、ネパール (1) への渡航歴を有していた。

HEV genotype と肝炎重症度との相関

Genotype 情報及び病型診断情報の両方が得られた 220 例について、病型ごとの genotype 分布を Table 4 に示す。

Genotype 4 の頻度が、不顕性感染群から急性肝炎群へ、更には重症肝炎群(急性肝炎重症型+劇症肝炎)へと有意差を以て上昇 (12%→37%→74%) していた。同様に、Table 5 に見る如く、経過中最高 ALT 値、経過中最高総ビリルビン値、経過中最延長プロトロンビン時間値のいずれもが、genotype 4 の相対的高病原性を示唆する所見を示した。

季節性

発生月が判明した 247 例の集計結果を Table 6 に示す。

4 月が突出して高い発生例数 (n=37) を示したが、そのうちの 11 例(於長崎)²⁰⁾及び 2 例(於鳥取)²¹⁾は夫々同一感染源による小規模集団感染に属するものであった故、11 cases→1 incidence, 2 cases→1 incidence とし、互いに独立する感染発生件数をカウントし直すと、4 月のそれは n=24 に減少した。同様に、3 月と 9 月にも夫々 1 件ずつの小規模集団感染事例¹⁰⁾²²⁾が含まれていた。かくて、互いに独立する感染発生件数 (Table 6 に於ける“adjusted number”)と比較する限り、顕著な月別変動は存在しなかった。

Table 7 Routes of transmission.

Routes	Number of cases (%)	With direct evidence	With indirect evidence
Contact with animal	1 (0.5%)	—	1 ^a
Blood transfusion	5 (2.3%)	5 ^b	—
Travel and Import	17 (7.9%)	—	13 ^c
Zoonotic food-borne	68 (31%)	5 ^d	26 ^e
Unknown	125 (58%)	—	—

^a Patient's pet cat was anti-HEV positive⁸⁾. ^b Complete matching of HEV sequences between donor and recipient was observed in each case^{11), 13)}. ^c Nucleotide sequences of HEV from the patients were more homologous to those in the visited countries (India, Thailand, Nepal, Pakistan, Bangladesh, China) than those in Japan. ^d Complete matching of HEV sequences between patients and left-over animal meats^{16), 22)}. ^e Shown in literature^{7), 10), 20), 21)}.

感染経路

感染経路を確定あるいは推定し得た症例は、全体の約 40% でしかなかった (Table 7)。

5 例の輸血感染 (1 例は愛知県, 1 例は東京, 3 例は北海道) は全て、ドナーと受血者の間で HEV RNA sequence の一致が確認された直接証明例である。一方、他の感染経路 (animal contact, travel and import, zoonotic food-borne) に於いては、感染源と感染者の HEV 塩基配列が一致するとの直接証拠が得られたのは、シカからの感染²²⁾とイノシシからの感染¹⁶⁾の 2 事例 5 名のみであって、その他は全て間接証拠からの推定である。感染源であると確定あるいは推定された動物種は、ブタ (症例数 n=44), イノシシ (15), シカ (5), 動物種不明 (2) であった。

北海道と本州以南で感染経路を比較すると、輸入感染の頻度に顕著な差が認められた: 北海道 1/130 (0.8%) vs 本州以南 16/124 (13%)。

考 察

本邦を含む先進工業地域諸国からは初出と思われる、この 200 例を越える HEV 感染例の解析から得られた成績の中には、幾つかの興味深い知見が含まれている。

まず、感染者のデモグラフィーに関しては、従来の教科書におしなべて “a disease of young adults” と記載されていたのに反し、本研究の成績は「中高年男性の病気」であることを強く示唆した。少数例ではあるが同様の成績が我国からも (A 型肝炎に比較して E 型肝炎患者は高齢で男性優位)²³⁾ フランスからも (男女比約 4 対 1, 平均年齢約 50 歳)²⁴⁾ も報告されているので、従来の教科書や常識が依拠していた流行地に於ける疫学と、これから明らかにされるであろう非流行地に於ける疫学の間に、相当の差異があるものと考えられる。

肝炎重症化の因子についても然りである。流行地に於ける観察から、妊娠第三期に於ける感染が従来唯一の重症化因子として認識されて来たが、非流行地である日本に於ける本研究の集計例の中に妊婦例は一例だに存在せず、寧ろ、加齢と HEV genotype 4 が、新たな重症化因子として浮き彫りになった。

特に、HEV genotype 4 と disease severity との間の有意な相関は、従前未報告の新知見であり、本研究の成果の中で最も特筆に値するものである。即ち、重症肝炎例に genotype 4 が多く見られるとの報告は従来から存在したが^{15), 24)}、病原性の強弱に関する genotype 3 と 4 との間の差異を統計学的有意差を以て示したのは、本報告が初めてである。両 genotypes の間にはゲノム構造上も若干の差異がある (genotypes 1, 2, 3 では ORF1 と ORF3 が別フレーム上にあるが、genotype 4 に於いては同一フレーム) し、増殖速度の差異 (genotype 3 < genotype 4) を示唆する所見 (姜貞憲, 松林圭二他, unpublished results) も得られているから、本研究が示唆した genotype 4 の相対的高病原性について、今後その機序が次第に明らかにされて行くと思われる。

HEV 感染に於ける zoonotic transmission の重要性は、特に我国からの多数の報告^{7), 8), 10), 14), 16), 20) ~ 22), 25)} により広く認識されることとなった。その所為もあり、今回の全国集計に任意登録された症例の多くに於いては、動物由来感染を疑うための問診が相当積極的に為されていたが、それでもなお、zoonotic transmission で説明し得る症例は全体の約 30% でしかなかった。輸入感染例の約 3 倍もの頻度で動物由来感染が存在するということが、自身が、新しく且つ刮目すべき知見ではあったものの、もっと重要な知見は、集計症例全体の約 60% もが感染経路不明のまま残されたという事実の方だったかもし

れない。何故なら、それにより、我々が未だ把握していない感染経路の存在をも念頭に置いた今後の研究の必要性が示されたからである。そして、その目的の為には、特に北海道に於いて一層積極的な調査を行うことが望まれる。北海道で経験される輸入感染の頻度(0.8%)は本州以南でのそれ(13%)の10分の1以下でしかないという事実が、道内の感染源の重要性を何よりも雄弁に物語っているからである。

謝辞：本研究必要経費の大半は厚生労働省科研費肝炎等克服緊急対策研究事業からの助成金によってカバーされた。著者リストに載せ得なかった多数の研究協力者諸兄姉に深謝する。

文 献

- 1) 藤吉 誠, 荘司貞志, 近藤朝明, 他. 胆汁うっ滞像を認めた E 型肝炎に不顕性小型アメーバ感染を合併した 1 例. 日本消化器病学会雑誌 1992; 89: 2804—2807
- 2) 安藤文英, 小柳年正, 酒井好古. 国内で感染し発症した散発性 E 型急性肝炎と思われる 1 邦人例. 肝臓 1994; 35: 560—565
- 3) 三浦英明, 古橋修介, 山田春木. 腸チフスによる敗血症を併発した E 型急性肝炎重症型の 1 例. 肝臓 2001; 42: 133—137
- 4) 佐藤 慎, 井戸健一, 磯田憲夫, 他. 海外渡航歴のない E 型急性肝炎の 1 例. 肝臓 2002; 43: 332—335
- 5) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. J Clin Microbiol 2002; 40: 3209—3218
- 6) Takahashi M, Nishizawa T, Yoshikawa A, et al. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. J Gen Virol 2002; 83: 1931—1940
- 7) Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. 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 2003; 84: 2351—2357
- 8) Kuno A, Ido K, Isoda N, et al. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. Hepatol Res 2003; 26: 237—242
- 9) 齊藤奈津子, 土山寿志, 大森俊明, 他. 北陸地方で確認された散発性 E 型急性肝炎の 1 例. 肝臓 2004; 45: 268—273
- 10) 加藤 将, 種市幸二, 松林圭二. 焼肉店での会食後に発生した E 型肝炎ウイルス集団感染: うち 1 例は劇症肝炎で死亡. 肝臓 2004; 45: 688
- 11) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. Transfusion 2004; 44: 934—940
- 12) Kumagai M, Nishii Y, Koizumi Y, et al. Domestic infection of hepatitis E in Japan. Intern Med 2004; 43: 807—810
- 13) Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. J Med Virol 2004; 74: 563—572
- 14) Hijikata S, Satoh Y, Iwashita Y, et al. A case of hepatitis E who had a history of frequent ingestion of raw meat and viscera from wild deer and boars. J Jpn Soc Gastroenterol 2005; 102: 723—728
- 15) Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, et al. 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 2005; 76: 341—349
- 16) Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. Emerging Infect Dis 2005; 11: 1258—1260
- 17) Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, et al. 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
- 18) Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, et al. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. J Infect Dis 2002; 185: 1342—1345
- 19) Tanaka Y, Takahashi K, Orito E, et al. Molecular tracing of Japan-indigenous hepatitis E viruses. J Gen Virol 2006; 87: 949—954
- 20) Tamada Y, Yano K, Yatsuhashi H, et al. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. J Hepatol 2004; 40: 869—870
- 21) Matsuda H, Okada K, Takahashi K, et al. Severe

- hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 2003; 188: 944
- 22) Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371—373
- 23) Sainokami S, Abe K, Kumagai I, et al. Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J Gastroenterol* 2004; 39: 702—703
- 24) Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 2004; 74: 419—424
- 25) 高橋和明, 岡田克夫, 姜 貞憲, 他. 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—390