

図 2. PLC/PRF/5 細胞あるいは A549 細胞の培養上清中 HEV RNA 量の推移；
糞便中 HEV 野生株と cDNA クローン由来 HEV (pJE03-1760F/wt) の比較

HEV は細胞膜に覆われ、ORF3 蛋白を担った状態で細胞から放出され、血中(培養上清中)では "enveloped" ウイルスとして、糞便中では "non-enveloped" ウイルスとして存在することが示された。また、ORF3 欠損ウイルスは細胞内では増殖できても分泌能を欠いていることが分かった。ORF3 蛋白は細胞内で様々な機能を発揮する multifunctional protein であると看做されているが、本研究の結果は、ORF3 蛋白が構造蛋白でもあり、感染細胞からの放出に重要な役割を果たしていることを示している。

研究発表

1. Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H: Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol* 153:657-666, 2008
2. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles

in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 153:1703-1713, 2008

3. Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Yamada K, Inoue J, Takahashi M, Okamoto H: Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* 137:86-96, 2008
4. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 90:457-462, 2009

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

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策事業)
E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究
平成 20 年度
分担研究報告書

劇症肝炎、LOHF 全国調査における E 型例

分担研究者：桶谷 真
(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 講師)

研究要旨：劇症肝炎、遅発性肝不全(LOHF)全国調査の集計結果をもとに 2001～2007 年に発症した E 型例を集計し、A 型および B 型急性感染例との比較解析を行った。E 型 7 例のうち 4 例は北海道、2 例は関東、1 例は近畿で発症し、7 例の平均年齢は 50 歳、男女比は 4:3 であった。亜急性型、LOHF が全体に占める割合は A 型 12.7%、B 型 17.9%、E 型 71.4% と E 型は他に比べて亜急性型、LOHF を呈する比率が高かった ($p < 0.01$)。また、肝性脳症Ⅱ度以上発現時の臨床検査成績で比較すると、E 型は他に比べ ALT 値は有意に低値であったが、総ビリルビン濃度は最も高値であった。E 型例の予後は生存 4 例、死亡 2 例、移植 1 例であり、B 型例に次いで予後不良であった。重症化、遷延化の背景に持続する高ビリルビン血症による酸化ストレスなどの関与が示唆された。

共同研究者

坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授
井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 准教授
宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 講師
森内昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 助教

A. 研究目的

我が国においては 2001 年以降、輸入感染によらない散発性 E 型肝炎例の存在が認識されるようになり、ほぼ同時期に劇症肝炎の成因のひとつとして E 型例が報告されるようになった。ただ年間の発症数が少ないため、その実態についてはこれまで十分に明らかにされていない。今回、2001 年から 2007 年までに集計された E 型劇症肝炎例

の背景、臨床像を A 型および B 型の劇症肝炎例と比較解析した。

B. 研究方法

全国約 600 の主な肝臓あるいは消化器専門施設を対象に実施される劇症肝炎、LOHF の全国調査の集計結果をもとに 2001～2007 年に発症した E 型劇症肝炎例の解析を行った。

(倫理面の配慮)

劇症肝炎、LOHF の全国調査は匿名化されたデータで集計解析されており既に鹿児島大学大学院の疫学研究等研究倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

H20 年度の劇症肝炎、LOHF 全国調査(2007 年)は 53 施設から劇症肝炎 83 例(急性型 40 例、亜急性型 43 例)、LOHF 5 例が登録された。そうち E 型劇症肝炎は亜急性型の 1 例で、関東で発症した 47 歳女性例で、内科的治療により救命された。

2001年から2007年までの7年間に発症したウイルス性劇症肝炎はA型が55例、B型急性感染例が235例、E型が7例であった。E型7例の発症地をみると北海道が4例と最も多く、以下関東2例、近畿1例の順であった。平均年齢はA型49歳、B型45歳、E型50歳とE型が最も高く、B型はA型に比べ有意に低かった($p<0.05$)。男女比はA型36:19、B型129:106、E型4:3であり、全ての成因で男性が優位であった。病型別では亜急性型、LOHFが全体に占める割合はA型12.7%、B型17.9%、71.4%とE型は他に比べて亜急性型を呈する比率が高かった($p<0.01$)。また、肝性脳症Ⅱ度以上発現時のALT値の中央値はA型4,185IU/L、B型3,460IU/L、E型945IU/LとE型はA型、B型いずれに対しても有意に低値($p<0.05$ vs A型、 $p<0.01$ vs B型)であった。一方総ビリルビン値はA型7.7mg/dl、B型9.0mg/dl、E型11.1mg/dlとE型は最も高値で、A型に対して有意差がみられた($p<0.05$ vs A型)。予後(生存/死亡/移植)はA型(38/14/13)、B型(100/97/38)、E型(4/2/1)であり、B型はA型に比べ有意に予後不良($p<0.01$)、E型はB型に次いで予後不良であった。発症から黄疸、黄疸から昏睡、昏睡から死亡または昏睡から覚醒までの平均期間を比較すると、有意差がみられたのは昏睡から死亡までの期間でA型19日、B型9.5日、E型65日と、E型が最も長くB型に比べ有意差がみられた($p<0.05$)。合併症の頻度はE型では感染、脳浮腫、腎障害、DIC、心不全が各1例(17%)にみとめられたが、他の病型に比べその頻度は少なかった。

D. 考察

E型肝炎は海外では特に妊婦で劇症化しやすいといわれていたが、本邦では中高年の男性に多いと報告されている。今回の集計でも妊婦例は1例もなく、中高年男性にやや多い傾向がみられた。しかし、男性の占める割合はA型ほど高くなかつ

た。病型は他のウイルス性劇症肝炎に比べ、亜急性型を呈する割合が有意に高く、臨床経過も昏睡から死亡までの期間が有意に長かった。このことからE型劇症肝炎は亜急性型で発症しやすく、内科的治療によっても経過が遅延し、予後不良の例が存在することが示唆される。臨床像でもE型劇症肝炎は他に比べ、ALT値が低値のわりに総ビリルビンが高値であり、肝炎に対し胆汁うっ滞が相対的に強い特徴がみられた。我々は昨年、急性E型肝炎でHEVが排除されたにも関わらず肝障害が持続、進展した症例を経験し報告した。肝生検組織所見からは非アルコール性脂肪肝炎(NASH)と胆汁うっ滞の所見が見られ、ビリルビン吸着療法が高ビリルビン血症、トランスアミナーゼの改善に有効であった。ビリルビンは生体内では抗酸化作用を有することが知られており、E型重症肝炎においては重症化、遷延化の背景に高ビリルビン血症に伴う酸化ストレスの関与が示唆された。本症例の解析においてもチオレドキシンはじめいくつかの酸化ストレスマーカーの上昇がみられ、病態進展との関連性が示唆された。

E. 結語

我が国におけるE型劇症肝炎は北海道で主に発症し、発症年齢は中年以降で、男性にやや多かった。病型は亜急性型を呈し、経過が遅延する傾向がみられた。臨床像ではトランスアミナーゼに比して高ビリルビン血症が顕著で、B型に次いで予後不良であった。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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

HEV genotype 1 における各種 HEV 抗体測定系の精度

分担研究者 田中靖人（名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学）

研究要旨：パキスタンにおける急性肝炎は HEV 起因するものが最も多く、急性肝炎患者の約 85% を占めた。また、わが国では HEV genotype 3, 4 が主体であるが、パキスタンでは genotype 1 が主体であった。分子進化学的手法を用いることで、パキスタンにおける主要な HEV 拡散時期は 1994 年頃と推定された。興味深いことに、当時急性肝炎のアウトブレイクが報告されていた。次に、パキスタンに蔓延している genotype 1 に対する各種抗体測定系の精度を比較した。中国製のキットが最も優れ、続いて日本製で、アボットのキットは感度・特異度ともに大きな問題があった。中国製のキットは genotype 1 由来の抗原を用いているために、genotype 3 由来の抗原を用いている日本製よりも良好な結果が得られたのかもしれない。

共同研究者

Anis Khan 名古屋市立大学大学院医学
研究科臨床分子情報医学
高橋和明 東芝病院・研究部
安倍夏生 東芝病院・研究部
三代俊治 東芝病院・研究部

IgG)、中国キット(IgM, IgG)と PCR の結果を比較検討した。

- (3) 中国における HEV 分子疫学調査
- (4) 昨年から引き続き、HEV データベースの充実化を図る。HEV 遺伝子情報の共有を可能するだけでなく、系統解析を Web 上で容易にできるように設定し、その広報活動を行った。

A. 研究背景・目的

- (1) パキスタンにおける HEV 感染の実態：これまでに E 型肝炎ウイルス(HEV)は本邦にも土着株が存在することが報告されているが、感染経路は多くの場合、Zoonotic infection と考えられている。一方、アジアの発展途上国をみても、水系の sporadic infection が主体である。今回、パキスタンとの共同研究により急性肝炎患者から血清を得ることができたので、HEV 罹患率を調査した。
- (2) HEV 抗体測定系の検証：東芝病院研究部(IgM, IgG)、特免(IgM, IgG)、アボット(IgM,

B. 研究方法

- (1) 対象：パキスタン南部のカラチにおいて 2008 年に急性肝炎と診断された 91 名を対象とした。同意を得た後に血清を採取し、各種検診に使用した。IgM-HA, IgM-HBc, HBsAg, anti-HCV, anti-HEV (アボット) でスクリーニングを行った。
- (2) HEV 抗体測定系：東芝病院研究部(IgM, IgG)、特免(IgM, IgG)、アボット(IgM, IgG)、中国キット(IgM, IgG)を用いて測定した。
- (3) HEV 遺伝子解析：血清から RNA を抽出し、最初に高橋らが開発したスクリーニングプ

ライマーを用いて HEV-RNA を確認した。3 か所の領域、すなわち ORF1 (326nt, 868nt), ORF2 (250nt)の PCR を行い、遺伝子配列を決定し、系統解析により genotype や特異的クラスターの有無を検討した。

C. 研究結果

HEV 感染: 91 例中 26 例は B 型慢性肝炎の急性増悪と診断したので、残りの 65 例で検討を行った。急性 A 型肝炎(AHA)4 例、急性 E 型肝炎(AHE)55 例と AHE が最も多かった。6 例は原因不明であった。53 例で HEV-RNA を検出した。

(2) HEV 抗体測定系の精度: 53 例の HEV-RNA 陽性検体に関して、東芝病院研究部(IgM, IgG)、特免(IgM, IgG)、アボット(IgM, IgG)、中国キット(IgM, IgG)と RT-PCR の結果を比較検討した。IgM-HEV 測定系(東芝、特免、中国、アボット)で感度以下となった検体(擬陰性)は、それぞれ 1, 1, 0, 10 であった。逆に、HEV-RNA 陰性検体での非特異的反応は、それぞれ 1, 0, 0, 5 であり、パキスタンの検体を用いた検討では中国製の IgM-HEV 測定系が最も優れ、アボットの測定系が最も劣っていた。

(3) 系統解析: PCR, シークエンスを施行し、系統解析を行った結果、全例 genotype 1 であり、2 つの異なるクラスターがあることがわかった。また、分子進化学的な手法を用いることで、パキスタンにおける主要な HEV 拡散時期は 1994 年頃と推定された。興味深いことに、当時急性肝炎のアウトブレイクが報告されていた。

(4) 肝炎データベース

(<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>)

の一部として HEV データベースを完成させた。現在までの登録配列は 2513 エントリー、全塩基配列の登録も 98 本に上っている。具体的にを行った点は、

a) 肝炎ウイルス遺伝子情報の網羅的収集(国際データベースとのリンク)

b) データを遺伝子座、系統関係の両面から整理

- 配列マップ
- マルチプルアラインメント
- 特定 genotype データの再解析
- 分子進化系統樹
- 宿主/地域分布と系統関係の相互参照

c) データ解析のプラットフォームとして利用可能

- ブーツストラップ解析
- Genotype 推定
- 相同性検索 (BLAST/FASTA)

D. 考察

パキスタンにおける急性肝炎は HEV 起因するものが最も多く、急性肝炎患者の約 85% を占めた。また、わが国では HEV genotype 3, 4 が主体であるが、パキスタンでは genotype 1 が主体であった。興味深いことに、中国における HEV 分子疫学調査によると、2002 年以前は、sporadic (水系感染): genotype 1>4, zoonotic: genotype 4 と感染経路により genotype が異なっていたが、近年ではいずれも genotype 4 による感染が増加傾向である。パキスタンにおいては、宗教的な理由で豚などの家畜と接する機会が少ない点が、genotype 4 が蔓延せず、genotype 1 のみが sporadic に拡散した要因となっているかもしれない。

スクリーニング系の確立は重要であり、今回パキスタンに蔓延している genotype 1 に対する抗体測定系の精度を比較した結果、中国製のキットが最も優れていた。アボットのキットは感度・特異度ともに大きな問題があり、実用性は困難と思われた。わが国で開発された測定系は、若干問題が見られたが、genotype 3 由来の抗原を用いているため、genotype 1 の多いパキスタンの患者血清に反応が弱い検体の存在が示唆された。一方、中国製のキットは genotype 1 由来の抗原を用いているた

めに今回の genotype 1 検体に対して良好な結果が得られた可能性が高い。逆に、中国製キットは genotype 3 に対する反応性が悪いことがわかっており、抗原を組み合わせることで、すべての genotype に反応する系を開発する必要があるかもしれない。

分子進化学的手法を用いることで、パキスタンにおける主要な HEV 拡散時期は 1994 年頃と推定された。興味深いことに、1994 年 12 月に 283 人の急性肝炎患者が軍人病院に入院していたとする報告があり、パキスタンにおいて 1994 年に Major な HEV outbreak があったことを裏付ける結果と思われる。こうした手法は、その地域における HEV 感染時期、さらにその当時の社会的背景から感染・拡散様式も推測可能である。こうした研究は、衛生上問題が残る発展途上国における HEV 拡散時期、拡散様式を把握し、HEV の拡散予防にも繋がると考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし（現在投稿準備中）

2. その他の発表

肝炎データベース

（<http://s2as02.genes.nig.ac.jp>）の公開

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

HEV キャプシド蛋白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・食品産業技術総合研究機構 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食用ワクチンを開発することである。最終年度は、これまでに作製した HEV CP 発現形質転換レタスをマウスに経口摂取させ、その後の血清中の抗 HEV CP 抗体の発現を検定し、食べるワクチンとしての有効性を考察する。

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は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。

バキュウロウイルスを用いた昆虫細胞内で発現させた組換え HEV キャプシドタンパク質（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報告されている（Li et al., 1997）。

本研究では、飼育ブタの HEV 感染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レタスを作製し、HEV CP を産生する飼料・食用作物を開発することで経口投与ワクチンの創出へと繋げる。すなわち、精肉を介した経口感染に

よる E 型肝炎の伝染環を遮断することを目的としており、さらにその技術は、HEV CP 遺伝子発現形質転換レタスをヒトが直接摂食することにより本病を予防できる革新的なワクチン技術の開発へと発展する。最終年度となる本年度では、HEV CP 遺伝子を発現する形質転換レタスを三ヶ月にわたりマウスに経口投与し、消化管経由での免疫原性を確認する。

B. 研究方法

HEV CP 遺伝子組換えレタスのマウスへの経口投与

前年度までに作製した、植物型コドンに改変した HEV CP 遺伝子発現形質転換レタスを閉鎖系温室にてプランター栽培した。結球したレタス 8 個体のそれぞれの葉からリーフディスクを採取し、ウェスタンブロット法で組換え遺伝子から発現された HEV CP を確認し、当該タンパク質の高発現葉を瞬間凍結してその後は -80℃ で凍結保存した。遺伝子発現が確認されたレタス葉の 1g を蒸留水 1ml で磨砕し、その粗汁液をゾンデを用いて直ちにマウスに経口投与した。摂取回数は、1日1回で、14週間毎

日投与した。実験に用いたマウスは BALB/cAJcl の 3 週令オスで、組換えレタス葉の摂取に 8 匹、無処理レタス葉摂取に 8 匹の計 16 匹を用い、全実験期間を通じて同一個体から採決した。マウスからの採血は、摂取開始日、4 週目、8 週目、10 週目、12 週目、14 週目に行った。得られたマウス血清は、大腸菌発現の HEV CP をプレートに固相し、被検血清を投入後にペルオキシダーゼ標識した HEV CP で特異抗体を検出する抗原による DAS-ELISA 法により、血清中の HEV CP 特異抗体の存在を調査した。

C. 研究結果

消化器官経路によるレタス内発現 HEV CP の免疫原性

アグロバクテリウム法により作製した HEV CP 形質転換レタスは、昨年度の報告書に示したとおり Genotype III または IV のそれぞれにおいて複数系統得られた。

それらの内、ウェスタンブロットで HEV CP

の蓄積が最も多かった Genotype III (JRA) の 1 系統レタスを閉鎖系温室で栽培し、マウスに経口投与した。その後、眼窩底から経時的に採血し、得られた血清について DAS-ELISA 法で検定した。その結果を表 1 に示す。残念ながら、全期間にわたっていずれの個体も ELISA 値の上昇は認められなかった。形質転換レタスを摂取させた個体番号 3 のマウスでは 12 週目に ELISA 値が俄に上昇した (下線) が、2 週間後の 14 週には他の個体と同等の値まで下がっていた。このことから、その ELISA 値の上昇は非特異反応であろうと推察された。以上から、本研究課題で開発した HEV CP 遺伝子発現形質転換レタスは、植物体内において当該タンパク質を発現するが、経口投与摂取での消化管経路では免疫原性を発揮しないものと結論付けられた。

表1 HEV CP発現形質転換レタスあるいは無処理レタスを経口投与したマウス血清のHEV CP特異抗体検定

		ELISA実測値 (A450/620)					ヒトコントロール血清		
		処理前	4週目	8週目	10週目	12週目	14週目		
形質転換レタス	個体番号1♂	0.0470	0.0440	0.0500	0.0440	0.0530	0.0500	高陽性C	1.1040
	個体番号2♂	0.0370	0.0450	0.0490	0.0440	0.0490	0.0510	低陽性C	0.3350
	個体番号3♂	0.0580	0.0490	0.0480	0.0530	<u>0.1710</u>	0.0460	高陽性C	1.2870
	個体番号4♂	0.0590	0.0500	0.0580	0.0520	0.0510	0.0480	低陽性C	0.1830
	個体番号5♂	0.0540	0.0540	0.0290	0.0800	0.0450	0.0490	陰性C	0.0510
	個体番号6♂	0.0630	0.0470	0.0480	0.0490	0.0500	0.0500	陰性C	0.0570
	個体番号7♂	0.0570	0.0400	0.0450	0.0380	0.0440	0.0630	陰性C	0.0510
	個体番号8♂	0.0600	0.0480	0.0410	0.0650	0.0420	0.0480	陰性C	0.0560
無処理レタス	個体番号1♂	0.0570	0.0720	0.0480	0.0440	0.0510	0.0470		
	個体番号2♂	0.0540	0.0490	0.0510	0.0480	0.0450	0.0450		
	個体番号3♂	0.0530	0.0550	0.0530	0.0590	0.0530	0.0520		
	個体番号4♂	0.0570	0.0500	0.0490	0.0470	0.0440	0.0480		
	個体番号5♂	0.0550	0.0510	0.0500	0.0450	0.0450	0.0500		
	個体番号6♂	0.0560	0.0510	0.0490	0.0450	0.0490	0.0460		
	個体番号7♂	0.0530	0.0500	0.0470	0.0460	0.0520	0.0580		
	個体番号8♂	0.0530	0.1140	0.0480	0.0510	0.0470	0.0460		

E. 考察

過去 6 年間に渡り、HEV CP 形質転換植物の開発に取り組んだ。残念ながら、作製した植物をマウスに摂取させることで消化管経路での

抗原感作はできなかった。本摂取試験で用いた形質転換レタスを資料として、E 型肝炎罹患患者の血清でウェスタンブロットをすると、HEV CP と想定される分子量のタンパク質が特異的

に検出される。使用した患者抗血清がどの程度の感度（抗体価）を有するかは不明であるが、ウェスタンブロット上で10-100ngのCPを検出できると仮定すれば、1レーンに添加したレタス葉の重要が10-20 μ gであることから、大凡1-10 μ g/mg（レタス）のCP発現量となる。今回のマウスへの経口投与は、レタス葉重要200mg/匹としているので、投与したCP量は200-2000 μ g/匹と計算できる。本量は、人間に換算すると、約0.4-4gのCPを毎日摂食していることになる。

国立感染症研究所のグループは、バキュロウイルスの発現系（昆虫細胞）で組換えHEV CPの合成に成功し、そのタンパク質は中空粒子を形成していたと報告した。しかし、その中空粒子の成否は、用いる遺伝子のタイプにより分かれたようである。そこで本研究でも、東芝病院研究部保存のGenotype IIIとIVのそれぞれ数系統を植物で発現させてみたが、その予備実験では何れも粒子形成には至らなかった。一方、本研究期間中に大腸菌（原核細胞）発現のHEV CPの合成も行ったが、その発現系でも中空粒子を形成していなかった。従って、遺伝子発現させる細胞の生物種により、ポリペプチドのフォールディング（高次構造化）に影響を受けるのではないかと推察された。

腸管経路での免疫感作では、マクロファージなどの抗原提示細胞が対象とするタンパク質を腸管の粘膜越しにある程度オリジナルのフォールディングを有している状態の分子として捕まえる必要があると考えられる。HEVは経口感染するウイルスであることから、タンパク質発現させた際オリジナルに近い粒子を形成しているのであれば腸管経路での免疫感作が首尾よく運ばれると期待された。しかし、

前年度に報告したとおり、レタス発現のHEV CPは粒子を形成しないポリペプチドであったことから、腸管粘膜を超える前に速やかにペプチド断片にまで消化されてしまったのではないと思われる。今後、このような消化管経路での抗原提示では、コレラや大腸菌等有する腸管粘膜感染機構等の特別な仕組みを利用した方法を利用するなどの工夫が必要であろうと思われた。

F. 謝辞

本研究を実施した全研究期間に渡り、常時ご指導いただいた高橋和明先生（東芝病院研究部）に対して感謝申し上げる。

G. 参考論文

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 20 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）
『E 型肝炎の感染経路・宿主域・遺伝的多様性・感染防止・診断・治療に関する研究』
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)

- Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*. 2008;48:1368-75.
- Sakata H, Matsubayashi K, Takeda H, Sato S, Kato T, Hino S, Tadokoro K, Ikeda H. A nationwide survey for hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion*. 2008;48:2568-76.
- Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim*. 2008 Jul;57(4):367-76.
- GS. Hansman, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, and Takeda N. Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams. *Journal of Food Protection*. 2008 Aug; 71(8): 1689-95.
- Li TC, Suzuki Y, Ami Y, Tsunemitsu H, Miyamura T, and Takeda N. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2008. Dec;70(12):1359-62.
- Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol*. Nov 9, 2008.
- Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H: Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol* 153:657-666, 2008
- Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol* 153:1703-1713, 2008
- Lorenzo FR, Tanaka T, Takahashi H, Ichiyama K, Hoshino Y, Yamada K, Inoue J, Takahashi M, Okamoto H: Mutational events during the primary propagation and consecutive passages of hepatitis E virus strain JE03-1760F in cell culture. *Virus Res* 137:86-96, 2008
- Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H: Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 90:457-462, 2009
- Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, Li TC, Takeda N, Xing L, Hjalmarsen E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22.
- Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC,

Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Dec 1.

Takahashi K, Okamoto H, Abe N, Kawakami M, Matsuda H, Mochida S, Sakugawa H, Sugino-shita Y, Watanabe S, Yamamoto K, Miyakawa Y, Mishiro S. A Virulent Strain (JIO) of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Japan: Analysis of Complete or Near-Complete Sequences of Human and Swine Isolates. Emerging Infectious Diseases 2009 (in press)

Taniguchi M, Kim SR, Mishiro S, Takahashi K, Shin MH, Yun H, Park MS, Zhongmin L, Kim MK, Fang J, Hayashi Y. Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. Journal of Infection 2009 (in press)

Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, Takahashi K, Abe N, Mishiro S, Takamatsu J. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia. Intervirology 2008;51(1): 21-5

江林明志、井上和明、高橋和明、渡邊綱正、山田雅哉、安田宏、三代俊治、与芝真彰. インドから帰国直後に重症 E 型肝炎を発症した日本人妊婦の 1 例. 肝臓 2009; 50(2): 60-64

川上万里、久保木真、梅川康弘、山本和秀、安倍夏生、高橋和明、三代俊治. 原因不確定の急性肝障害における hepatitis E virus 感染の有無の検討. 肝臓 2009; 50(3) in press

2. Reviews: (班員・班友を下線で示す)

岡本宏明: E 型肝炎のリスクと養豚場浸潤の現状. Pig Journal 11(12): 17-20, 2008

岡本宏明: E 型肝炎をめぐる最近の知見—感染培養系の確立と応用も含めて 日本消化器病学会雑誌 106(2):177-187, 2009

矢野公土、八橋弘. 肝臓の病気を知る 急性肝炎. からだの科学 2008;08:50-54.

矢野公土、玉田陽子、八橋弘. E 型肝炎の臨床. 日本消化器病学会雑誌 2009;106(2):188-194

上平幸史、矢野公土、玉田陽子、松本武浩、宮里賢、長岡進矢、大畑一幸、阿比留正剛、小森敦正、大黒 学、八橋 弘、石橋大海. 著名な血小板減少を呈した E 型急性肝炎の一例. 日本消化器病学会雑誌 2008;105 841-846

矢野公土、八橋弘. わが国における急性ウイルス肝炎の動向. 臨床と研究 2008 ; 85 : 941-946.

加藤孝宜、高橋和明. E 型ウイルス性肝炎(解説). Medical Technology 2008; 36(9):971-974

IV. 研究成果の刊行物・別刷

A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route

Keiji Matsubayashi, Jong-Hon Kang, Hidekatsu Sakata, Kazuaki Takahashi, Motohiro Shindo, Masaru Kato, Shinichiro Sato, Toshiaki Kato, Hiroyuki Nishimori, Kunihiko Tsuji, Hiroyuki Maguchi, Jun-ichi Yoshida, Hiroshi Maekubo, Shunji Mishiro, and Hisami Ikeda

BACKGROUND: Five cases of transfusion transmission of hepatitis E virus (HEV) have been reported so far. The infection routes of the causative donors remain unclear, however. Also, the progress of virus markers in the entire course of HEV infection has not been well documented.

STUDY DESIGN AND METHODS: Nucleic acid testing was performed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction targeting the open reading frame 2 region of HEV. Full-length nucleotide sequences of HEV RNA were detected by direct sequencing.

RESULTS: Lookback study of a HEV-positive donor revealed that the platelets (PLTs) donated from him 2 weeks previously contained HEV RNA and were transfused to a patient. Thirteen relatives including the donor were ascertained to enjoy grilled pork meats together in a barbecue restaurant 23 days before the donation. Thereafter, his father died of fulminant hepatitis E and the other 6 members showed serum markers of HEV infection. In the recipient, HEV was detected in serum on Day 22 and reached the peak of 7.2 log copies per mL on Day 44 followed by the steep increase of alanine aminotransferase. Immunoglobulin G anti-HEV emerged on Day 67; subsequently, hepatitis was resolved. HEV RNA sequences from the donor and recipient were an identical, Japan-indigenous strain of genotype 4. HEV RNA was detectable up to Day 97 in serum, Day 85 in feces, and Day 71 in saliva.

CONCLUSION: A transfusion-transmitted hepatitis E case by blood from a donor infected via the zoonotic food-borne route and the progress of HEV markers in the entire course are demonstrated. Further studies are needed to clarify the epidemiology and the transfusion-related risks for HEV even in industrialized countries.

Hepatitis E virus (HEV) infection has been considered to occur mainly via fecal-oral transmission and is an important public health concern in developing countries.¹ In industrialized countries including Japan, cases have been rarely reported and hepatitis E has been regarded as an imported infectious disease from its endemic areas. Recently, however, increasing numbers of sporadic cases have been reported,²⁻¹¹ some of which resulted from infection via a zoonotic food-borne route by consumption of raw or undercooked meats of wild boar, wild deer, or farmed pig that was contaminated with HEV.⁸⁻¹¹

In 2004, we reported the first molecularly confirmed case of transfusion transmission of HEV.¹² The infection route in the causative donor was not very clear, however. Thereafter, at least four cases of transfusion transmission of HEV have been reported in Japan, the United Kingdom,

ABBREVIATIONS: FAM = 6-carboxyfluorescein; HEV = hepatitis E virus; ORF = open reading frame; PSL = prednisolone; TAMRA = 6-carboxy-tetramethylrhodamine.

From the Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo; the Center for Gastroenterology, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo; the Department of Medical Sciences, Toshiba General Hospital, Tokyo; the Third Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa; the Department of Internal Medicine, Kitami Red Cross Hospital, Kitami; and the Department of Internal Medicine, Teine Keijinkai Hospital, Sapporo, Japan.

Address reprint requests to: Keiji Matsubayashi, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063-0002, Japan; e-mail: kmatsu@hokkaido.bc.jrc.or.jp.

Received for publication September 5, 2007; revision received January 20, 2008, and accepted January 20, 2008.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x

TRANSFUSION 2008;48:1368-1375.

and France,¹⁵⁻¹⁶ where hepatitis E is nonendemic and HEV infection routes remained to be obscure.

Here, we report a case of acute hepatitis E caused by transfusion transmission from the donor who was infected with HEV via a zoonotic food-borne manner. To our knowledge, this is the first case in which the infection route of the causative donor has been confirmed. Also, in this report, we describe, for the first time, the virus kinetics and changes of anti-HEV in serum, prospectively monitored from latent period of infection until convalescence, accompanied by disease progression in the patient.

MATERIALS AND METHODS

Detection and quantitation of HEV RNA

For reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect HEV RNA in the samples, the following oligonucleotides were designed to detect 75 nucleotides of highly conserved sequence in the open reading frame (ORF) 2 region of all HEV genotypes: forward primer 5'-CGGCGGTGGTTCTGG-3', reverse primer 5'-AAGGGGTTGGTTGGATGAATA-3', and mixed probes with a 5'-reporter dye (6-carboxyfluorescein, FAM) and a 3'-quencher dye (6-carboxy-tetramethylrhodamine, TAMRA) and FAM-5'-TGACAGGGTTGATTCTCAGCCCTTCG-3'-TAMRA, FAM-5'-TGACCGGGTTGATTCTCAGCCCTTC-3'-TAMRA, and FAM-5'-TGACCGGGCTGATTCTCAGCCCTT-3'-TAMRA (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan). Nucleic acid was extracted from 200 μ L of serum and saliva and from 100 μ L of 10 percent (wt/vol) fecal suspension in saline with kits (QIAamp MinElute virus spin kit, Qiagen K.K., Tokyo, Japan; and SMITEST R&D-EX, Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan). Before extraction, the samples were centrifuged at 6000 \times g at 4°C for 10 minutes; thereafter the clear supernatant was subjected to nucleic acid extraction. Before RT-PCR, RNA preparation of feces was diluted at 10 times with nuclease-free water to reduce the effect of inhibitors. Twenty microliters of nucleic acid sample was used for each reaction. Each 50 μ L of reaction mixture contained 25 μ L of 2 \times RT-PCR kit master mix (QuantiTect Probe RT-PCR kit, Qiagen), 0.5 μ L of RT mix (QuantiTect Probe RT-PCR kit, Qiagen), 400 nmol per L each of forward and reverse primer, and 67 nmol per L each of three probes. RT-PCR mixture was incubated at 50°C for 30 minutes and at 95°C for 15 minutes, followed by 50 cycles of 94°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute utilizing a thermocycler (Applied Biosystems 7500, real time PCR system, Applied Biosystems, Tokyo, Japan). HEV nucleic acid testing (NAT) was performed individually. The analytical sensitivity of the HEV NAT was determined to be 25 (13-166) copies per mL (with 95% confidence interval) by logistic analysis. HEV viral load was determined from standard curves generated by using 10¹ to 10⁷ copies of HEV RNA per reaction. The HEV quantitation standard was generated by transcribing

HEV cDNA of HEV ORF2 region that was cloned into a plasmid (pCRII-TOPO, Invitrogen, Carlsbad, CA), using the in vitro transcription kit (MAXIScript T7 high-yield transcription kit, Ambion, Austin, TX). Purified plasmid DNA was linearized with *Hind*III restriction endonuclease and transcribed to yield 717-nucleotide-long RNA transcripts containing 75-nucleotide target sequence.

Phylogenetic analysis of HEV isolates

Entire or nearly entire sequences of HEV isolates were determined as previously described by Takahashi and coworkers.⁴ The sequences were aligned together with reported HEV strains with a computer program (CLUSTAL W, Version 1.8).¹⁷ A phylogenetic tree based on the nearly entire HEV RNA sequence was constructed by the neighbor-joining method,¹⁸ and the final tree was obtained by a computer program (TreeView, Version 1.6.6).¹⁹ Bootstrap values were determined by resampling 1000 times of the data sets. The nucleotide sequences isolates HRC-HE14C, JST-KitAsa04C, and JTC-Kit-FH04L reported in this study have been assigned DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession numbers AB291965, AB291966, and AB291959, respectively.

Detection of serum anti-HEV

Samples were tested for immunoglobulin M (IgM)- and immunoglobulin G (IgG)-class antibodies against HEV using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Viragent HEV-Ab, Cosmic Corp., Tokyo, Japan).^{5,20}

Alanine aminotransferase testing

Alanine aminotransferase (ALT) testing was carried out using transaminase-HRII Nisseki/GPT (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) on an automatic analyzer (ACA5400, Olympus Corp., Tokyo, Japan).

RESULTS

A lookback study of a causative blood donor

Blood from a 39-year-old Japanese male on September 20, 2004, was disqualified because of the elevated ALT level at 236 IU per L and tested for hepatitis viruses because of the abnormal ALT result. His blood sample turned out to be positive for the presence of HEV RNA at 4.8 log copies per mL as well as anti-HEV IgM and IgG and negative for the presence of any marker of hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV). A lookback study revealed that his donated blood on September 6, 2004, 2 weeks before the last donation, was positive for the presence of HEV RNA at 3.1 log copies per mL and negative for the presence of IgM- or IgG-class anti-HEV. The HEV isolate, HRC-HE14C, was classified as genotype 4 of a Japan-indigenous strain (Fig. 1). The blood (platelet [PLT] concentrate) donated on

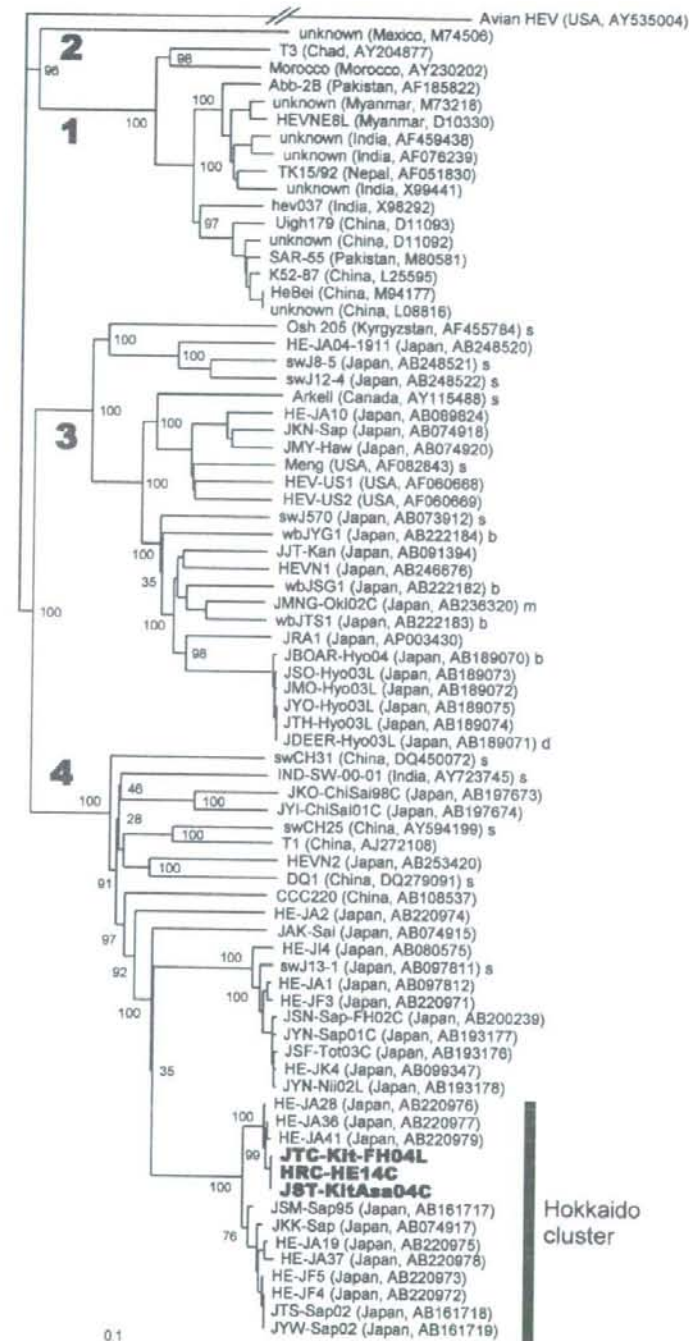


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the entire or nearly entire sequences of HEV genome of 77 isolates using an avian HEV (AY535004) as an outgroup. After the isolate name, the name of the country where the strain was isolated and accession numbers are shown in parentheses. The numbers 1, 2, 3, and 4 in bold indicated HEV genotypes. The 3 isolates HRC-HE14C from the causative donor, JST-KitAsa04C from the patient, and JTC-Kit-FH04L from the donor's father are indicated in bold. The letters "s," "b," "d," and "m" after parentheses denote HEV isolates from farmed pig, wild boar, wild deer, and mongoose, respectively. A vertical bar represents a cluster consisting of strains indigenous to Hokkaido, Japan. Bootstrap values are indicated for the major nodes as a percentage of the data set obtained from 1000 resamplings.

September 6 was released because it showed normal ALT and passed all the current blood screening tests. Transfusion was carried out 3 days after the blood donation, and the total amount of HEV in the PLT concentrate was estimated to be approximately 5.4 log copies. He was asymptomatic and did not feel tired or febrile in the periods near the two occasions of blood donation.

A minioutbreak of HEV infection in family members of the causative donor

Besides the causative donor, HEV RNA was detected in the blood of his 69-year-old father, who developed acute hepatitis on September 14, 2004, and finally died of fulminant hepatitis on October 14. Retrospective analysis of the father's blood sample taken on September 24, 41 days after the dining, revealed that the HEV strain, JTC-Kit-FH04L, was genotype 4. HEV RNA sequence analysis of the HEV isolates from the causative donor and his father showed only 9-nucleotide differences of 6588 nucleotides, suggesting that the two strains were extremely close but not identical (Fig. 1).

By retroactive interviewing, it was revealed that the causative donor and his 12 relatives gathered to enjoy grilled meats

including pig liver and intestines at a barbecue restaurant on August 14, 2004.²¹ Blood samples from the relatives were tested for HEV markers with informed consent. Seven of the family members who ate grilled pig liver and/or intestines had IgM- and/or IgG-class anti-HEV in the blood samples taken 37 to 92 days after the barbecue party. Retrospectively, in the previous 6 months or more, dining out at that restaurant was the only occasion all the 13 relatives had eaten together.

Clinical course of the patient

It was confirmed that the PLT concentrate (approx. 200 mL) contaminated with HEV was transfused to a 64-year-old Japanese male patient with non-Hodgkin's lymphoma on September 9, 2004, as shown Day 0 in Fig. 2. The patient had been treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation accompanied with heavy chemotherapy since July 30, 2004. In the first 3 weeks after the transfusion, liver function tests sustained to be normal. On Day 22, the ALT level increased transiently at 67 IU per L, and HEV was detected in serum. While the ALT level returned to normal, the viral load in serum showed an exponential increase. Levels of aspartate aminotransferase (AST) and ALT took an upward turn on Day 41. There was no evidence for acute infection of hepatitis A virus, HBV, HCV, cytomegalovirus, or Epstein-Barr virus. He was diagnosed as acute hepatitis E. On Day 45, he was referred to the liver unit of Teine Keijinkai Hospital to treat presumed developing acute hepatitis E. Despite antiviral therapy with interferon (IFN) from Day 45, 2',5'-oligoadenylate synthetase in serum never showed apparent increase and no obvious decrement of viral load had obtained (Fig. 2A). Levels of AST and ALT indicated creeping increase to reach highest levels of 903 and 673 IU per L on Day 59, respectively (Fig. 2C). The treatment was switched from IFN to prednisolone (PSL) in expectation of its anti-inflammatory effect. From Day 59 after induction of PSL treatment, AST and ALT showed rapid decrease and improvement of prothrombin time was observed (data not shown). Dosage of PSL

tapered gradually and discontinued on Day 113. Soon after anti-HEV IgG emerged on Day 67, HEV load in the serum sample had declined rapidly, although anti-HEV IgM in the serum sample remained negative (Figs. 2A and 2B). The levels in aminotransferases were normalized after Day 95 (Fig. 2C). The HEV strain JST-KitAsa04C detected in the patient was genotype 4 and its entire sequence analysis showed only a 1-nucleotide difference of 7255 nucleotides, suggesting the two isolates were identical (Fig. 1).

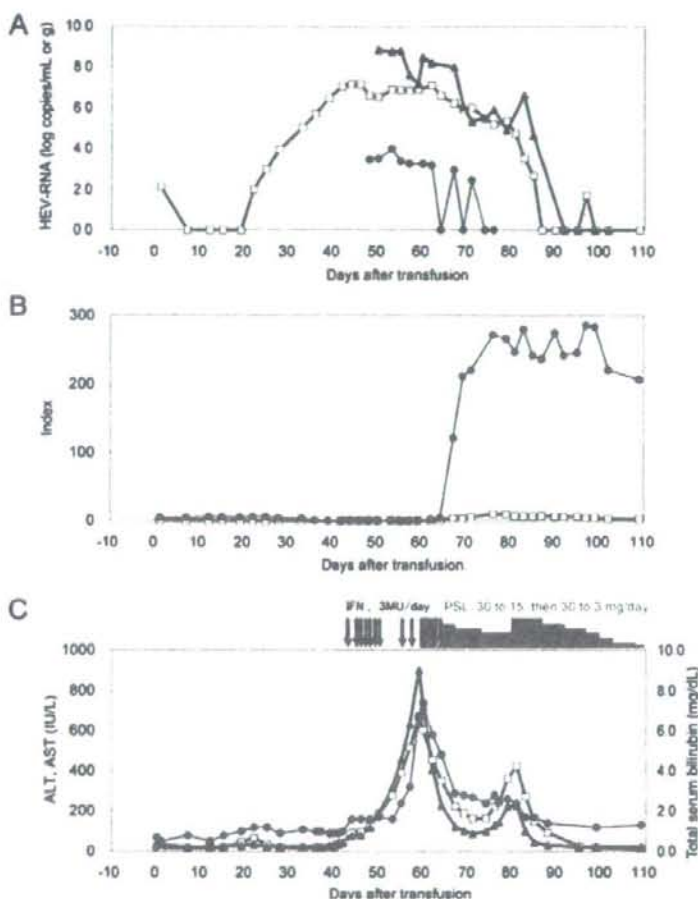


Fig. 2. Clinical course of transfusion-transmitted hepatitis E with kinetics of (A) HEV RNA, (B) serologic, and (C) biochemical markers after transfusion. The patient had transfusion of PLT concentrates contaminated with HEV on Day 0. (A) HEV RNA load was represented as log copies per mL of serum (\square) or saliva (\bullet) or per g of feces (\blacktriangle). There were no data between Day 0 and Day 44 in feces and saliva. (B) Cutoff values of anti-HEV IgM (\square) and IgG (\bullet) antibodies are 30 and 13, respectively. (C) Medications were administered with IFN- α from Day 43 through Day 62 and with PSL from Day 59 through Day 112. (\square) ALT; (\blacktriangle) AST; (\bullet) total serum bilirubin.

Serial quantitative changes of HEV load in serum, saliva, and feces of the patient

HEV RNA and anti-HEV were measured for every serum sample before and after the transfusion. In addition, HEV loads were also assessed prospectively for feces and saliva after his transfusion to the liver unit on Day 45. Any marker for HEV was not detected in serum sampled 37 days before the transfusion. A small amount of HEV RNA was transiently detected in his serum on Day 1, the next day of the transfusion. After the reappearance on Day 22, HEV RNA showed exponential increment with doubling every 29 hours and reached the peak level of 7.2 log copies per mL on Day 44. Beyond its plateau phase lasting 3 weeks, viral load revealed gradual decline over 2 weeks and thereafter decreased promptly. HEV viremia had been finally sustained for 63 days. HEV RNA remained detectable up to Day 97 in serum, Day 71 in saliva, and Day 85 in feces. Peak levels of HEV RNA were found on Day 53 in saliva at 4.0 log copies per mL and on Day 50 in feces at 8.9 log copies per g, respectively. HEV RNA was no longer detectable after Day 99 (Fig. 2A).

DISCUSSION

In Japan, a nonendemic country for hepatitis E, HEV infection is occurring more frequently than previously recognized. The prevalence of anti-HEV IgG in healthy Japanese persons ranged from 1.9 to 14.1 percent, depending on the geographic area,²⁰ and the prevalence of HEV RNA among Japanese blood donors with ALT level of at least 201 IU per L was 2.8 percent.²¹ The risks of transfusion transmission of HEV might be low; however, five molecularly confirmed cases of transfusion-transmitted HEV infection have been reported in nonendemic countries so far.¹²⁻¹⁶ In none of them, HEV infection routes of the causative donors are known. In this report, we have described the first case that the infection route of donor is clarified as zoonotic food-borne. The conclusion is based mainly on two observations.

First, by the epidemiologic study, the donor was determined to be infected in a minioutbreak of HEV infection in the context of food-borne transmission. Six of the 13 relatives who dined out together were positive for the presence of HEV RNA and/or IgM anti-HEV in their serum samples obtained 37 to 92 days after dining at the restaurant (Appendix 1). As for 4 relatives who were positive for the presence of IgM anti-HEV, HEV viremia might have transiently occurred without any symptom and had subsided by the time when blood samples were taken. Since IgM anti-HEV are regarded as the markers of acute HEV infection besides HEV RNA,¹⁰ these facts strongly suggest that family members had recently become infected with HEV probably at the same time and remained asymptomatic. The party at the barbecue restaurant was the only opportunity all the 13 members had eaten together in the

estimated period of HEV infection, 2 to 10 weeks.^{22,23} Although it was difficult to identify the source of infection because no meat was left, they ingested various kinds of pig meats including liver and intestines, according to the replies to the questionnaire from the family members.²⁴ From this retrospective research, it is strongly suspected that the family members shared the motive of infection with HEV by ingestion of pig liver and intestines. In Japan, HEV has been isolated from farmed pigs,^{8,25} wild deer,^{8,26,27} and wild boar^{10,11,26,27} as well as humans and recent studies also indicated that HEV is moderately resistant to heat inactivation.^{28,29} Some reports suggest that a number of hepatitis E cases in Japan may be via a zoonotic food-borne route.^{8-11,25-27,30}

Second, a single transmission route of HEV in this minioutbreak is corroborated by molecularly confirmed facts. From full-length sequence analysis, HEV RNAs detected in the donor and recipient were identical and closely related to that in his father. Among the strains of genotype 4 indigenous to Hokkaido, Japan, these three strains were segregated into a distinct cluster with a bootstrap value of 99 percent in a phylogenetic tree based on the entire or nearly entire sequences of HEV genome. Moreover, when comparing 412-nucleotide sequences (nucleotides 5985-6396 of HRC-HE14C) of ORF2 region, where many sequences of Japanese swine HEV are retrievable in DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases, high similarity (409/412 nucleotides, 99.3%) was observed between the HEV sequences derived from the causative donor and his father and strain swJL145 (AB105902),⁹ which was detected in pig liver sold at a drug store in Hokkaido, Japan.

To date, in acute hepatitis E including transfusion transmission cases, dynamic relationships between infection markers for HEV and disease progression throughout the course from HEV transmission to convalescence of disease have not been demonstrated. This is the first case of acute hepatitis E, in which HEV kinetics in serum as well as in feces and saliva were described by using quantitative RT-PCR for HEV RNA from transfusion up to the end of viremia accompanied by disease progression, and the emergence and increase of anti-HEVs. In the current case, HEV viremia had lasted for 9 weeks or more and viral load reached its peak 15 days before the peak of aminotransferase level and died out promptly right after the appearance of anti-HEV IgG on Day 67. The results led us to understand the chronologic relationship between preceding viremia and after emergence and increase of anti-HEV.

Besides serum, the kinetics of HEV load in feces and saliva were concomitantly observed for the first time in hepatitis E in humans. After the transmission, HEV RNA remained detectable until Day 71 in saliva and Day 85 in feces. Among sera, saliva, and feces, every time point at peak viral loads resembled each other, 50 to 60 days after transmission. These facts may indicate that viral loads in

saliva and feces would also reflect viremia state. In addition, the results for saliva suggest that besides fecal-oral route, oral-oral transmission manner can be another route of human-to-human infection of HEV.

Soon after the transference to liver unit in the hospital, IFN- α therapy was started against HEV infection, indicating the exponential increase of viral load in sera. The levels in 2',5'-oligoadenylate synthetase, however, induced by IFN and regarded as a predictive marker for favorable IFN efficacy,³¹ did not show sufficient increase in serum (data not shown), and HEV load monitored concomitantly indicated no actual decrement during treatment. Thereafter, single-nucleotide polymorphisms in markers predicting the therapeutic efficacy of IFN, such as mannose-binding lectin,³² MxA,³³ LMP7,³⁴ and osteopontin,³⁵ were examined, and all of them did not show the phenotype associated with favorable efficacy of IFN (data not shown).

Throughout his clinical course, no distinct positive result for IgM anti-HEV was observed. It is possible that the concentration of IgM anti-HEV was too low to be detected by the method we used. In fact, some of his samples showed equivocal reaction. Furthermore, underlying disease and the preceding treatment including autologous peripheral blood stem cell transplantation and large dosage chemotherapy might have led the patient to an immunocompromised state that responds inadequately for HEV infection. In fact, both serum levels in IgG and IgM had been indicated consistently less than lower limitation of normal ranges in the entire course (data not shown).

We should note that the present case was not revealed if the two practices had not been introduced, which are not widespread outside Japan. They are ALT screening and donor blood sample repository system. As a safety measure, the Japanese Red Cross Blood Center introduced ALT testing for a surrogate marker for non-A, non-B hepatitis virus infection. Because ALT testing contributes little for HCV infection after HCV antibody testing started, ALT screening has been discontinued in the United States and some other countries. Although the cutoff value may need to be reevaluated, the current case suggests that ALT testing may contribute to excluding blood with the presence of HEV. On the other hand, the Japanese Red Cross has established storing repository samples of all donations since 1996. Blood samples are collected from each donation and stored for 10 years at -30°C to investigate for lookback study such as the suspected cases of transfusion-transmitted infection and alloantibodies for TRALI. This system plays a very important role in the hemovigilance system in Japan.^{36,37}

In the present case of transfusion-transmitted acute hepatitis E, the infection route in the blood donor was, for the first time, clarified to be zoonotic food-borne manner. In addition, the entire course including incubation period

and disease progression in acute HEV infection was followed by serologic and virologic markers, and the patient was treated by monitoring them. To our knowledge, this is the first report for acute HEV infection in humans, in which various infection markers were prospectively monitored simultaneously with disease progression, excepting experimental hepatitis E in a volunteer.²⁸

Our data suggest that hepatitis E is likely caused by consumption of contaminated pig meat, and there is a risk of transfusion transmission of HEV in Japan. The most effective preventive measure to reduce the risk of blood-borne transmission is to screen the blood supply for HEV or to implement pathogen inactivation. The epidemiology and the transfusion-related risks for HEV infection have not been fully understood in industrialized countries including Japan. We are undertaking epidemiologic studies of HEV infection in Japanese blood donors and a feasibility study of NAT screening for HEV in Hokkaido, Japan.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patient, the donor, and his relatives who were the subjects of the family study. This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E virus. In: Knipe GM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia (PA): Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 3051-61.
- Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo PY, Knigge MF, Smalley DL, Rosenblatt JE, Desai SM, Mushahwar IK. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79:447-56.
- Worm HC, Wurzer H, Frosner G. Sporadic hepatitis E in Austria. *N Engl J Med* 1998;339:1554-5.
- Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 2001;287:9-12.
- Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, Sugai Y, Tokita H, Akahane Y, Itoh K, Gotanda Y, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol* 2002;40:3209-18.
- Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Polrson H, Dubois M, Miedouge M, Vischi F, Alric L, Vinel JP, Izopet J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 2004;74:419-24.
- Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, Dalton HR, Harrison TJ, Hill SF, Macfarlane L,

- Meigh RE, Shafi S, Sheppard MJ, Smithson J, Wilson MP, Teo CG. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* 2005;192:1166-72.
8. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371-3.
 9. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. 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;84:2351-7.
 10. Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, Inoue O, Mawatari F, Ishibashi H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 2004;40:869-70.
 11. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1958-60.
 12. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934-40.
 13. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, Masuko K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 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;74:563-72.
 14. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, Teo CG. Transfusion-transmitted hepatitis E in a "nonhyperendemic" country. *Transfus Med* 2006;16:79-83.
 15. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro M, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res* 2007;37:113-20.
 16. Colson P, Coze C, Gallan P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 2007;13:648-9.
 17. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.
 18. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
 19. Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;12:357-8.
 20. Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, Takeda N. Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* 2000;62:327-33.
 21. Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, Yoshikawa A, Mizoguchi H, Endo K, Takahashi M, Okamoto H. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol* 2007;79:734-42.
 22. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818-24.
 23. Balayan MS, Andjapardze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23-31.
 24. Kato M, Taneichi K, Matsubayashi K. A mini-outbreak of HEV infection in those who enjoyed *Yakiniku* party: one died of fulminant hepatitis. *Kanzo* 2004;45:688.
 25. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. 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;84:851-62.
 26. Takahashi K, Kitajima N, Abe N, Mishiro S. 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;330:501-5.
 27. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. 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;42:5371-4.
 28. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2005;192:930-3.
 29. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2007;88:903-11.
 30. Abe T, Aikawa T, Akahane Y, Arai M, Asahina Y, Atarashi Y, Chayama K, Harada H, Hashimoto N, Hori A. Demographic, epidemiological, and virological characteristics of hepatitis E virus infections in Japan based on 254 human cases collected nationwide. *Kanzo* 2006;47:384-91.
 31. Schattner A, Merlín G, Wallach D, Rosenberg H, Bino T, Hahn T, Levin S, Revel M. Monitoring of interferon therapy by assay of 2'-5' oligo-isoadenylate synthetase in human peripheral white blood cells. *J Interferon Res* 1981;1:587-94.
 32. Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Iwata K, Matsumoto M, Nakao K, Kanai K, Yoshida N, Baba K, Mishiro S. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch Virol* 1998;143:645-51.
 33. Mochida S, Hashimoto M, Mitsui A, Naito M, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Egashira T, Mishiro S, Fujiwara K. Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;23:1079-85.