

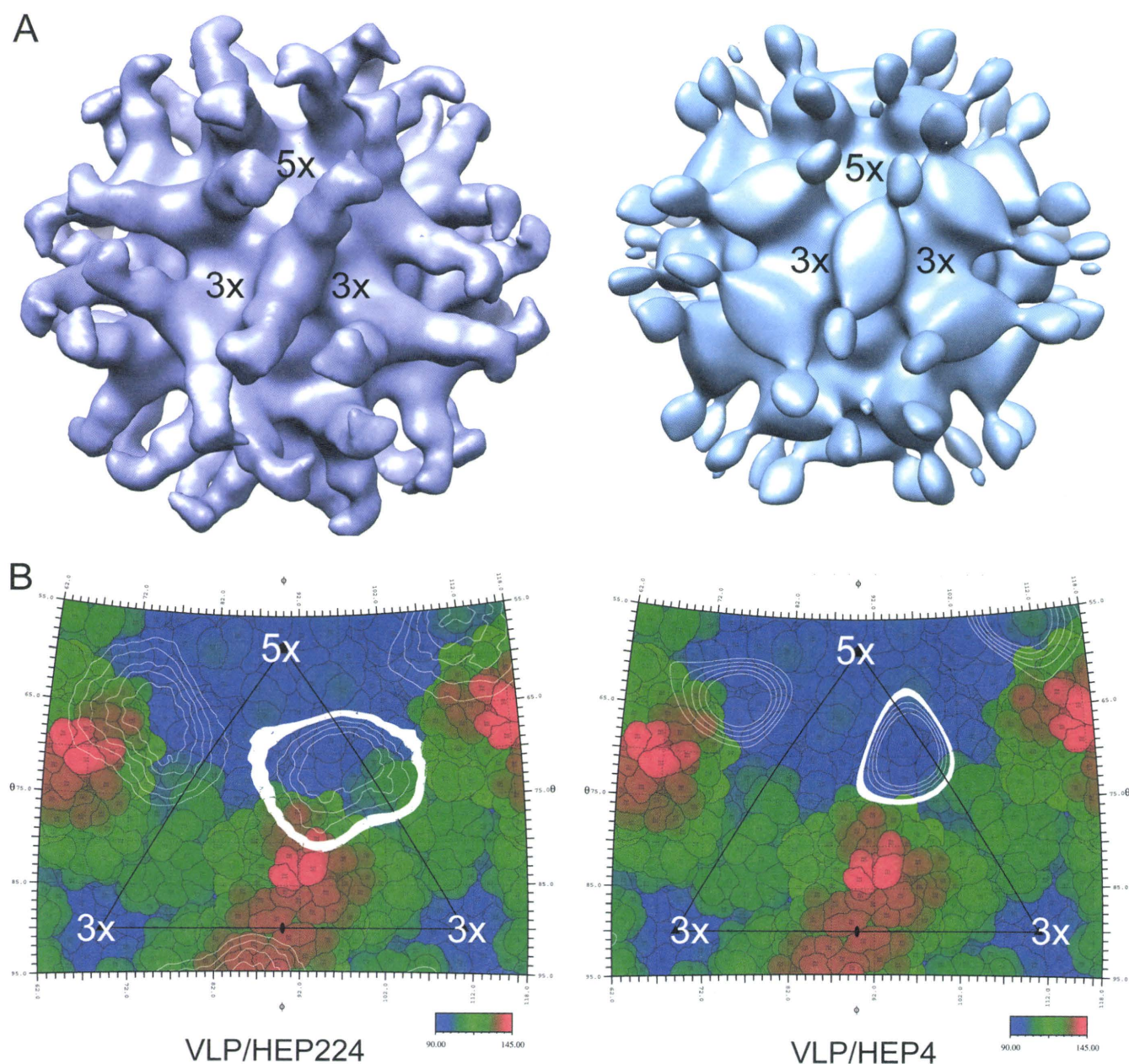


FIG. 2. The cryo-EM structure of HEV T=1 VLP in complex with anti-HEV antibodies. (A) Surface presentation of VLP-Fab224 (left) and VLP-Fab4 (right) viewed along one of the icosahedral 2-fold axes. One 5-fold axis and two adjacent 3-fold axes are marked with the corresponding number. In both reconstructions, 60 copies of Fab are attached to the lateral side of HEV VLP; however, the density of Fab4 molecules appears to be less than that of Fab224 molecules. (B) The viral surface is shown as a stereographic projection overlapped with a line drawing of an icosahedral asymmetric unit. The 5-fold and two adjacent 3-fold axes are marked with corresponding numbers, while the black triangle encloses the area of an icosahedral asymmetric unit. The surface residues are colored according to the distance from the center of the VLP, with red being the furthest away and blue representing the surface depressions. The Fab density is projected as white contour lines on the viral surface, and the outermost layer of density is drawn as thick white contour lines.

binding sites were occupied by a Fab molecule. The density corresponding to the VLP capsid was removed from the cryo-EM map, producing a Fab differential density map that was used to pinpoint the binding site of the Fab224 antibody (Fig. 3A and B).

In addition, the structure of HEV VLP in complex with the neutralizing antibody Fab4 was determined by combining 264 individual images. Fab4 precipitates both the native HEV

virion and recombinant PORF2 peptides, but the reaction depends on the presence of amino acids 597 to 607 (26). Three-dimensional reconstruction of the VLP-Fab4 complex showed 60 Fab molecules bound to each HEV VLP. Unlike the VLP-Fab224 complex, the density corresponding to Fab4 was about one-third of that of the capsid (Fig. 2A), suggesting that only 30 to 40% of the binding sites were occupied by the Fab. Moreover, the binding of Fab4 appeared to be deeper on the

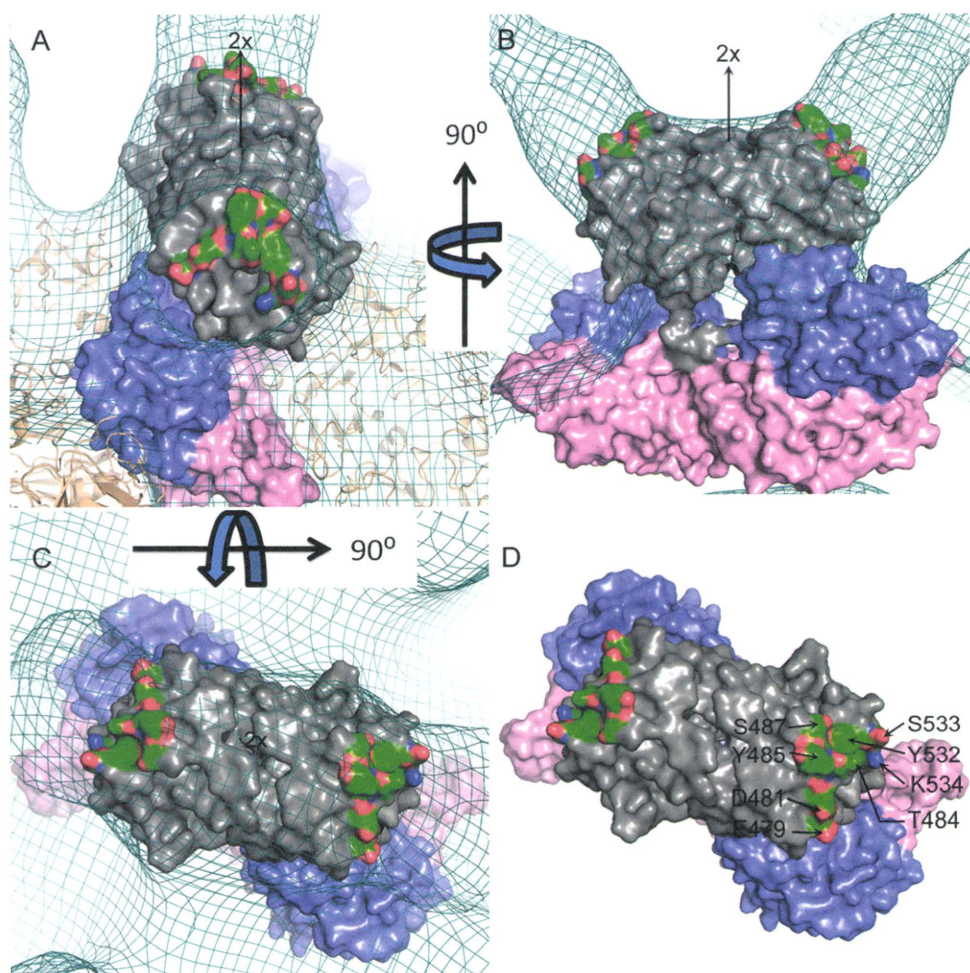


FIG. 3. The binding site of Fab224 antibody. (A) The cryo-EM density map of VLP-Fab224 was fitted with the crystal structure of PORF2 and viewed along a bound Fab molecule. One PORF2 dimer is presented as a solid surface and colored light magenta for the S domain, blue violet for the M domain, and dark gray for the P domain. The neighboring dimers are drawn in ribbon mode and colored wheat. (B) Side view of a PORF2 dimer fitted into the cryo-EM density map. (C) A PORF2 dimer viewed along the 2-fold axis and overlapped with the cryo-EM density map. (D) Top view of a PORF2 dimer viewed along the 2-fold axis. The amino acids in PORF2 responsible for binding to Fab224 are labeled. The PORF2 dimer is presented as a solid surface and colored in gray, violet, and light magenta for the P domain, the M domain, and the S domain, respectively. The residues along the Fab binding interface are colored according to the element, with green for carbon, blue for nitrogen, and red for oxygen.

side wall of the protruding domain toward the capsid shell, leaving its Fc domain exposed above the surface of the plateau (Fig. 2A). In contrast, the entire Fab224 molecule stood mainly on the top of the P domain surface. The Fab224 and the Fab4 molecules extend along the long axis of the P domain. In both cases, no steric hindrance of the Fab on the P domain with the neighboring Fab molecules at either the 5-fold or the 3-fold axes was apparent. The orientation of the Fabs relative to the plateau appeared different at a radius of 135 Å. The long axis of Fab224 tilted toward the neighboring spike, while the long axis of Fab4 pointed to the 5-fold axis (Fig. 2A).

To further analyze the Fab and HEV VLP binding interface, the crystal structure of genotype 1 PORF2 was docked onto the VLP-Fab224 cryo-EM density map. The genotype 1 PORF2 crystal structure (PDB ID 2ZZQ) is composed of three domains (31), and these domains are in good agreement with those of genotype 3 and genotype 4 PORF2 (PDB ID 2ZTN and 3HAG, respectively) (8, 32). The coordinates fitted very

well with the cryo-EM density map without any adjustment (CC value of 80%). The atoms on the surface of the HEV VLP capsid were plotted and colored according to their radial distance and overlapped with the density of the Fab at the surface plateau of the protruding spike (Fig. 2B).

The Fab224 interacted with the residues on the side of the ORF2 spike rather than with those residues on the spike's plateau surface (Fig. 3C). The contact footprint did not overlap with the dimeric interface of the PORF2 spike. As expected, Fab224 recognizes a conformational epitope, and its binding site covers a surface composed of three loops, including amino acids 470 to 493 in AB loop, amino acids 539 to 569 in CD loop, and amino acids 581 to 595 in EF loop (Fig. 3D). Residues E479, D481, T484, Y485, and S487 from the AB loop and residues Y532, S533, and K534 from the CD loop were in close contact with the Fab molecule.

Structure of HEV chimeric VLP. Chimeric HEV VLP-C-tag was constructed using a PORF2 fusion protein in which a

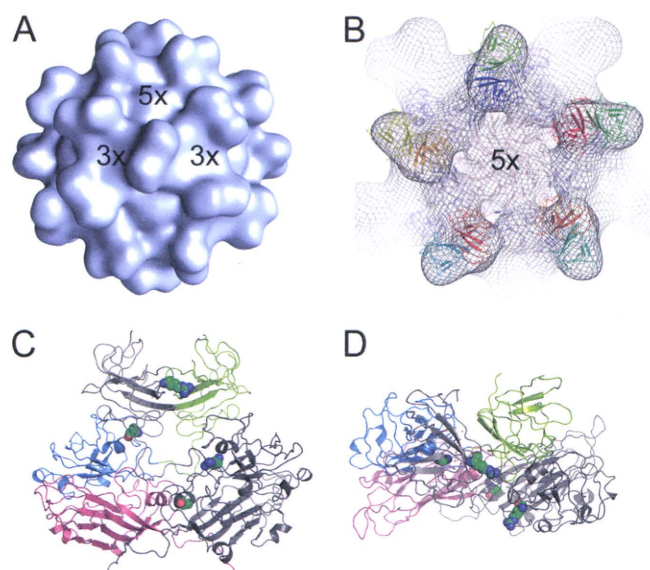


FIG. 4. The structure of the chimeric HEV VLP carrying a B-cell tag. (A) Surface presentation of VLP-C-tag viewed along an icosahedral 2-fold axis. (B) The cryo-EM density map of VLP-C-tag (mesh) was fitted with the crystal structure of the PORF2 decamer (ribbon). (C) Ribbon representation of PORF2 dimer with one monomer colored gray and the other colored pink for the S1 domain, blue for the M domain, and lime for the P domain. The amino acids prior to the four internal insertion sites are marked in sphere mode with color coding representing the elements as described in the Fig. 3 legend. (D) The top view of the PORF2 dimer, showing the location of the non-VLP insertion sites.

B-cell tag of 11 amino acids was incorporated into the C terminus of PORF2 (Fig. 1B). A total of 782 images of individual particles were used to reconstruct the final three-dimensional model of VLP-C-tag. In agreement with the previously published cryo-EM VLP structures, the surface of VLP-C-tag can

be divided into two distinct layers, an icosahedral shell and a protruding spike (Fig. 4A). The spike projects outward from the icosahedral shell and is composed of a PORF2 dimer. The distance between two adjacent spikes was ~ 76 Å as measured between the centers of the surface plateaus. These results are consistent with the measurements of VLPs obtained either from Tn5 insect cells (30) or from Sf9 insect cells (13), and no detectable density was added onto the outer surface of the spike. No RNA density was detected within the chimeric VLP-C-tag.

The crystal structure fit very well within the VLP-C-tag density map (Fig. 4B), indicating that the insertion of the C-terminal 11 amino acids inhibits neither the dimer-dimer interactions nor the formation of T=1 VLP. When the density maps were contoured to cover 100%, the radii of the S domains were roughly the same for both the VLP-C-tag and the VLP-Fab224 map, and the heights of the protruding spikes appeared similar. No density difference was observed from the docking (Fig. 5), suggesting that the inserted B-cell tag is flexible and less ordered. However, model fitting revealed that coordinates with unoccupied density appeared at the lateral side of the spike and underneath the Fab224 binding site (Fig. 5A and B), which may correspond to the inserted peptide.

DISCUSSION

HEV T=1 VLP is a vaccine candidate that induces protective immunity in nonhuman primates (12). It can also be used as an antigen carrier to deliver foreign epitopes through oral administration (20). Therefore, structural analysis of the antibody recognition sites is essential to suppress the neutralization effect of host vector-specific antibodies. For this purpose, we determined the structure of HEV VLP in complex with antibodies Fab224 (VLP-Fab224) and Fab4 (VLP-Fab4) and the structure of chimeric HEV VLP carrying a B-cell tag at the C terminus of PORF2 (VLP-C-tag). Docking the PORF2 crys-

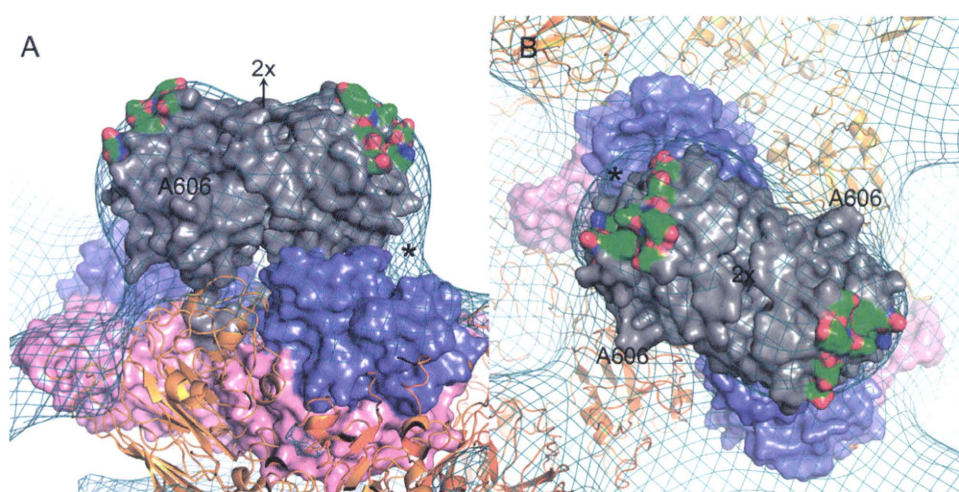


FIG. 5. Fitting of the PORF2 structure into the cryo-EM density map of HEV VLP-C-tag. The side view (A) and the top view (B) of the fitted PORF2 dimer (surface presentation) are overlapped with the cryo-EM density map of VLP-C-tag (mesh). The C-terminal residue A606 is located at the side of the protruding spike. One PORF2 dimer in the surface presentation is colored light magenta, blue violet, and gray for the S, M, and P domain, respectively. The ribbon representation shows the adjacent dimers. The amino acids in PORF2 responsible for binding to Fab224 are colored green for carbon, blue for nitrogen, and red for oxygen. Asterisks mark the location of the extra density that was not occupied with PORF2 coordinates.

tal structure provides spatial information on the HEV antigenic domain and structural guidance to better design foreign epitope insertion.

Structure of the neutralization epitopes. The antigenic properties of HEV and the mechanisms by which it is neutralized are difficult to characterize due to the lack of adequate cell culture replication systems. Therefore, our understanding of HEV immunology is mainly based on studies using recombinant proteins expressed in *E. coli* (23) and recombinant proteins or HEV VLPs generated using the baculovirus expression systems (15, 24). Data from these studies indicate that the C-terminal region of PORF2 participates in the immune response against HEV and that the HEV neutralization epitope is conformational. The minimum peptide required to induce HEV-neutralizing antibodies corresponds to a region of 148 residues in PORF2, from amino acids 459 to 607 (33). This peptide coincides with the P domain revealed in the crystal structures of PORF2. The density of the Fab in our cryo-EM structure interfaced entirely with the spikes, thus confirming that the P domain is primarily responsible for HEV antigenicity. Fab4 is a chimpanzee antibody that recognizes the ORF2 protein and was isolated from a cDNA library by using phage display (25). Fab4 binds to native HEV virions and recombinant PORF2 peptides containing amino acids 597 to 607 (26). We performed fitting with the VLP-Fab4 structure; however, the Fab4 density was too weak to conclusively determine the Fab4 binding site on the surface of HEV VLP. However, the density corresponding to the Fab4 molecule did cover amino acid 606 (data not shown). It is not clear why Fab224 appeared not to interact with peptides lacking amino acids 599 to 608 in immunoblot analysis. However, the Fab224 binding site is consistent with the critical antigenic residues determined previously using mutagenesis. It was found that double mutations that changed residues E479 and K534 or Y485 and I529 to alanine selectively abrogated PORF2's reactivity with neutralizing antibodies (11). Experiments with another set of mutants defined the same region as the HEV antigenic domain, with antibody recognition residues spreading over the AB, CD, and EF loops (32). The antibodies used in both experiments were neutralizing antibodies; therefore, the Fab224 binding surface is part of the dominant neutralization site, suggesting that the monoclonal antibody Fab224 is a neutralizing antibody. This neutralization site partially overlaps with the receptor binding site (32), and antibody binding may create spatial hindrance that prevents HEV VLPs from attaching to the cell surface.

Insertion sites for foreign epitopes. Because they are highly organized capsids that mimic the overall structure of virus particles, VLPs are a robust means by which to simultaneously carry small molecules, peptide antigenic epitopes, and DNA vaccines from heterogeneous sources to target disease sites. However, this rational vaccine design relies on excellent VLP structural information so that epitopes can be effectively conjugated to the VLP surface. In a previous study, rather than selecting PORF2 insertion sites on the basis of structural information, six insertion sites were selected according to restriction enzyme sites located either internally (four sites) or in the N or C terminus of PORF2. The internal sites are located after residues A179, R366, A507, and R542. Fusion proteins carrying insertions at sites A179 and R336 completely failed to produce VLPs, and insertions at A507 and R542 greatly re-

duced VLP production (20). Crystal structure data revealed that the spatial position of these sites is disadvantageous. Residue A179 is located in the S domain in the middle of an α -helix, which is necessary for the integrity of the S domain and its interaction with the 2-fold-related neighboring subunit. R366 is located in the M domain and favors electrostatic interaction with residue E386 from the 3-fold-related neighboring subunit. Although located within the P domain, the side chain of R542 is within the dimeric interface and guides the hydrophobic interaction of the two monomers. Replacement of R542 may misalign the orientation between two P domains and weaken the dimeric interaction between PORF2 proteins. Residue A507 in the P domain plays an important role in maintaining P domain orientation by fixing the angle of the long proline-rich hinge. Moreover, none of the four residues are exposed on the surface of VLPs, although some of them are located on the surface of individual PORF2 subunits (Fig. 4C and D). Therefore, the insertion of a foreign sequence at these sites does not interfere with the expression of individual proteins but, rather, hinders the assembly of HEV VLPs. The crystal structure revealed that the C terminus is exposed on the surface of VLPs, while the N terminus points toward the VLP center. Therefore, insertion at these two sites does not inhibit VLP assembly; however, the C terminus is more suitable for tethering bulky foreign antigenic sequences, as was shown in a previous report (20).

The cryo-EM structure of the chimeric HEV VLP-C-tag suggested that the B-cell tag was located at the lateral side of the spike, not far from residue A606 (C-terminal end in the crystal structure) (Fig. 5A). This density is located beneath the Fab224 binding site but nonetheless overlaps with the potential binding site of Fab4. As a result, the insertion of the 11-amino-acid B-cell sequence may leave the HEV antigenic site partially open and accessible to the host immune system. This explains why mice can develop antibodies against both HEV and the foreign epitope after oral administration of VLP-C-tag (20).

In conclusion, the cryo-EM structures of VLP-Fab224 identified the lateral surface of the P domain as the recognition site for anti-HEV neutralizing antibodies. The insertion of a B-cell epitope at the PORF2 C terminus does not interfere with T=1 VLP assembly. Thus, T=1 HEV VLPs are a novel tool for oral vaccine delivery, as they constitute nonreplicating entities that can induce mucosal immunity without adjuvant. The induction of antibodies against both HEV and the target disease is an additional advantage of this delivery system.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Kato for assistance with antibody preparation and N. Miyazaki for initial model fitting of the P domain structural density.

This project was supported in part by grants from the STINT Foundation, the Medical Research Council, and the PIOMS Institutional Program to R.H.C. This study was also partly funded by a grant from the Swedish Research Council to L.X. J.C.W. and L.X. were supported by grants from the Cancer Research and Discovery Programs, respectively. J.C.W. was initially supported by a grant from NSC as an exchange student under the cosupervision of D. M. Liou and Y. J. Sung.

REFERENCES

1. Adler, B., and S. Faine. 1983. A pomona serogroup-specific, agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. *Pathology* 15: 247-250.

2. Baker, T., and H. Cheng. 1996. A model based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**:120–130.
3. Bendall, R. P., V. Ellis, S. Ijaz, P. Thuraiajah, and H. R. Dalton. 2008. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J. Med. Virol.* **80**:95–101.
4. Crowther, R. A. 1971. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **261**:221–230.
5. DeLano, W. L. 2002. The PYMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA.
6. Deshmukh, T. M., K. S. Lole, A. S. Tripathy, and V. A. Arankalle. 2007. Immunogenicity of candidate hepatitis E virus DNA vaccine expressing complete and truncated ORF2 in mice. *Vaccine* **25**:4350–4360.
7. Emerson, S., P. Clemente-Casares, N. Moiduddin, V. A. Arankalle, U. Torian, and R. Purcell. 2006. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J. Gen. Virol.* **87**:697–704.
8. Guu, T., Z. Liu, Q. Ye, D. Mata, K. Li, C. Yin, J. Zhang, and Y. Tao. 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:12992–12997.
9. Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan, and M. Kjeldgaard. 1991. Improved method for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**(Pt. 2):110–119.
10. Khuroo, M. S., and M. S. Khuroo. 2008. Hepatitis E virus. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**:539–543.
11. Li, S., S. Tang, J. Seetharaman, C. Y. Yang, Y. Gu, J. Zhang, H. Du, J. W. Shih, C. L. Hew, J. Sivaraman, and N. S. Xia. 2009. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. *PLoS Pathog.* **5**:e1000537.
12. Li, T.-C., Y. Suzuki, Y. Ami, T. N. Dhole, T. Miyamura, and N. Takeda. 2004. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* **22**:370–377.
13. Li, T.-C., N. Takeda, T. Miyamura, Y. Matsuura, J. C. Y. Wang, H. Engvall, L. Hammar, L. Xing, and R. H. Cheng. 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **79**:12999–13006.
14. Li, T., N. Takeda, and T. Miyamura. 2001. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* **19**:3476–3484.
15. Li, T. C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M. A. Razak, T. Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **71**:7207–7213.
16. Maloney, B. J., N. Takeda, Y. Suzuki, Y. Ami, T. C. Li, T. Miyamura, C. J. Arntzen, and H. S. Mason. 2005. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* **23**:1870–1874.
17. Minuk, G. Y., A. Sun, D. F. Sun, J. Uhanova, L. E. Nicolle, B. Larke, and A. Giulivi. 2007. Serological evidence of hepatitis E virus infection in an indigenous North American population. *Can. J. Gastroenterol.* **21**:439–442.
18. Mushahwar, I. K. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* **80**:646–658.
19. Naik, S. R., R. Aggarwal, P. N. Salunke, and N. N. Mehrotra. 1992. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull. World Health Organ.* **70**:597–604.
20. Niikura, M., S. Takamura, G. Kim, S. Kawai, M. Saijo, S. Morikawa, I. Kurane, T. C. Li, N. Takeda, and Y. Yasutomi. 2002. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* **293**:273–280.
21. Pavio, N., and J. M. Mansuy. 2010. Hepatitis E in high-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**:521–527.
22. Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**:1605–1612.
23. Riddell, M. A., F. Li, and D. A. Anderson. 2000. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* **74**:8011–8017.
24. Robinson, R. A., W. H. Burgess, S. U. Emerson, R. S. Leibowitz, S. A. Sosnovtseva, S. Tsarev, and R. H. Purcell. 1998. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **12**:75–84.
25. Schofield, D. J., J. Glamann, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2000. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J. Virol.* **74**:5548–5555.
26. Schofield, D. J., R. H. Purcell, H. T. Nguyen, and S. U. Emerson. 2003. Monoclonal antibodies that neutralize HEV recognize an antigenic site at the carboxyterminus of an ORF2 protein vaccine. *Vaccine* **22**:257–267.
27. Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J. L. Gerin, and R. H. Purcell. 1997. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* **15**:1834–1838.
28. Worm, H. C., and G. Wirsberger. 2004. Hepatitis E vaccines: progress and prospects. *Drugs* **64**:1517–1531.
29. Xiao, C., and M. G. Rossmann. 2007. Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections. *J. Struct. Biol.* **158**:181–186.
30. Xing, L., K. Kato, T. Li, N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R. H. Cheng. 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* **265**:35–45.
31. Xing, L., T. C. Li, N. Miyazaki, M. N. Simon, J. S. Wall, M. Moore, C. Y. Wang, N. Takeda, T. Wakita, T. Miyamura, and R. H. Cheng. 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J. Biol. Chem.* **285**:33175–33183.
32. Yamashita, T., Y. Mori, N. Miyazaki, H. Cheng, M. Yoshimura, H. Unno, R. Shima, K. Moriishi, T. Tsukihara, T. C. Li, N. Takeda, T. Miyamura, and Y. Matsuura. 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:12986–12991.
33. Zhou, Y. H., R. Purcell, and S. Emerson. 2005. A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and nonvaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine* **23**:3157–3165.

<短 報>

札幌圏内小流行 4 型 HEV 株が検出された茨城県内 E 型肝炎の 1 例

相川 達也^{1)*} 池澤 和人²⁾ 間宮 孝²⁾ 上野ちさと¹⁾ 和田由美子¹⁾
島田 沙香¹⁾ 津田 文男¹⁾ 高橋 雅春³⁾ 岡本 宏明³⁾

緒言：我が国において、土着の E 型肝炎ウイルス (HEV) による急性肝炎の存在が認知されて 10 年が経過したが、病態や感染実態の把握、感染予防対策の確立の観点から、E 型肝炎症例の蓄積は今なお重要である。報告例の多くは生あるいは加熱不十分な動物の肉や内臓を食したことによる人獣共通感染症としての国内感染例であるが、依然として感染源を特定できない症例も少なくない。2009 年の 9 月から 10 月にかけて、北海道の長沼町や北広島市を含む札幌圏内で同一クラスターに属する 4 型 HEV の小流行が発生し本誌に報告された¹⁾。しかし、その小流行が終息したか否かは不明であった。我々は最近、茨城県在住の E 型肝炎患者から小流行株と同一の 4 型 HEV 株を分離した。当該患者は発症 2 週間前の 2009 年 12 月に北海道を訪れており、旅行先での感染である可能性が極めて高いと判断した。小流行の継続を示唆する事例に遭遇し、注意を喚起したく、また HEV 感染者の感染源や感染地を同定するには HEV 株の遺伝子解析や国内の旅行地を含めた詳細な病歴聴取が有用であると考えられ、ここに報告する。

症例：症例はつくば市在住の 34 歳男性。2010 年 1 月 2 日から発熱と嘔吐、全身倦怠感があり、近医により黄疸と肝機能異常を指摘され、紹介入院となった。初診時 (1 月 8 日)、眼球結膜の黄染と肝の軽度腫大がみられたほかには、他覚所見の異常は認められなかった。海外渡航歴はなく、ペットの飼育歴もなかった。また、肝疾患を含む既往歴に特記すべきものはないが、約 14 年間の飲酒歴 (ビール 1500 ml/日) があった。初診時の異常検査値：AST 8,550 IU/L, ALT 10,330 IU/L, LDH 3,780 IU/L, γ -GTP 310 IU/L, ALP 553 IU/L, T-Bil 5.2 mg/dl, D-Bil 4.2 mg/dl, 血小板 9.3×10^4 /dl,

PT 53.0% であった。

患者は肝炎発症の 17 日前の 2009 年 12 月 16 日に空路で北海道を訪れ、4 日間道南 (千歳、浦河、苫小牧) を旅行した。その間、調理した鹿肉や所謂「焼き鳥」(これには豚肉が使われている由) などを喫食した。

結果と考察：IgM クラス HAV 抗体、HBs 抗原、及び HCV 抗体が陰性であったが、IgM 及び IgA クラスの HEV 抗体²⁾は共に OD 値 >3.000 (EIA 法) の高値陽性であった。HEV RNA も HEV ORF2 領域 (412 塩基長 [accession no. AB573638]) の RT-PCR³⁾により陽性であり、genotype は 4 型と判定された。更に ORF1 領域の RT-PCR³⁾に供し、増幅産物の塩基配列 [accession no. AB573637] を札幌小流行株 (new Sapporo strain) と比較解析した結果、同一クラスターに属し、本症例の HEV 株 (HE-JA10-0350) は 8 株中 6 株と 100% の一致率を示した (Fig. 1)。北海道の小流行例では 2 例が重症化したが、この症例も ALT 値が 10,000 IU/L を超え、PT 値も 53% まで下降した (Table 1)。幸い、脳症の出現もなく、入院後徐々に ALT 値も回復し治療した。この症例は HEV の遺伝子解析を行わない限り、つくば市近在での感染と推測されるに留まった可能性が高い。しかし、同一株の感染による小流行例の症例報告¹⁾がなされていたこと、病歴聴取から推定された感染地と矛盾しない特徴的な HEV 株を分離できたことが、本症例での感染地の特定に有益であったと考えられる。本症例は札幌市や長沼町、北広島市など小流行株による E 型肝炎の発症が報告された地域を訪れていない。また、小流行が認められた時期よりも 2 カ月のちに感染したと推測される。したがって、この “new Sapporo strain” が小流行として同定されたのは氷山の一角に過ぎず、感染者は顕性・不顕性にかかわらず少なくとも道央・道南に広範囲に分布している可能性が示唆され、12 月以降も感染が続いている可能性を否定できない。今後も注意深い経過観察が重要である。

我々はアジアの複数国に渡航し、帰国後に E 型肝炎を発症した症例について、本症例と同様のアプローチ

1) 相川内科病院

2) 筑波記念病院消化器内科

3) 自治医科大学感染・免疫学講座ウイルス学部門

*Corresponding author: tt.aikawa@ops.dti.ne.jp

<受付日2010年8月9日><採択日2010年8月18日>

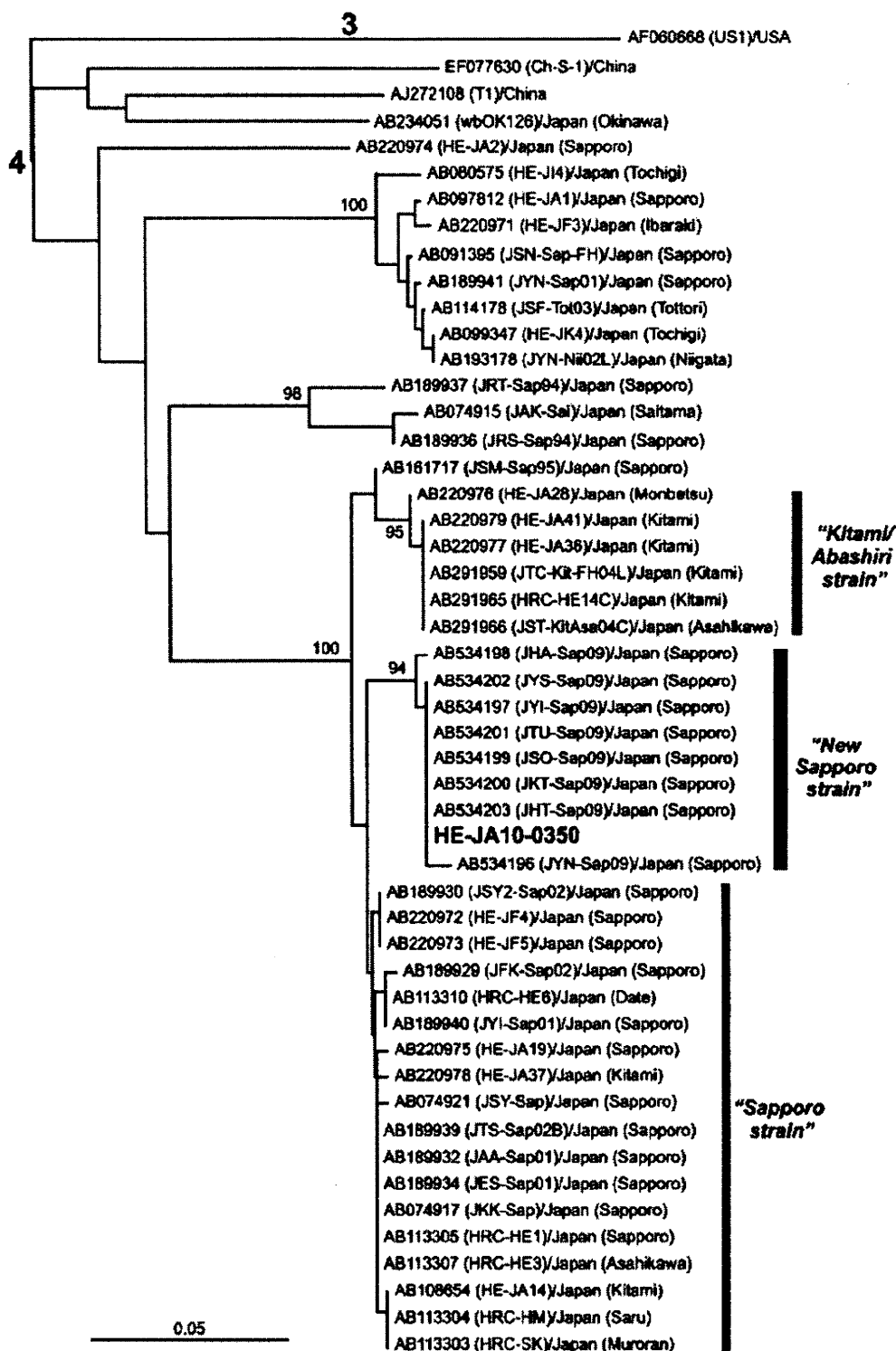


Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method based on the partial nucleotide sequence (326 nt) of the ORF1 region of 59 HEV isolates. The HEV isolate (HE-JA10-0350) obtained in this study, is indicated by bold type for visual clarity. Bootstrap values of > 70% are indicated for the major nodes as a percentage of the data obtained from 1,000 resamplings.

Table 1 Laboratory parameters, anti-HEV and HEV RNA in serum samples obtained periodically from the patient with hepatitis E

Date	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	T-Bil (mg/dl)	D-Bil (mg/dl)	PT (%)	PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	Anti-HEV (OD450)			HEV RNA (genotype)
							IgG	IgM	IgA	
2010/1/8	8,550	10,330	5.2	4.2	53	9.3	0.967 (+)	> 3.000 (+)	> 3.000 (+)	+ (4)
2010/1/9	4,080	8,240	5.2	4.3	61	12.3	0.816 (+)	> 3.000 (+)	> 3.000 (+)	+
2010/1/10	1,582	5,020	4.8	4.1	80	17.2	0.778 (+)	> 3.000 (+)	> 3.000 (+)	+
2010/1/11	722	3,970	4.1	3.7	85	18.5	0.975 (+)	> 3.000 (+)	> 3.000 (+)	+
2010/3/9	18	19	0.9	NT	86	18.4	NT	NT	NT	NT
2010/4/13	24	28	0.9	0.3	87	17.4	> 3.000 (+)	0.683 (+)	0.425 (-)	-

NT: not tested

によって、感染地をネパールと特定しえたことを報告している⁴⁾。HEV感染者の感染源や感染経路を同定するにはHEV株の遺伝子解析が有用であると同時に、本症例が示すように居住地のみでの感染とは限らないことから、潜伏期間中の移動（旅行）による滞在先及びそこでの食事の内容を含めた詳細な病歴聴取が重要である。

索引用語：HEV感染，国内感染，分子系統解析

文献：1) 姜 貞憲，松居剛志，佐賀啓良，他．肝臓 2010；51：51—53 2) Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, et al. J Clin Microbiol 2005; 43: 49—56 3) Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al. J Clin Microbiol 2002; 40: 3209—3218 4) 相川達也，宮本久仁子，上野ちさと，他．肝臓 2007；48：15—21

英文要旨

A case of domestic hepatitis E living in Ibaraki Prefecture who was suspected to contract infection of a new Sapporo HEV strain while traveling in Hokkaido

Tatsuya Aikawa^{1)*}, Kazuto Ikezawa²⁾,
Takashi Mamiya²⁾, Chisato Ueno¹⁾,
Yumiko Wada¹⁾,
Suzuka Shimada¹⁾, Fumio Tsuda¹⁾,
Masaharu Takahashi³⁾,
Hiroaki Okamoto³⁾

We encountered a 34-year-old man who developed domestic infection of genotype 4 hepatitis E virus (HEV) in January 2010 two weeks after traveling to Hokkaido, where a series of sporadic cases of hepatitis E (n=8) had been noted between September and October in 2009 (Kanzo 51:51-53, 2010). The HEV isolate recovered from our patient segregated into a cluster of new Sapporo strains consisting of those recovered from the 8 reported patients, with up to 100% identity, suggesting the wider and continuing spread of the particular strain in Hokkaido. In addition to routine test for hepatitis E, detailed interview and phylogentic analysis of HEV strains should be considered for identifying sources of infection and modes of infection transmission.

Key words: HEV infection, domestic infection, phylogenetic analysis

Kanzo 2010; 51: 579—581

- 1) Aikawa Internal Medicine Hospital
- 2) Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Tsukuba Memorial Hospital
- 3) Division of Virology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University School of Medicine

*Corresponding author: tt.aikawa@ops.dti.ne.jp

<速 報>

従前未知の遺伝子型 “genotype 5” を代表すると思われる野生猪由来
E 型肝炎ウイルス塩基配列高橋 和明¹⁾ 寺田 修三²⁾ 國立 裕之³⁾ 新井 雅裕¹⁾ 三代 俊治^{1)*}

緒言：我々は、静岡県野生猪 140 頭を調べ、HEV RNA 陽性を示した 5 例のうち 3 例は genotype 4, 1 例は genotype 3, 残る 1 例の genotype は「不明」と報告した¹⁾。而るに此の「不明例」の HEV は 1 型から 4 型までの既知 genotype には属し得ず、新規「5 型」のプロトタイプたるべき塩基配列を有していることが判明したので報告する。

対象と方法：静岡県浜松市天竜区の山林で 2009 年 2 月 1 日に捕獲された体重約 10 kg の雄猪 (ID#135) の血清から HEV RNA を抽出し、ORF1 領域内 326 塩基の配列を決定した (isolate name は JBOAR135-Shiz09, accession number は AB573435)。既知配列との比較は Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW に依り、系統樹は Unrooted N-J Tree 法で描いた。

結果：JBOAR135-Shiz09 は既知 1~4 型 genotype のどれにも属し得ぬ配列を有していることが、系統樹解析 (Fig. 1) から示唆された。同様の示唆は JBOAR135-Shiz09 と 1~4 型 HEV 既報株との間の nucleotide identity (72.7-76.4% vs G1, 75.5% vs G2, 71.2-78.2% vs G3, 74.9-78.2% vs G4) から得られた。最近注目のウサギ由来 HEV²⁾ (GDC9 と GDC46) は我々の系統樹解析では genotype 3 の中に入り (Fig. 1 参照), JBOAR135-Shiz09 との nucleotide identity も G3 に相応しい値 (75.5~77.3%) を示した。

以上の示唆は ORF2 領域の 412-nt sequence の解析 (data not shown) によっても再現された。

考察：愛知県から静岡県西部にかけての地域は、本州には稀な HEV genotype 4 がヒトから^{3,4)}も野生猪から^{1,5)}も見つかる特異なエリアとして予てより注目されて来たが、今回この地域内 (正確には浜松市天竜区の山林) に棲む野生猪から genotype 5 と推定される HEV 株が採取されたことは、この地域への我々の関心を一層強く惹起する。更に探せば、もっと珍奇な HEV 株が見つかるかもしれない。

今回見つけた HEV-G5 がヒトやブタにも感染可能か否かの実証は今後の課題であり、ヒト細胞や動物を用いた感染実験の為にも、HEV-G5 のプロトタイプとしての JBOAR135-Shiz09 の全長ゲノム塩基配列決定が急務である。

索引用語：E 型肝炎ウイルス、遺伝子型、野生猪

文献：1) 寺田修三, 國立裕之, 高橋和明. 治療学 2010 ; 44 : 1046—1049 2) Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, et al. J Med Virol 2009; 81: 1371—1379 3) 清水裕子, 山田正彦, 立松英純, 他. 肝臓 2006 ; 47 : 465—473 4) 川村欣也, 小林良正, 早田謙一, 他. 肝臓 2010 ; 51 : 418—424 5) 伊藤 雅, 小林慎一, 山下照夫, 他. 肝臓 2006 ; 47 : 316—318

1) 東芝病院

2) 焼津市立総合病院

3) 京都桂病院

*Corresponding author: shunjimishiro@po.toshiba.co.jp

<受付日2010年8月6日><採択日2010年8月9日>

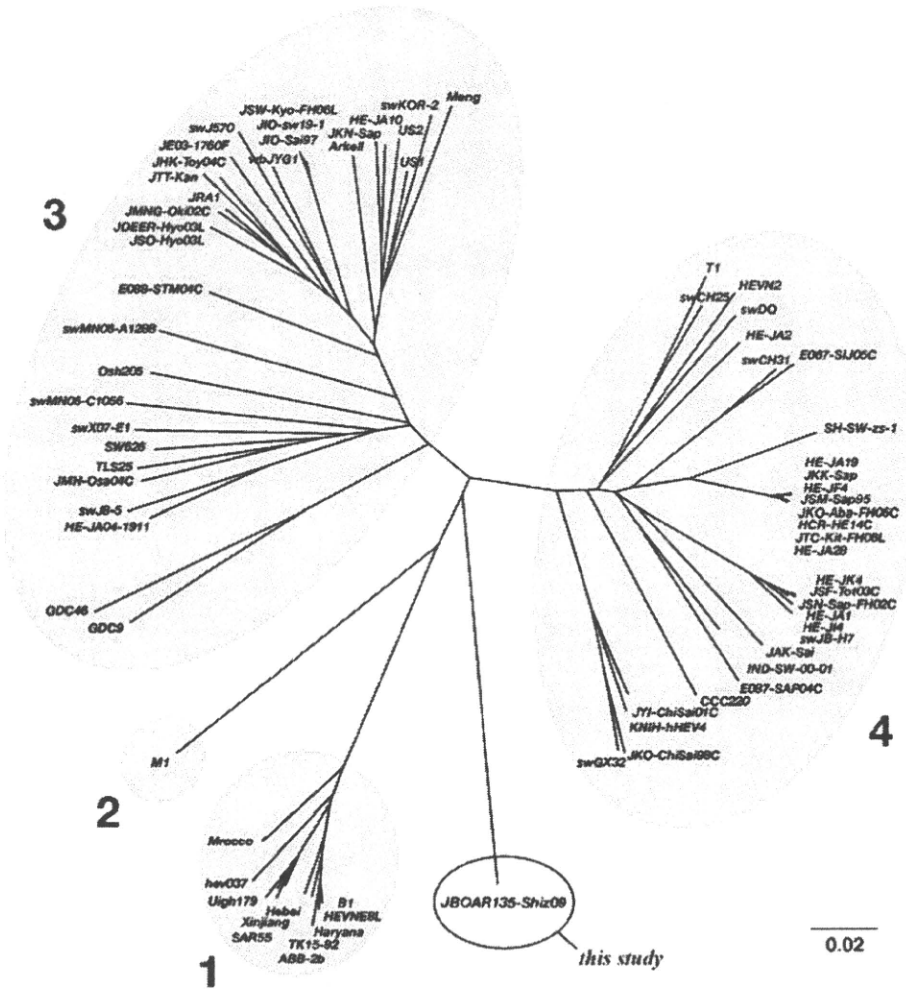


Fig. 1 Phylogenetic tree (CLUSTALW Unrooted N-J Tree Method) of HEV based on 326-nt sequence within ORF1. Sequences compared with our JBOAR135-Shiz09 are as follows;
 Genotype 1: B1-Burma (M73218), HEVNE8L-Myanmar (D10330), Haryana-India (AF459438), TK15-92-Nepal (AF051830), ABB-2b-Pakistan (AF185822), Hebei-China (M94177), Xinjiang-China (D11092), SAR55-Pakistan (M80581), Uigh179-China (D11093), hev037-India (X98292), Morocco-Morocco (AY230202). Genotype 2: M1-Mexico (M74506). Genotype 3: US1-USA (AF060668), Meng-USA (AF082843), swKOR-2-Korea (FJ426404), US2-USA (AF060669), HE-JA10-Japan (AB089824), JKN-Sap-Japan (AB074918), Arkell-Canada (AY115488), JIO-Sai97L-Japan (AB291951), JIO-swJ19-1-Japan (AB443623), JSW-Kyo-FH06L-Japan (AB291955), wbJYG1-Japan (AB222184), swJ570-Japan (AB073912), JE03-1760F-Japan (AB301710), JHK-Toy04C-Japan (AB291962), JTT-Kan-Japan (AB091394), JRA1-Japan (AP003430), JMNG-Oki02C-Japan (AB236320), JDEER-Hyo03L-Japan (AB189071), JSD-Hyo03L-Japan (AB189073), E088-STM04C-Japan (AB369689), swMN06-A1288-Mongolia (AB290312), Osh205-Kyrgyzstan (AF455784), swMN06-C1056-Mongolia (AB290313), swX07-E1-Sweden (EU360977), SW626-Spain (EU723512), TLS25-France (EU49514), JMH-Osa04C-Japan (AB291961), swJ8-5-Japan (AB248521), HE-JA04-1911-Japan (AB248520), GDC9-China (FJ906895), GDC46-China (FJ906896). Genotype 4: T1-China (AJ272108), swCH25-China (AY594199), HEVN2-Japan (AB253420), swDQ-China (DQ279091), HE-JA2-Japan (AB220974), swCH31-China (DQ450072), E067-SIJ05C-China/Japan (AB369690), SH-SW-zs1-China (EF570133), HE-JA19-Japan (AB220975), JKK-Sap-Japan (AB0749176), HE-JF4-Japan (AB220972), JSM-Sap95-Japan (AB161717), JKO-Aba-FH06C-Japan (AB291967), HRC-HE14C-Japan (AB291965), JTC-Kit-FH04L-Japan (AB291959), HE-JA28-Japan (AB220976), HE-JK4-Japan (AB099347), JSF-Tot03C-Japan (AB19317), JSN-Sap-FH02C-Japan (AB20239), HE-JA1-Japan (AB197812), HE-JI4-Japan (AB080575), swJB-H7-Japan (AB481227), JAK-Sai-Japan (AB074915), IND-SW-00-01-India (AY723745), E087-SAP04C-Japan (AB369688), CCC220-China (AB108537), JYI-ChiSai01C-China/Japan (AB197674), KNIH-hHEV-Korea (FJ763142), JKO-ChiSai98C-China/Japan (AB197673), swGX32-China (EU366959).

英文要旨

A wild boar-derived hepatitis E virus isolate
presumably representing so far unidentified
“genotype 5”

Kazuaki Takahashi¹⁾, Shuzo Terada²⁾,
Hiroyuki Kokuryu³⁾, Masahiro Arai¹⁾,
Shunji Mishiro^{1)*}

A peculiar nucleotide sequence of HEV RNA was recovered from a wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) of male sex with about 10 kg of body weight, captured 1-Feb-2009 in the forest of Tenryu-ku, Hamamatsu, Shizuoka, Japan. The sequence (JBOAR135-Shiz09, accession number AB573435) showed only less than 80% nucleotide identity to so far reported sequences of HEV genotype 1 through 4 (72.7-76.4% vs G1, 75.5% vs G2, 71.2-78.2% vs G3, 74.9-78.2% vs G4) and also to the rabbit HEV isolates recently reported from China (75.5-77.3%). Since the rabbit HEV segregates to genotype 3 in the present phylogenetic analysis (CLUSTALW Unrooted N-J Tree Method), we propose our JBOAR135-Shiz09 isolate as the first member of new genetic group of HEV, “genotype 5”.

Key words: hepatitis E virus, genotype, wild boar

Kanzo 2010; 51: 536—538

1) Toshiba General Hospital

2) Yaizu City Hospital

3) Kyoto Katsura Hospital

*Corresponding author: shunjimishiro@po.toshibaco.jp

イノシシ肝の喫食による重症 E 型肝炎の一例

寺田修三 国立裕之 高橋和明

日本で分離される E 型肝炎ウイルス (HEV) の多くは genotype 3 と 4 であるが、genotype 4 は病原性が強く重症化しやすい点が臨床上重要である。genotype 4 は北海道での感染例が多いが、日本各地で genotype 4 の散発例による重症肝炎が報告されている。本症例は静岡県において発症した HEV genotype 4 による重症 E 型肝炎であり、入院時より積極的な人工肝補助療法を行い救命しえた。

はじめに

E 型肝炎は *Hepeviridae* に属する RNA ウイルスである。イノシシ、シカ、ブタなどの感染動物を介した経口感染により発症する肝炎であり、人畜共通感染症として注目されている。E 型肝炎は近年増加傾向にあり、非 ABC 急性肝炎において約 10% を占めるとされているが、保険適応となる診断系がないため、過少診断されている可能性が高い。

本症例は静岡県において発症した genotype 4 の重症 E 型肝炎の一例であり、イノシシ肝の喫食が原因と推定された。著明な肝逸脱酵素の上昇を認めたため、早期から人工肝補助療法およびステロイドパルス療法を行ったことで救命しえたと考えている。系統樹では日本土着型ではなく、中国型の HEV genotype 4 が同定された。静岡県の野生イノシシ 140 頭について、HEV 感染状況を調査した結果も併せて報告する。

症 例

患 者：54 歳，男性。
主 訴：全身倦怠感，発熱。
既往歴：胆嚢摘出術後。
家族歴：特記事項なし。
生活歴：機会飲酒，海外渡航歴なし，輸血歴なし。
現病歴：X 年 9 月に静岡県中部地区で捕獲され

た野生イノシシの肝臓を焼いて喫食した。約 3 週間後より全身倦怠感，38℃台の発熱，褐色尿が出現した。喫食の約 1 か月後に近医にて著明な肝逸脱酵素の上昇 (AST 8206 U/L，ALT 6604 U/L) を指摘されたため，当院紹介受診となった。

入院時現症：身長 184 cm，体重 73.3 kg。意識清明，眼球結膜および皮膚黄染あり，羽ばたき振戦なし，肝脾触知せず，神経学的異常所見なし。

入院時検査結果 (表 1)：T-bil 6.2 mg/dL，D-bil 4.7 mg/dL と直接型優位の黄疸をみとめ，AST 17090 U/L，ALT 13440 U/L と肝逸脱酵素が著明に上昇していた。PT 39% と著明な凝固系異常をみとめた。入院時の各種肝炎ウイルスの検索はいずれも陰性であった。

腹部 CT：肝実質の CT 値の軽度上昇あり，肝萎縮や腹水はみとめない。

腹部 US：軽度肝腫大あり。

入院後経過：入院時において肝性脳症はみとめないものの，PT 39%，AST 17090 U/L，ALT 13440 U/L とプロトロンビン活性の低下と急激な肝細胞破壊があり，急性肝炎重症型と診断した。予測劇症化率 28.2%，与芝の式でも非劇症化と判定されたが，トランスアミナーゼ値が非常に高いことから，劇症化の可能性が高いと考えた。入院日より積極的に血漿交換 3 日間，血液濾過透析 4 日間による人工肝補助療法およびステロイドパルス療法 (メチルプレドニ

てらだ しゅうぞう：焼津市立総合病院 消化器科，こくりゅう ひろゆき：京都桂病院 消化器内科，たかはし かずあき：東芝病院 研究部

表 1 入院時検査所見

[血算]		ALT	13440 U/L	HSV IgG	陰性
WBC	5900/ μ L	LDH	12400 U/L	EBNA 抗体	陰性
Hb	16.7 g/dL	ALP	1083 U/L	EB VCA IgM	陰性
Plt	10.0 万/ μ L	γ -GTP	445 U/L	EB VCA IgG	20 倍
[凝固]		CHE	295 U/L	HEV-RNA	陽性
PT	39%	AFP	3.0 ng/mL	HEV-IgG	陽性
APTT	42.8 秒	フェリチン	129700 ng/mL	HEV-IgM	陽性
FDP	35.9 μ g/mL	劇症化予測確率*	28.20%	HEV-IgA	陽性
D-dimer	14.4 μ g/mL	与芝の式	非劇症化	HEV genotype	4
[生化学]		[ウイルス]		Isolate Name	JKM-Shiz08R
TP	8.0 g/dL	HCV 抗体	陰性	[免疫]	
Alb	4.1 g/dL	HCV-RNA 定量	陰性	抗ミトコンドリア抗体	20 倍
T-bil	6.2 mg/dL	HBs 抗原	陰性	抗核抗体	40 倍
D-bil	4.7 mg/dL	IgM HBc 抗体	陰性	RF	<5.0 IU/mL
BUN	14 mg/dL	HA IgM 抗体	陰性	IgG	1412 mg/dL
CRE	0.86 mg/dL	CMV-IgM	陰性	IgM	259 mg/dL
NH ₃	46 μ g/dL	CMV-IgG	20 倍		
AST	17090 U/L	HSV-IgM	陰性		

*岩手医大第一内科および厚生労働省登録システムによる急性肝炎劇症化予測式

ゾロン 1000 mg 3 日間) を施行した。第 2 病日には PT 31% に低下、肝性脳症 I 度が出現し、予測劇症化率は 39.7% に悪化した。第 3 病日には NH₃ 132 μ g/dL に上昇し、第 5 病日には T-bil 9.2 mg/dL まで上昇したものの、その後は徐々に改善していった。第 15 病日の造影 CT では肝萎縮や腹水などはみられず、第 16 病日に施行した肝生検では急性肝炎回復期の像のみであった。肝機能がほぼ正常化 (PT 88%, T-bil 1.7 mg/dL, AST 30 U/L, ALT 82 U/L) したため、第 25 病日に退院となった。

HEV 抗体・HEV-RNA の検出と解析: イノシシ喫食歴から E 型肝炎の疑いがあったので、入院時に凍結保存されていた血清について HEV-IgA, HEV-IgG, HEV-IgM, HEV-RNA の測定を行ったところ、いずれも陽性であった。HEV-RNA は ORF1 内のレプリカーゼ領域 821 塩基の塩基配列を決定し、系統樹解析を行った (図 1)。本症例から分離された株は genotype 4 に属していたが、日本土着型ではなく中国からの分離株に近似していた。

考 察

近年、日本を含めた先進国諸国において、熱帯地方の E 型肝炎流行地域とは genotype の異なる HEV 株による国内感染が明らかになってきた¹⁻³⁾。

日本で同定された HEV は輸入感染例を除き genotype 3 と 4 の 2 種類であり、全国に広く分布する genotype 3 と比して北海道に偏在する genotype 4 のほうが強い病原性を有している⁴⁾。日本において 2003 年にシカ⁵⁾、2005 年にイノシシ⁶⁾からの HEV 感染が相次いで直接証明されたことで HEV の感染経路は明らかになりつつあるが、阿部ら⁴⁾によると、HEV の感染経路は動物由来食感染が約 30%、輸入感染が 8%、輸血感染が 2%⁷⁾と報告され、依然として約 60% の感染経路は不明である。

本症例では血清学的検査と病歴から、ABC 型肝炎や薬剤性、自己免疫性肝炎は否定的であり、イノシシ肝の喫食歴から HEV 感染を疑ったことで診断に至った。HEV は 70°C 以上の熱で不活性化されると報告されているが⁸⁾、鍋やバーベキューとして加熱処理された感染動物喫食による感染例も多い^{5,9-11)}。本症例ではイノシシ肝をフライパンで硬くなるまで十分に加熱調理したとのことであったが、肉の一部が加熱不十分であったか、箸などの調理器具の処理が不十分であったために、感染が成立したと推測される。E 型肝炎診断のためには感染動物喫食歴についての調理方法を含めた詳細な問診が重要である。しかし、E 型肝炎の約 60% は感染経路不明であること、非 ABC 型急性肝炎の約 10% を E 型肝炎が占め

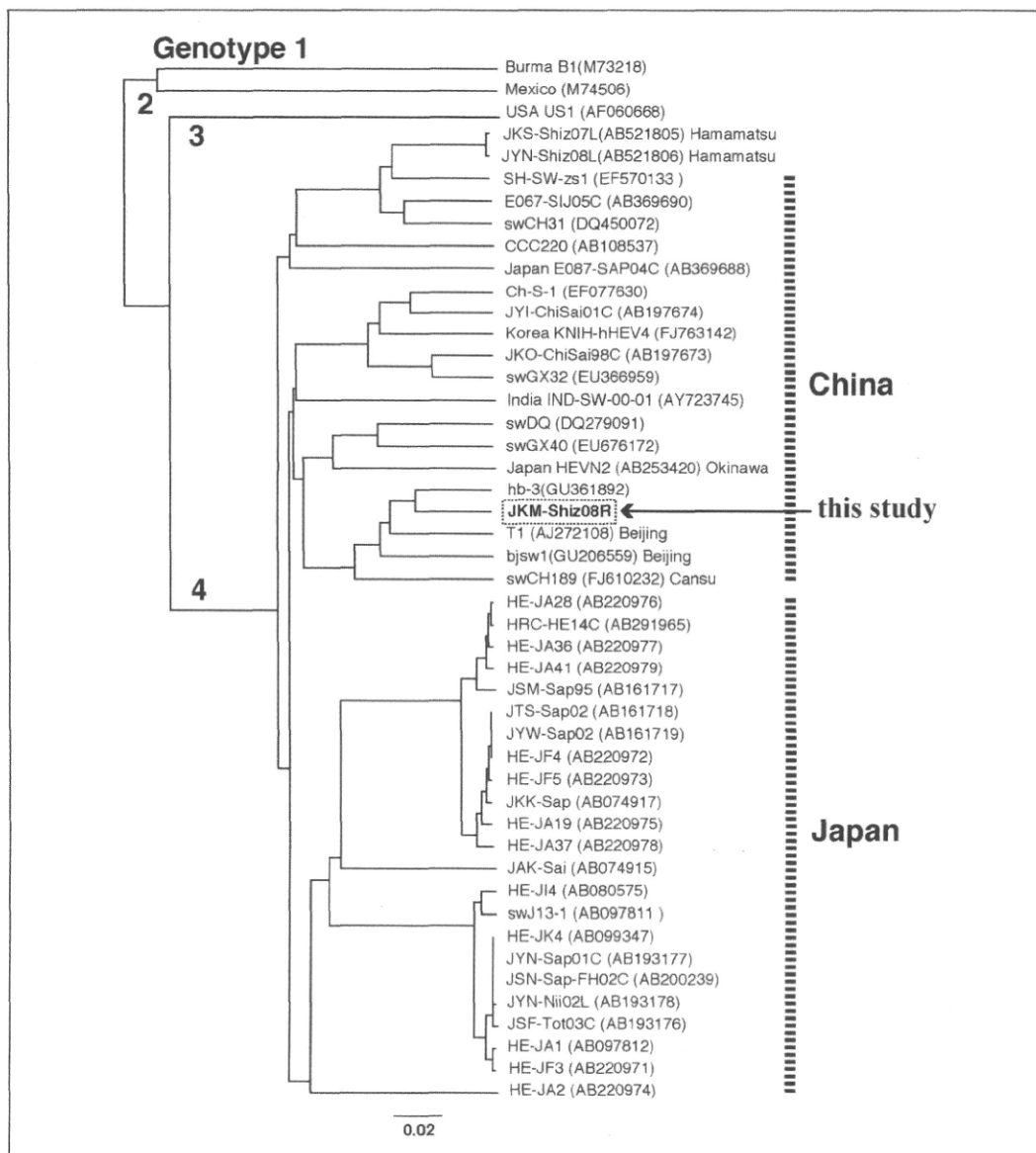


図 1 E 型肝炎ウイルス (HEV) の ORF1 内レプリカーゼ領域 821 塩基の分子系統樹解析

ていること¹²⁾から勘案して、非 ABC 型急性肝炎では感染動物喫食歴がなくとも E 型肝炎検査の検討が必要である。

E 型急性肝炎の重症化例に対しては、血漿交換や血液濾過透析などの人工肝補助療法が施行される。インターフェロン療法、ステロイドパルス療法、免疫抑制療法などの抗ウイルス療法の有効性は証明されていないが、抗ウイルス療法による比較的良好な治療成績¹³⁾も報告されており、症例に応じた検討が

必要である。本症例では発症早期より積極的に血漿交換、血液濾過透析、ステロイドパルス療法を行ったことで劇症化を防いで救命できたものと考えている。

また、本症例は海外渡航歴がないにもかかわらず、系統樹解析 (図 1) において中国で同定されている genotype 4 に近似する HEV が同定された。静岡県における野生イノシシの HEV 感染状況を調べるために、静岡県と協力して 2005～2009 年に豚コレラ

調査のために収集された野生イノシシの血清 140 検体（東部地区 45 検体，中部地区 59 検体，西部地区 35 検体，不明 1 検体）を用いた。HEV 抗体¹⁴⁾は東部地区 30 検体（66.7%），中部地区 7 検体（11.9%），西部地区 11 検体（31.4%）の計 48 検体（34.3%）で陽性で，東部地区で HEV 抗体保有率が高かった。HEV-RNA は東部地区 1 検体（genotype 3），西部地区 4 検体（genotype 4 が 3 例，genotype 不明が 1 例）の計 5 検体で陽性（3.57%）であった。本症例は中部地区で捕獲されたイノシシの肝臓を喫食したが，今回の調査では中部地区のイノシシからは HEV-RNA は検出されなかった。西部地区の捕獲イノシシからは genotype 4 が分離されたが，本症例の中国型 genotype 4 とは異なる系統の株であった。他県における野生イノシシの調査結果^{15~21)}と比較して，静岡県は HEV 抗体陽性率が最も高く，隣接する愛知県¹⁷⁾と同様に genotype 4 が高率に検出されているため，さらなる感染の拡大に注意が必要である。

文献

- Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007 ; 127 : 216-28.
- Emerson SU, Purcell RH. Running like water-The omnipresence of hepatitis E. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2367-8.
- 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.
- 阿部敏紀，相川達也，赤羽賢浩ほか，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，*肝臓* 2006 ; 47 : 384-91.
- Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003 ; 362 : 371-3.
- Li T, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 11 : 1958-60.
- 坂田秀勝，松林圭二，佐藤進一郎ほか，輸血と E 型肝炎，*臨と研* 2008 ; 85 : 1011-6.
- 岡本宏明，E 型肝炎をめぐる最近の知見，*日消誌* 2009 ; 106 : 177-87.
- 清水裕子，山田雅彦，立松英純ほか，愛知県内で捕獲された野生イノシシ摂食後に発症した E 型肝炎の 4 例，*肝臓* 2006 ; 47 : 465-73.
- Tamada Y. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol* 2004 ; 40 : 869-70.
- 上平幸史，矢野公士，宮里賢ほか，著明な血小板減少を呈した E 型急性肝炎の 1 例，*日消誌* 2008 ; 105 : 841-6.
- 矢野公士，玉田陽子，八橋弘，E 型肝炎の臨床，*日消誌* 2009 ; 106 : 188-94.
- 姜貞憲，松居剛志，矢根圭ほか，E 型急性肝炎重症化例における HEV 動態と治療法の検討，*肝臓* 2009 ; 50 : 543.
- 高橋和明，安倍夏生，道堯浩二郎ほか，動物種の如何を問わず E 型肝炎ウイルス抗体を検出し得る簡便 ELISA 法，*肝臓* 2007 ; 48 : 338-40.
- Michitaka K, Takahashi K, Furukawa S, et al. Prevalence of hepatitis E virus among wild boar in the Ehime area of western Japan. *Hepatol Res* 2007 ; 37 : 214-20.
- 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 : 5371-4.
- Sakano C, Shiono M, Yokota Y, et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and pigs in Gunma prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 2009 ; 71 : 21-5.
- 伊藤雅，小林慎一，山下照夫ほか，野生動物からの E 型肝炎ウイルス (HEV) と HEV 抗体の検出および猟師らの HEV 抗体保有状況，*肝臓* 2006 ; 47 : 316-8.
- 北嶋直人，大瀬貴之，岡明彦ほか，兵庫県の野生猪およびアライグマにおける HEV 感染実態調査，*肝臓* 2008 ; 49 : 558.
- 保科健，飯塚節子，田原研司ほか，野生動物等の E 型肝炎ウイルスの保有状況，*島根保健環科研報* 2009 ; 50 : 70-3.
- 中野達徳，高橋和明，松本美富士ほか，三重県の野生イノシシ，シカの E 型肝炎ウイルス感染状況，*肝臓* 2009 ; 50 : 543.

<症例報告>

静岡県西部地区で発生したシカ生肉またはイノシシ生肝摂食後の
E 型急性肝炎 3 例

川村 欣也^{1)*} 小林 良正¹⁾ 高橋 和明²⁾ 早田 謙一¹⁾
 住吉 信一¹⁾ 川田 一仁¹⁾ 高橋百合美¹⁾ 牧野さつき¹⁾
 則武 秀尚¹⁾ 中村 浩淑¹⁾ 安倍 夏生²⁾ 新井 雅裕²⁾

要旨：シカ及びイノシシの生食により感染したと思われる E 型急性肝炎 3 例を経験したので報告する。症例 1, 2 は 71 歳と 48 歳の男性で発症の約 2 カ月前に、偶然同一飲食店で別々にイノシシの肝を生食していた。症例 3 は 69 歳の男性で、発症の 2 カ月前から息子が狩猟で捕獲した複数頭のシカ生肉を頻回に自宅で調理し摂取していた。3 症例とも入院時、肝逸脱酵素は著明に上昇していたが補液や安静で改善した。3 症例の病初期血清における IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体、HEV-RNA が陽性で HEV genotype は 4 型、塩基配列は相互に 99.8% 以上一致した。愛知県のアヒル及びイノシシから分離されている「4 型 HEV 愛知株」との間にも 98.5% - 99.8% の一致率を示し、北海道に蔓延する genotype 4 とは明らかに別系統であることが注目された。

索引用語： 急性肝炎 HEV E 型肝炎

はじめに

E 型肝炎ウイルス (HEV) 日本固有株の存在が報告された 2001 年以後、国内感染例がしばしば報告されるようになり、2006 年には我国に於ける HEV 感染の全国集計が報告された¹⁾²⁾。急性肝炎診断の際、海外渡航歴が無くともイノシシやブタ、シカ肉の摂取歴があれば、E 型急性肝炎を意識し HEV 関連抗体の測定を行う様になった事は、報告例増加の一因であると考えられる。加熱処理の不十分なイノシシ、ブタ、シカの肉や内臓の摂取が感染経路となる事は、一般には未だに認識されていない為か発症例は後を絶たない。

今回、静岡県西部地区において飲食店で提供された野生イノシシの肝と、自宅で調理した野生シカ肉が感染源として疑われた E 型急性肝炎 3 症例を経験し、その塩基配列の検討を行ったので報告する。

症例 1

患者：71 歳、男性。

主訴：全身倦怠感、食欲低下。

既往歴：64 歳、交通事故で右腎損傷。67 歳帯状疱疹。

家族歴：特記事項なし。

飲酒歴：ビール大ビン 1 本/日 × 50 年。

輸血歴、海外渡航歴、内服薬：なし。

現病歴：2006 年 12 月末に浜松市天竜区の某飲食店にて野生イノシシのレバーを生食した。2007 年 2 月 14 日頃から感冒様症状があり、2 月 22 日 A 病院を受診した。総合感冒薬と抗生剤を処方されたが、改善しない為再受診したところ、肝機能異常を指摘され、精査加療目的で 3 月 12 日に A 病院に入院した。入院時の T-Bil 値が高値で重症化が懸念され、翌日当院に転院となった。

現症：身長 145 cm、体重 47 kg、体温 37.1℃、血圧 153/99 mmHg、脈拍 84/分整。貧血、浮腫なし。眼球結膜、皮膚に黄疸を認める。表在リンパ節を触知せず。胸部聴診上異常なし。腹部は平坦、軟、心窩部に圧痛あり。右季肋部に肝を 1 横指触知する。脾を触知せず。神経学的異常所見なし。

血液検査所見：T.Bil、トランスアミナーゼが著明に

1) 浜松医科大学第二内科

2) 東芝病院研究部

*Corresponding author: k7@hama-med.ac.jp

<受付日2010年1月12日><採択日2010年6月29日>

上昇していた。IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体は共に陽性であった (Table 1)。

肝組織所見：第 3 病日に施行した肝生検では、門脈域のリンパ球浸潤と広範な肝細胞の壊死炎症反応を認めた。

入院後経過：入院時血液検査にて、IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体が陽性であったことから急性 E 型肝炎と診断した。感染源として発症の約 7 週前、2006 年 12 月末のイノシシのレバーの生食が疑われた。入院時に食欲低下を認めたが、数日間の補液で症状は改善した。肝機能異常も徐々に改善し、第 17 病日にトランスアミナーゼが 200 台まで低下した為退院した。退院約 2 カ月後に肝機能は正常化した。

症例 2

患者：48 歳男性。

主訴：全身倦怠感、右季肋部痛。

既往歴：28 歳、A 型急性肝炎。36 歳、慢性骨髄性白血病。

家族歴：父、高血圧、膀胱癌。

飲酒歴：日本酒 3 合/日を週 2 日×20 年。

輸血歴：なし。

内服薬：ニフェジピン、アロプリノール、カルデサルタンシレキセチル、フロセミド、ジピリダモール、メシル酸イマチニブ。

現病歴：2006 年 12 月に症例 1 と同じ飲食店でイノシシのレバーを生食していた。2007 年 2 月 23 日頃から上腹部痛と下痢の症状があり、A 病院で制酸剤、抗生剤、整腸剤を処方された。症状は一旦軽快したが、3 月 12 日頃から全身倦怠感、微熱、右季肋部痛が出現した。3 月 16 日、A 病院を再受診し、血液検査にて肝機能異常を認め精査加療目的で同日当院に紹介入院となった。

現症：身長 164 cm、体重 76 kg、体温 37.0℃、血圧 128/70 mmHg、脈拍 80/分整。貧血、浮腫なし。眼球結膜に黄疸を認める。表在リンパ節を触知せず。胸部聴診上異常なし。腹部は平坦、軟、心窩部から右季肋部に圧痛あり。右季肋部に肝を 1 横指触知する。脾を触知せず。神経学的異常所見なし。

血液検査所見：TBil とトランスアミナーゼの上昇を認めた。症例 1 と偶然同一店でイノシシのレバーを摂取していた事から IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体の測定を行い、いずれも陽性であった (Table 1)。

腹部 CT 所見：胆嚢壁の肥厚、肝内門脈周辺に浮腫状変化を認めた。

入院後経過：入院時の血液検査にて、IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体が陽性であり急性 E 型肝炎と診断した。感染源として、発症の約 8 週前、2006 年 12 月末のイノシシレバーの生食が疑われた。全身倦怠感や右季肋部痛は、入院後に安静のみで軽快し、肝機能異常も徐々に改善した。第 12 病日にはトランスアミナーゼは 100 以下まで低下し退院となった。退院約 1 カ月後に肝機能は正常化した。

症例 3

患者：69 歳男性。

主訴：無し。肝機能異常の精査加療目的で入院。

既往歴：60 歳、悪性リンパ腫 (Diffuse large B cell) で自己末梢血幹細胞移植施行。66 歳 2 型糖尿病。

家族歴：特記事項なし。

飲酒歴：ウイスキー水割り 1 杯/日。

輸血歴、海外渡航歴：なし。

内服薬：テルミサルタン、ボグリボース。

現病歴：2007 年 11 月頃から息子が狩猟で浜松市天竜区にて捕獲した野生イノシシ、シカのうち複数頭のシカ肉を頻回に生食していた。2007 年 11 月 26 日糖尿病に対する定期受診時の肝機能検査は正常であった。2008 年 1 月 28 日に再受診し、血液検査で肝機能異常を認めた。ボグリボースによる薬剤性肝障害を疑い中止したが改善せず、2 月 10 日精査加療目的で当科に入院となった。

現症：身長 157 cm、体重 56 kg、体温 36.6℃、血圧 163/89 mmHg、脈拍 108/分整。貧血、黄疸、浮腫なし。表在リンパ節を触知せず。胸部聴診上異常なし。腹部は平坦、軟、圧痛なし。肝、脾を触知せず。神経学的異常所見なし。

血液検査所見：トランスアミナーゼは著明に上昇していたが、TBil は正常、凝固能も保たれていた。発症 8 週前から複数頭のシカの生肉を頻回に摂取していた事から、IgM-HEV 抗体、IgG-HEV 抗体の測定を行い、いずれも陽性であった (Table 1)。

入院後経過：E 型急性肝炎と診断し、安静のみで経過観察した。入院中も特に症状は無く肝機能異常は改善した。第 15 病日にはトランスアミナーゼは 50 台まで低下し退院となった。退院約 1 カ月後に肝機能は正常化した。

症例 1, 2 は偶然、同一飲食店で提供されたイノシシの生レバーを発症の 7, 8 週前に摂取していた。同飲食店に問い合わせたところ、レバーは提供した日の直前

Table 1 Laboratory data on admission

Case 1			Case 2			Case 3		
Viral marker			Viral marker			Viral marker		
CBC	WBC	5400 /mm ³	HAV-IgM Ab	(-)		CBC	WBC	5600 /mm ³
	RBC	450 × 10 ⁴ /mm ³					RBC	440 × 10 ⁴ /mm ³
	Hb	136 g/dl	HBs Ag	(-)			Hb	142 g/dl
	Ht	41.2 %	HBc Ab	(-)			Ht	42.1 %
	Plt	196 × 10 ⁴ /mm ³	HBV-DNA				Plt	17.6 × 10 ⁴ /mm ³
		< 2.6 Log copies/mL						< 2.6 Log copies/mL
Coagulation			Coagulation			Coagulation		
	PT	92 %	HCV Ab	(-)			PT	113 %
	APTT	> 140 %	HCV-RNA	(-)			APTT	98 %
	FBG	346 mg/dl					FBG	430 mg/dl
	PT-INR	1.05	HEV-IgM Ab	(+)			PT-INR	0.94
Chemistry			HEV-IgG Ab	(+)		Chemistry		
			HEV-RNA	(+)				
BUN	102 mg/dl					BUN	23.8 mg/dl	
Cre	0.50 mg/dl		CMV-IgM Ab	(-)		Cre	1.65 mg/dl	
TP	7.4 g/dl		CMV-IgG Ab	(+)		TP	7.1 g/dl	
ALB	3.3 g/dl					ALB	3.0 g/dl	
T-Bil	10.0 mg/dl		EBV VCA-IgM	(-)		T-Bil	1.3 mg/dl	
D-Bil	7.7 mg/dl		EBV VCA-IgG	(+)		D-Bil	0.7 mg/dl	
AST	953 IU/L					AST	821 IU/L	
ALT	1182 IU/L		HPV B19-IgM	(-)		ALT	746 IU/L	
LDH	428 IU/L		HPV B19-IgG	(-)		LDH	430 IU/L	
ALP	1402 IU/L					ALP	1500 IU/L	
γ-GTP	338 IU/L					γ-GTP	667 IU/L	
ChE	179 U/l					ChE	258 U/l	
FBS	104 mg/dl					FBS	95 mg/dl	
HbA1c	5.8 %					HbA1c	6.2 %	
Immunochemistry			Immunochemistry			Immunochemistry		
CRP	1.20 mg/dl		CRP	0.6 mg/dl		CRP	0.69 mg/dl	
ANA	× 40		ANA	× 40		ANA	× 40	
AMA	(-)							

に天竜区で狩猟された一頭分をもらい受け同店で調理し出されたものであった。同飲食店には当時の内臓や肉の保存は無く、感染源の完全な特定には至らなかった。症例3は、患者の息子が野生シカを2007年11月～2008年2月までに計11頭捕獲し、そこから数頭分の肉を自宅に持ち帰り、患者が頻回に摂取し感染が成立したと推測されたが、残った肉は無く感染源は特定できなかった。同居している息子夫婦と3人の孫のうち生で肉を摂取した者はいなかった。息子夫婦と孫2人の計4人については同意を得て血清を採取し感染の有無を調査したが既感染を含めて全員陰性であった。

HEV抗体・HEV-RNAの測定：IgM-HEV抗体およびIgG-HEV抗体、HEV-RNAの測定は入院時の保存血清を用いておこなった。IgM-HEV抗体およびIgG-HEV抗体はリコンビナントHEV抗原タンパク質を使用したEIA法によるIgMクラスとIgGクラス抗HEV抗体検出キット（特殊免疫研究所製造）によって測定した³⁾。HEV-RNAは保存血清からRNAを抽出し、ORF1内に設定した二カ所のプライマーセット^{4,5)}を用いてRT-PCRを行い、得られたPCR産物から326塩基、821塩基の配列を決定し、既報株の塩基配列と比較検討した。

3症例についてHEV塩基配列の完全長化を試み、症例1（JKS-Shiz07L：AB521805）と症例3（JYN-Shiz08L：AB521806）は7219塩基の準完全長HEV塩基配列が得られた。症例2はORF1の326nt（JSI-Shiz07：AB521807）と821nt（JSI-Shiz07R：AB521808）の部分配列を得た。症例から分離されたHEV-RNAは何れもgenotype 4型に所属し、これら静岡株は相互に99.8%以上の一致を示した。また愛知県の患者と設楽地区で捕獲されたイノシシから分離されている「4型HEV愛知株」とは98.5%～99.8%の一致率であり、分子系統樹解析（Fig. 1）にて同一系統株であることが判明した。上記の静岡県から分離した準完全長2株（JKS-Shiz07L, JYN-Shiz08L）を既報の完全長及び準完全長HEV塩基配列株と比較したところ、上海旅行帰りの患者（E067-SIJ05C）と上海のブタ（SH-SW-zs1）から分離された上海株⁶⁾との間で90.2%～92.0%の一致率を示した。アミノ酸配列について比較（Fig. 2）したところ、この4株（JKS-Shiz07L, JYN-Shiz08L, E067-SIJ05C, SH-SW-zs1）はHypervariable regionの同じ部位で5アミノ酸の欠失がみられた。分子系統樹解析（Fig. 1）でも静岡株と上海株は近似していた。

考 察

E型急性肝炎が、ブタ、イノシシ、シカ等の肉や内臓を加熱不十分な状態で摂取し発症する人畜共通の感染症である事は、これまでの報告からも既に知られている^{7)～10)}。感染を確認する上で必要なHEV関連の抗体測定は保険適応が無い為、診断に至るまでの過程において、HEV流行地域への渡航歴とブタ、イノシシ、シカ肉の摂取歴を聴取する事は重要である。今回の3症例も入院時の病歴聴取で、イノシシのレバー、シカ肉の生食が確認され、迅速な診断が可能であった。

2006年に行われた全国集計では、感染源が確定あるいは推定された動物種ではブタ66%、イノシシ23%、シカ8%、不明3%とブタが最も多いと報告されている²⁾。シカ、イノシシは11月から2月の狩猟解禁時期以外にも鳥獣保護法（第9条）に基づき許可が得られれば有害鳥獣として捕獲が認められている。浜松市森林課の有害鳥獣捕獲の統計では平成19、20年のイノシシ、シカの捕獲頭数は381頭から892頭、194頭から237頭にそれぞれ増加¹¹⁾している。捕獲数の増加は感染機会の増加に繋がる危険性もあり注意を促す必要があると考えられる。

HEVの感染性については70℃10分およびそれ以上の温度の加熱処理で不活化されると報告されている¹²⁾。生の肉を一旦冷凍し、後日解凍後、調理して感染が成立したと思われる報告もあり¹³⁾。冷凍保存された肉類についての取り扱いに関しても十分な注意が必要である。

静岡県からのE型急性肝炎の症例報告は、今回が初めてとなる。全国集計では、北海道以外の地域ではgenotype 3型が多い²⁾といわれているが、今回genotypeは全て4型であった。先に報告された隣県の愛知県での4例のE型急性肝炎のgenotypeは4型であり¹⁴⁾、愛知、長野県の野生イノシシから検出された遺伝子型の調査結果でもgenotypeは4型と報告されている¹⁵⁾。

著者らの症例から分離されたgenotype 4 HEVの3株はほぼ同一株であり、これら「4型静岡株」は既報「4型愛知株」¹⁴⁾¹⁵⁾とも高い相同性（98.5%～99.8%）を示すため、単一系統の「4型愛知静岡株」であると考えられる（Fig. 1a）。「4型静岡株」は、完全長または準完全長塩基配列の比較で4型国内株と異なり上海株に類似し（Fig. 1b）、アミノ酸配列のhyper variable regionで上海株と共通の欠失を認める（Fig. 2）など、系統解析においては国内株よりもむしろ上海株により近いことが示された。以上の事実は「4型愛知静岡株」と上海株は祖先を共にする近縁HEV株であることを強く示唆しており、

