

話題の感染症

E 型肝炎について

Hepatitis E

り 天 成 : 武 田 直 和 : 宮 村 達 男
 Tian-Cheng LI Naokazu TAKEDA Tatsuo MIYAMURA

はじめに

近年、重症急性呼吸器症候群 (SARS) やインフルエンザなど動物由来あるいは動物を中間宿主としたウイルス感染症が目立ってきている。実は肝炎ウイルスの中にも動物を中間宿主としたものが存在する可能性が出てきた。昨年8月、Lancetにその有力な根拠が掲載された¹⁾。生シカ肉の摂食が原因と思われるE型肝炎がわが国で起こったのである。

E型肝炎はE型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus: HEV) によって引き起こされる疾患である。診断方法が確立されていなかったため確実に診断された症例が少なく、わが国ではあまり馴染みのない疾患であった。また、これまでに見つかった症例はほとんど海外出張あるいは旅行中に感染し、帰国後発症したケースであるため輸入感染症と認識されてきた。

現在に至ってようやく抗体診断法やウイルス遺伝子検出法などが確立し、E型肝炎と診断される症例も見つかってきたが、E型肝炎の中には全く海外渡航歴がなく日本国内で感染したと思われるケースもでてきた²⁾。ブタではHEVに対する抗体保有率が高いこと、ブタからヒトHEVと似たウイルスが分離されることなど人畜共通感染症ではないかとの疑いはかなり以前から指摘されていた。しかし、わが国におけるE型肝炎には、独特な食習慣による固有な感染様式も存在するらしいことが明らかになってきた。

I. E型肝炎の疫学と感染様式

1955年、インドのニューデリーで飲料水を介した大規模な急性肝炎が発生した。この流行では黄疸性肝炎と診断された症例だけでも29,000人に及んでいる³⁾。これはE型肝炎に関する最初の学術的記述である。E型肝炎はその感染様式がA型肝炎のそれに似ている。しかしながら、患者血清の反応が全く異なるため病原体が同定される以前には経口伝播型非A非B型肝炎 (Enterically-Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis) と呼ばれていた⁴⁾。1983年、Balayanらは経口伝播型非A非B型肝炎患者の急性期の糞便乳剤をA型肝炎ウイルスに対するIgG抗体陽性のボランティアに経口投与し、典型的な急性肝炎を再現した。このボランティアの糞便からは、直径27~30nmのエンベロープを持たない小型の球形ウイルス粒子が免疫電子顕微鏡法で確認された。塩化セシウム平衡密度勾配遠心法での精製ウイルス粒子の比重は1.35g/cm³、蔗糖密度勾配遠心法での沈降定数は176~183sであった^{5,6)}。さらにこの粒子を静脈注射したサルでも、肝細胞損傷によるALTとASTの上昇が見られた。便と胆汁から同じウイルス粒子が観察され、このウイルス粒子が経口伝播型非A非B型肝炎の病原体であると断定された (図1)。このウイルスが増殖可能な培養細胞が見つからずウイルス学的研究の進展は遅々としたものであったが、1990年、Reyesらは感染サルの便と胆汁からcDNAのクローニングに成功し、このウイルスをE型肝炎ウイルスと命名した⁷⁾。

E型肝炎は主に糞口経路によって伝播する。中で

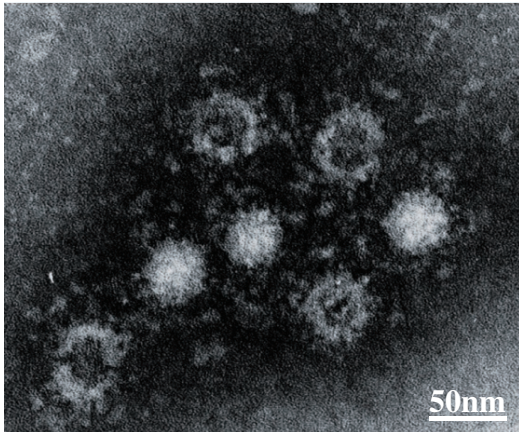


図1 HEV粒子の免疫電子顕微鏡像

HEV感染サル糞便を急性期E型肝炎患者血清と反応させ、ネガティブ染色後、免疫電子顕微鏡で観察した。直径は約30nmである。バーは50nm。

も飲用水の汚染が原因である場合が多い。前述のニューデリーで発生した急性肝炎の大流行をはじめ、過去にアジア、北アフリカ、メキシコなどで発生した大流行は汚染飲料水が原因であった。したがって、HEVはかつてwater-borne hepatitis virusとも呼ばれていた。HEVは口から体内に進入し、おそらくレセプターを介して腸管上皮細胞に感染する。その後、血液に侵入する。循環している過程で、門脈を介して肝臓に到達して、肝細胞の細胞質で増殖すると考えられている。増殖したウイルスは再び、血液に進入し、ウイルス血症を引き起こす。また、胆汁に分泌されたウイルスは腸管に到達し、糞便とともに体外に排泄される。体外に排泄されたHEVが飲用水を汚染した場合、これを介した流行が起こると考えられる。

また、輸血によるHEVの感染例は、血液を介して感染するHCVやHBVより少ないものの皆無ではない。肝炎発症以前の潜伏期に血清中にウイルスが出現することはサルおよびボランティアによる感染実験で以前から示されており、輸血によるE型肝炎の危険性はすでに指摘されていた⁸⁾。実際、HEVによる輸血後肝炎の発生は過去に中国やインドなどで報告されたことがある。わが国でも昨年わが国初の輸血によるHEV感染が報道された。HEVの垂直感染やヒトからヒトへの感染はまだ報告されていない。

II. HEVの遺伝子構造および分類

1991年、TamらによってHEV遺伝子の全配列が解明された⁹⁾。以来、多くの株が解析され、HEVには少なくとも4つの遺伝子型(Genotype)が存在することが明らかになっている。ミャンマーをはじめ、アジアで分離された株の大部分は相互に塩基で90%以上、アミノ酸ではそれ以上のホモロジーを示し、遺伝学的にGenotype 1 (G 1)に分類されている。一方、メキシコ株は他のアジア株と塩基配列で81~82%のホモロジーを示し別の系統であるGenotype 2 (G 2)に分類されている。最近、ナイジェリアでも散发例患者からG2の遺伝子が検出された¹⁰⁾。アメリカでは過去10年間に海外渡航歴が全くないE型肝炎患者からUS1株とUS2株が分離された^{11,12)}。これらはアジア株やメキシコ株と塩基レベルで78~80%のホモロジーしかなく、明らかに異なる遺伝子型に分類される株であった。これらの株は、ブタから分離されたS1株とともにGenotype 3 (G 3)に分類されている¹³⁾。さらに、中国で散発的に発生した急性肝炎から分離された新しい株は5159番目に一塩基(U)が挿入されているという特徴がある。他の遺伝子型とのホモロジーも低く、Genotype 4 (G 4)に分類された(図2)¹⁴⁾。わが国でも海外渡航歴のない急性E型肝炎患者とブタからG3およびG4に属する株が分離されている^{2,15~17)}。

HEVのゲノムは約7.2Kbのプラス一本鎖RNAで

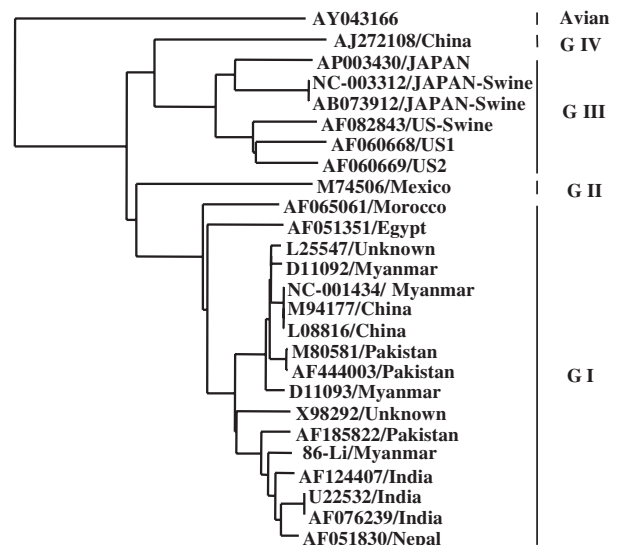


図2 HEVの系統樹
ORF2全塩基配列に基づく系統樹。

5' 末端には cap 構造が、3' 末端にはポリアデニル酸が付加されている。塩基数はポリアデニル酸を除き、約 7,200 塩基である。HEV の遺伝子上には 3 つのオープンリーディングフレーム (ORF1, ORF3 および ORF2) が 5' 末端から一部重複しながら配列している¹⁸⁾。5' 末端の 27 塩基の非翻訳領域に続く、約 5,000 塩基の ORF1 は非構造蛋白をコードし、N 末端側からメチルトランスフェラーゼ、ドメイン Y、プロテアーゼ、プロリンリッチドメイン、ドメイン X、ヘリカーゼ、および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのモチーフが並んでいる。3' 末端にある約 2,000 塩基の ORF2 は 72 kDa の構造蛋白をコードする領域である。ORF3 は ORF1 と ORF2 の間に位置し、蛋白としての機能は不明である (図 3)。HEV は形態学的には非細菌性急性胃腸炎の病原体であるノウォークウイルスに類似することから、一時的にカリシウイルス科に分類されていた。しかし、遺伝子 RNA 上のウイルス蛋白の配置、特に非構造蛋白の機能ドメインの配置はノロウイルスのそれらとは明らかに異なっている。したがって、HEV は全く別のウイルス属、「E 型肝炎様ウイルス属」に再分類されている^{19,20)}。

Ⅲ. E 型肝炎の臨床特徴

E 型肝炎の臨床症状は A 型肝炎のそれと似ている。臨床的にはほとんどの E 型肝炎は急性肝炎あるいは劇症肝炎であり、慢性化しない。潜伏期間は 15～50 日、平均 6 週間で、平均 4 週間といわれる HAV 感染の潜伏期に比べ、幾分長い。E 型肝炎の典型的な症状である黄疸は発症後の 0～10 病日目に顕著になる。この時期に AST 値と ALT 値は著し

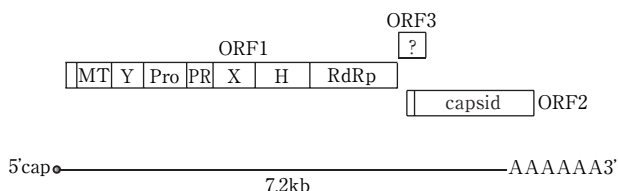


図 3 HEV の遺伝子構造

HEV は約 7.5kb のプラス一本鎖 RNA を遺伝子を持つ。ORF1 は非構造蛋白を、ORF2 は構造蛋白をコードする。ORF3 がコードする蛋白の機能は不明である。MT: メチルトランスフェラーゼ、Y: ドメイン Y、Pro: プロテアーゼ、PR: プロリンリッチドメイン、X: ドメイン X、H: ヘリカーゼ、RdRp: RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ。

く上昇し、IgG 抗体と IgM 抗体がともに検出される。発症前後の短期間ではあるが、血液と糞便からウイルス RNA を RT-PCR で検出することができる (図 4)。まれに IgM 抗体が長時間持続したり、便中へのウイルス排泄を伴って長時間ウイルス血症状態が続く例も見られる。E 型肝炎の 1 つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20% に達するという報告もある²¹⁾。E 型肝炎の罹患率は大流行でも散発例の場合でも青年と大人で高く、小児で低いことが知られているが、発展途上国での小児の急性肝炎の中には E 型肝炎が相当数含まれていると考えられる。わが国における小児の HEV 感染状況は把握されていない。

Ⅳ. 細胞培養と動物モデル

カニクイザルの初代培養肝細胞に HEV 感染サルからの糞便抽出液を感染させ、培養細胞中にウイルス様粒子を確認したとする報告がある。また、FRhK4, 2BS, A549 細胞で HEV が増幅したという報告があるが、いずれも再現性に乏しく、追試に成功したとの報告はない。効率よく HEV を増やして、ウイルスの複製、増殖のメカニズムの解明に応用できる培養系はいまだ樹立されていないといつてよい。

動物感染実験ではチンパンジー、タマリン、ミドリザルのほか、アカゲザル、カニクイザルなどが HEV に感受性を有することが明らかになった。カ

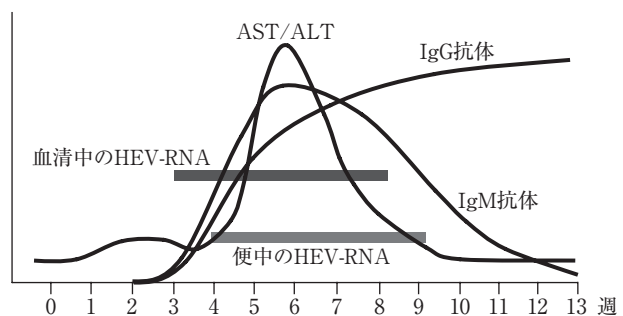


図 4 HEV 感染マーカーの推移

E 型肝炎の潜伏期は平均 6 週間である。発症後 AST 値と ALT 値は著しく上昇し、ピークに達する。この時点で IgM 抗体と IgG 抗体ともに検出される。IgM 抗体は約 3 カ月後に消失するが、IgG 抗体は長く持続する。自覚症状が認められる以前に血中から HEVRNA を検出できるが、肝機能の回復とともに消失する。糞便からの HEVRNA の検出は血中より遅れるが、検出できる期間は血中より幾分長い。

ニクイザルとアカゲザルに実験的に感染材料を静脈注射した場合、ウイルス血症や胆汁、糞便へのウイルス排泄などが観察され、ALTとASTの上昇を伴う肝炎を呈する。したがって、これらのサルは動物モデルとしてよく使われている。しかし、サルでさえ経口投与による感染は成立せず、真の動物モデルとは言いがたい。また、豚やラットなどもHEVに感染するという報告があるが、動物モデルとしての可能性は未知である。

V. E型肝炎の診断

電子顕微鏡を利用したネガティブ染色法と免疫電子顕微鏡法が急性期の患者糞便からウイルス粒子を検出するために使用できる。しかし、糞便へのウイルス排泄量は少なく、またその期間が短いため、検出感度は満足できるものではない。さらに高価な機械と高度な実験テクニックが要求されるので、一般的な臨床検査法として用いることは難しい。現在、臨床診断によく使われるのはRT-PCRと抗体ELISAである。

1. RT-PCRによるHEV遺伝子検出

各遺伝子型間でよく保存される領域の塩基配列に基づいて共通のプライマーを設計し、これを用いたRT-PCRで遺伝子増幅が可能になっている。使われるプライマー、増幅領域は各研究グループ間に異なっているが、よく使われる領域はORF1のN末端付近の約500塩基、およびORF2の中間部分の約500塩基である。通常、血清と糞便が検査材料として使われる。サンプルの採集時期によって、RNAの検出率は異なるが、ヒトでは発症の2週間前後で高い。個別のケースでは発症1カ月後にも検出したとする報告がある。増幅される領域の塩基配列を系統解析することによって遺伝子型の同定が可能であるので、ウイルスの感染源を推測する上で手がかりにもなる。ただ、HEVの遺伝子はRNAであるため、検出感度はサンプルの保存条件などによっても左右される。また、操作中のコンタミにも十分な注意を払うべきである。

2. ELISAによるIgMとIgG抗体検出

RNAの検出と比べ、抗体の検出はサンプルの保

存条件等の影響が少ない。操作も簡単であるため大量のサンプルを同時取り扱うこともできる。しかし、現時点でHEVが効率よく増殖する培養細胞系は確立されていないので抗原の調製が容易ではない。ウイルス粒子は発症前後の患者や感染サルの糞便に一時的に出現するが、量は少ない。したがって、ネイティブなウイルス抗原を利用するELISAの開発は現時点では不可能である。これまで大腸菌発現システムや組換えバキュロウイルスシステムなどの蛋白発現系を用いた構造蛋白の発現がいろいろ試され、抗体検出系がいくつか開発されているが、検出感度と特異性がともに満足できるものはなかったといっよい^{22,23)}。そこで筆者らは組換えバキュロウイルス発現システムを用い、N末端から111アミノ酸を欠失した構造蛋白を昆虫細胞で発現した。大量に産生された蛋白はネイティブなウイルス粒子に近い構造、抗原性および免疫原性をもつ直径約23~24nmのウイルス様中空粒子(Virus-like particle: VLP)であった(図5)²⁴⁾。このVLPを用いた抗体ELISAはE型肝炎急性期の患者血清中、ならびに感染サルの血清中に誘導されるHEV特異的なIgMおよびIgG抗体を容易に、迅速、かつ高感度検出することができ、E型肝炎の臨床診断に非常に有用である。また、二次抗体を替えることによって多種の動物のIgG抗体およびIgM抗体の検出に対応することも可能である。

VI. わが国におけるE型肝炎

1. わが国におけるHEV抗体保有率

わが国はE型肝炎の非流行地域と考えられている。900人の健常人のIgG抗体保有率をELISAで調べた。検体はA県、B県、C県から集められ、0~70歳までの年齢が含まれるものである。図6に示したようにA県とC県の血清では29歳以下の年齢グループでIgG抗体は全く検出されなかった。B県で2例のIgG抗体陽性例が検出された。この年齢グループの抗体保有率は0.4%(2/534)であった。一方、30歳以上のグループではIgG抗体保有率は年齢とともに高くなる。A県、B県およびC県の抗体保有率はそれぞれ1.9%、14.1%および3.5%で、地域間で抗体保有率に差が見られた。3つの地

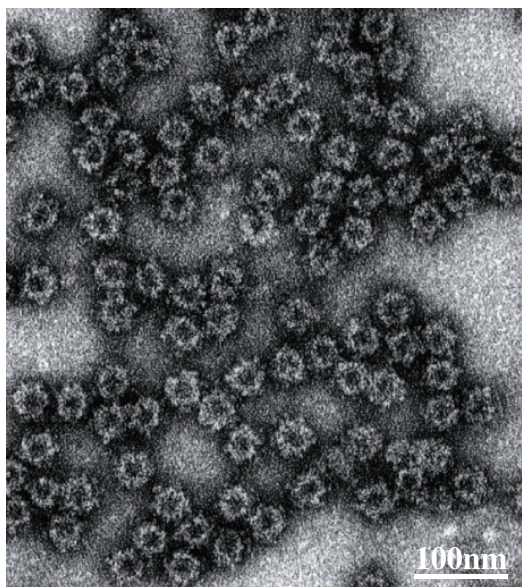


図5 HEV 組み換え中空粒子

中空粒子の直径は平均 23.7nm, 比重は 1.285g/cm³ である。バーは 100nm。

域の平均抗体保有率は 5.4%であった²⁵⁾。

2. 非 A 非 B 非 C 型肝炎における E 型肝炎

これまで信頼できる確定診断法がなかったため、E 型肝炎の患者発生が正確にとらえられてこなかった。過去 10 年間にわたって国内で収集された 98 例の非 A 非 B 非 C 型肝炎患者の IgG 抗体および IgM 抗体を測定した結果、23 例 (23.5%) は IgG および IgM 抗体がともに陽性で E 型肝炎と診断された。HEV 流行地域への渡航歴の有無により非 A 非 B 非 C 型肝炎の E 型肝炎の発症率を比較すると、全く HEV 流行地域への渡航歴のない 32 例では 3 例 (9.4%), 渡航歴不詳な 10 例中 3 例 (30%), 発症するまで 2 カ月ほどの間に HEV 流行地域への渡航歴がある 56 例では 17 例 (30.4%) が

E 型肝炎と診断された。さらに、患者血清から RNA を抽出し、ORF1 および ORF2 の一部を RT-PCR で増幅後、塩基配列を解読し系統解析した。渡航歴のない 3 例の遺伝子型は G3 で、国内感染と考えられた。一方、海外渡航歴がある 17 の遺伝子型は G1 と G4 であって、輸入感染例と考えられた。渡航歴不詳な 3 例はわが国固有株と異なる G1 であるため、輸入感染例と推測された。岡本らの研究グループは 87 例の海外渡航歴のない非 A 非 B 非 C 型肝炎から 11 例 (13%) の E 型肝炎を検出している¹⁵⁾。いずれにしても、HEV は非 A 非 B 非 C 型肝炎の 1 つの重要な原因ウイルスである。これまでのわが国国内感染例と思われる E 型肝炎には以下の特徴がある。1) 患者はほとんど 40 歳以上の高齢層の男性である、2) 発症時期は季節と明瞭な関係はない、3) ALT と AST 値は高い (1,000 IU/L 以上)、4) 患者数における地域の差がある、5) 患者の大部分は生肉あるいは加熱不十分な肉を食べている、6) 遺伝子型は G3 と G4 である。

3. わが国の動物における HEV 感染状況

わが国ではブタから G3 と G4 の HEV 遺伝子が検出されている。ブタの平均抗体保有率は約 60% であるが、月齢によって異なり、2 カ月齢のブタが 7%, 3 カ月齢のブタが 40%, 4 カ月齢のブタが 87%, 5 カ月齢と 6 カ月齢のブタは 90% というように月齢とともに上昇する。HEV 遺伝子の検出率からみると、2, 3 カ月齢のブタから遺伝子の検出率が高く、6 カ月齢のブタからのそれは低い²⁶⁾。北海道で市販されている豚レバーからの HEV 遺伝子検出率が 1.9% であることもこの結果と一致している²⁷⁾。その他、わが国の野生ラット (ドブネズミ

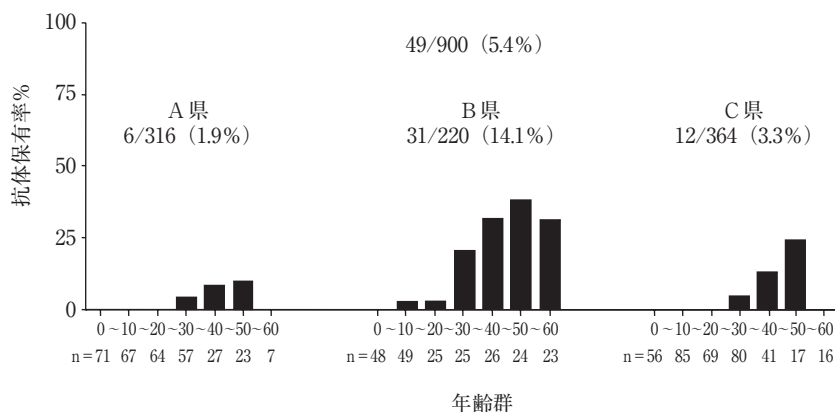


図6 日本人の HEV IgG 抗体保有率

およびクマネズミ)では13.3～31.5%, ニホンザルでは36%であることがこれまでの調査で明らかになった^{28,29)}。また、動物由来のHEVがヒトに感染する間接証拠となる症例がわが国で報告されている。一例は鳥取で発生したイノシシの生レバーの摂食が原因とみられる急性型肝炎の発症例と死亡例であり³⁰⁾、もう一例は長崎でのイノシシ肉の摂食に伴う集団感染例である³¹⁾。イノシシとブタは非常に近縁な動物なのでHEVに感染する可能性が高いと考えられる。

VII. E型肝炎ワクチン

E型肝炎ワクチンの研究開発はいくつかの研究グループによっては行われているが現時点ではまだ実用化に至っていない。E型肝炎ワクチンの研究にはDNAワクチンと組換え蛋白ワクチンとの2種類がある。DNAワクチンに関する報告は少ないが、最近、Gene gunを用いてORF2全長を含むプラスミドをカニクイザルに投与し、HEV抗体を誘導できることが報告された。HEVに対する感染防御を示したとされる³²⁾。

組換えワクチンの研究開発は主に構造蛋白をコードするORF2の組換え蛋白を用いて研究されてきた。接種ルートから注射ワクチンと経口ワクチンに分かれる。注射ワクチンの研究では組換えバキュロウイルス発現システムによって発現された56kDaの蛋白をサルに注射して、抗体を誘導している。この抗体は感染防御あるいは肝炎の発症を防御できることが示されている。また、異なる遺伝子型のHEVを用いたチャレンジ実験では同じG1に対してだけではなく、他のG2、G3 HEVにも感染防御を示した³³⁾。現在、56kDaの蛋白を用いた注射ワクチンの臨床試験は第三相まで進んでいるという。

一方、経口ワクチンの研究では筆者らはVLPをBALB/cマウスに経口投与することにより、血中IgG、IgM抗体だけでなく、腸管IgA抗体を誘導することに成功している³⁴⁾。腸管IgA抗体は粘膜免疫に重要な役割を果たすことが知られており、HEV感染に対する防御も期待できそうである。HEVに感受性を示すカニクイザルにVLPを経口投与したところ、血中IgG抗体が誘導され、ネイティブなウイルスによるチャレンジに対しても明瞭な感染防

御が認められた³⁵⁾。したがってVLPはワクチンとして有望であることが確認されている。

VIII. E型肝炎は人獣共通感染症か?

1997年、Mengらによって初めてブタからS1株が分離された¹³⁾。この株はその直後に全く海外渡航歴のない急性E型肝炎患者から分離されたUS1、US2株と非常に類似した株であった。この研究がきっかけとなって、ブタをはじめ種々の動物についてHEVの感染状況の調査が行われた。

これまでの報告によると、アメリカをはじめ、わが国、台湾、中国、韓国、インド、ネパール、カナダ、オーストラリア、スペインなど、数多くの国々のブタから抗体とウイルス遺伝子が検出されている。ブタの抗体保有率は各国間に差があり、20～96%であった。また、ブタ以外の動物の調査ではベトナムの鶏(44%)、犬(36%)、ラット(9%)、アメリカの野生ラット(44～94%)、ソマリア、タジキスタンの牛(29～62%)、羊と山羊(42～67%)、非流行地域であるウクライナの牛(12%)などの血清中にIgG抗体が存在することが報告されている^{36,37)}。これらの事実は多くの動物がHEVに暴露されている可能性を示している。

一方、ヒトの抗体保有率の調査では養豚業の従事者の抗体保有率は普通の人々の群より高いことが示されており、台湾では養豚業者の抗体保有率は26.7%で一般の人々の8%より有意に高い。また、獣医の抗体保有率が一般健康献血者より高いことも報告されている³⁸⁾。

現在、HEV遺伝子が検出されたのはブタ、シカおよびラットだけである。ウイルスの全長遺伝子が解析されたのはブタのみである。全長配列が解明されたブタHEVの中にはアミノ酸レベルでヒトHEVと100%一致する株が含まれている³⁹⁾。また、鶏からもHEVと類似のウイルス遺伝子が検出されているが、ヒトHEVとのホモロジーは50～60%であるので、これらが同じ属のウイルスであるかどうかはまだ断定できない。鶏HEVはヒトに感染する可能性は極めて低いと思われる^{40,41)}。

感染実験によって種を超えてHEVの感染が成立するとの報告がいくつかある。G3とG4のヒト由来HEVをブタに静脈注射すると、臨床的には無症

状に経過するが、肝組織は明らかな肝炎を呈し、血液、肝臓などの組織から HEV の遺伝子が検出される。ヒト HEV に対する抗体も急速に上昇する。このことからヒト HEV がブタで複製することが示唆されている⁴²⁾。興味深いことに、G1 と G2 の HEV では感染が成立しない。事実、現在ブタから分離される株はすべて G3 と G4 であり、G1 あるいは G2 がブタから分離されたという報告はない。つまり、遺伝子型によって、HEV の宿主に対する感受性が異なるのかもしれない。ブタ由来の HEV がヒトに感染するかどうかはまだ明らかではないが、ブタ由来の HEV を接種したアカゲザルではウイルス血症が起こり、便にウイルスが排泄される。したがってブタ由来の HEV はサルに感染する。シカ肉が原因と思われた感染例では患者血清と残存したシカ肉からほぼ同じ配列を持つ G3 の遺伝子が検出された。これは野生動物からヒトに伝播したことを証明する初めての症例で、E 型肝炎が人畜共通感染症である可能性が強く示唆されている¹⁾。しかし、シカの抗体保有率や HEV 保有状況などはまったく把握されておらずシカにおける HEV の感染経路は依然として不透明である。

おわりに

E 型肝炎はアジア、アフリカなどの衛生環境が整っていない地域の疾患とされていた。一方、先進国では「輸入感染症」と考えられてきた。しかし、近年、米国、ヨーロッパ、さらにわが国において海外旅行歴のない E 型肝炎症例が報告され、個々の先進国に固有株が存在することが明らかになった。現段階では HEV 感染を予防するワクチンはまだない。日本人の抗体保有率は低く、E 型肝炎が流行している地域で感染する危険性は高い。また日本人は食習慣から生肉を介して感染する危険性も高いと考えられる。海外渡航歴の有無、ブタ、イノシシ、シカの生肉あるいはレバーなどの摂食歴の有無は E 型肝炎の診断に有用な手がかりとなる。清潔の保証がない飲料水、非調理あるいは加熱不十分な肉類、貝類を摂らないことなど、HEV 感染を防止するうえで重要である。

文 献

- 1) Tei S., et al.: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. **362**(9381): 371-373, 2003.
- 2) Takahashi K., et al.: Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* **287**(1): 9-12, 2001.
- 3) Purcell R.H.: Hepatitis E virus, In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996. p. 2831-2843.
- 4) Jameel S., et al.: Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J Med Virol*, **37**(4): 263-270, 1992.
- 5) Balayan M.S., et al.: Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**: 23-31, 1983.
- 6) Bradley D., et al.: Aetiological Agent of Enterically Transmitted non-A, non-B Hepatitis. *J. gen. Virol.*, **69**: 731-738, 1988.
- 7) Reyes G.R., et al.: Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted Non-A, Non-B hepatitis. *Science* **247**(4948), 1335-1339, 1990.
- 8) Chauhan A., et al.: Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet*. **16;341**(8838):149-150, 1993.
- 9) Tam A.W., et al.: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**(1), 120-131, 1991.
- 10) Maila H.T., Bowyer S.M., Swanepoel R.: Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J. Gen. Virol* **85**: 89-95, 2004.
- 11) Schlauder G.G., et al.: 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* **79** (3): 447-456, 1998.
- 12) Erker J.C., et al.: A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*. **80** (3): 681-690, 1999.
- 13) Meng X.J., et al.: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9860-9865, 1997.
- 14) Wang Y., et al.: A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* **80**: 169-177, 1999.
- 15) Mizuo H., et al.: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol* **40** (9):3209-3218, 2002.
- 16) Takahashi K., et al.: Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute spo-

- radic hepatitis. *J Infect Dis.* **185**(9): 1342-1345, 2002.
- 17) Okamoto H., et al.: Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **289**(5): 929-936, 2001.
 - 18) Reyes GR., et al.: Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol [Suppl]*, **7**: 15-25, 1993.
 - 19) Berke T., Matson, DO.: Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* **145**(7): 1421-1436, 2000.
 - 20) ICTV approved Virus Orders, Families and Genera. (<http://www.ictvdb.iacr.ac.uk/Ictv/fr-fst-g.htm>)
 - 21) Khuroo M.S., et al.: Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* **70**: 252-255, 1981.
 - 22) Tsarev S.A., et al.: ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open reading frame 2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J. Infect. Dis* **168**(2): 369-378, 1993.
 - 23) Purdy M.A., et al.: Expression of a hepatitis E virus (HEV)-trpE fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Microbiol Immunol*, **36**(6): 615-621, 1992.
 - 24) T-C Li., et al.: Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol* **71**: 7207-7213, 1997.
 - 25) T-C Li., et al.: An empty virus-like particlebased enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* **62**: 327-333, 2000.
 - 26) Takahashi M., et al.: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol.* **84**(Pt 4): 851-862, 2003.
 - 27) Yazaki Y., et al.: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* **84**(9): 2351-2357, 2003.
 - 28) Hirano M., et al.: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepato Res.* **27**(1): 1-5, 2003.
 - 29) Hirano M., et al.: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn J Infect Dis.* **56**(1): 8-11, 2003.
 - 30) Matsuda H., et al.: Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis.* **188**(6): 944, 2003.
 - 31) Tamada Y., et al.: Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, in Press, 2004.
 - 32) Kamili S., et al.: Protective efficacy of hepatitis e virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis.* **189**(2): 258-264, 2004.
 - 33) Purcell R.H., et al.: Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine.* **21**(19-20): 2607-2615, 2003.
 - 34) T-C Li., et al.: Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* **19**: 3476-3484, 2001.
 - 35) T-C Li., et al.: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine.* **22**(3-4): 370-377, 2004.
 - 36) Meng X.J.: Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* **33**(5): 842-845, 2000.
 - 37) Kabrane-Lazizi Y., et al.: Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **61**(2): 331-335, 1999.
 - 38) Meng X.J., et al.: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol.* **40**(1): 117-122, 2002.
 - 39) Nishizawa T., et al.: Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J Gen Virol.* **84**(5): 1245-1251, 2003.
 - 40) Haqshenas G., et al.: Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol.* **82**: 2449-2462, 2001.
 - 41) Haqshenas G., et al.: The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J. Gen. Virol* **83**: 2201-2209, 2002.
 - 42) Meng X.J., et al.: Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**(12): 9714-9721, 1998.