E型肝炎 —もう一つの経口伝播するウイルス性肝炎の病原と臨床—

中園直樹¹⁾, 川俣 治²⁾, 川口竜二^{*2)}, 黄 如統¹⁾, 引地一昌²⁾, 塚田 裕^{*2)}, 石井慶蔵²⁾

(¹関西医科大学公衆衛生学)

(²エスアールエル, 遺伝子・染色体解析センター)

ウイルス性肝炎には以前より, 飲料水や糞便などを介する感染と, 輸血, 授乳, 性交などの体液を介する感染が知られており, これらのほとんどは前者が A 型肝炎ウイルス (HAV) により, また後者が B 型肝炎ウイルス (HBV) による肝炎である。しかし, その両者いずれにも属さない非 A 非 B (NANB) 肝炎の存在が指摘され, しかもそのウイルスは複数存在することが明らかにされている。

輸血後肝炎を起こす HBV 以外の病原の存在は以前から推定されていたが, なかなか発見されなかった。従来のウイルス学的手法とは全く異なる reversed genetics (positional cloning) という方法で, 遺伝子の断片から起因ウイルスを同定できたのが C 型肝炎ウイルスである。

D 型肝炎は, デルタウイルスによるもので, このウイルスは単独では作用せず, その感染には HBV の共存が必要とされる。

さらに水系伝播する NANB 肝炎の存在がインドや中央アジアなどで知られ, これは経口伝播する肝炎 (enterically-transmitted non-A, non-B (ET-NANB) hepatitis) と呼ばれた。ET-NANB 肝炎は主にアフリカ北

部, 中米およびアジア南部で流行し, 発生が開発途上国であったためにその解明に時間がかかった。しかし, 近年ではその知見も豊富となり, 多くの流行で同一の病原ウイルスによることが明らかになり, これは第 5 番目の肝炎のウイルスとして E 型肝炎ウイルス (HEV) と命名された^{1,2)}。

E 型肝炎は疫学的だけでなく臨床的にも A 型肝炎に似て予後も良いが, 妊婦が感染すると致死率は約 20% と異常に高い。また E 型肝炎は発展途上国で数万人規模の集団発生をしばしば起こす。現在では HEV のウイルス学的研究も進み, 病原診断も可能となった。さらに, このウイルスの遺伝子組み換えによるタンパク発現がいくつか行われている。

I 発生状況と地域

最初の ET-NANB 肝炎の発見は 1955 年のニューデリーでの流行で, 2 万 9 千人の黄疸患者が認められた。同じ頃, 旧ソ連のキルギス共和国でも同様な肝炎の流行があった³⁾。これらに共通する特徴は, とともに飲料水による汚染であったことと 15-40 歳の年齢層に好発したことである。また近年ではインドの西部や南部で流行し, 特に 1991 年には飲料水汚染による 8 万人近い感染が報告されている。インドで毎年のように発生する流行は血清学的に HEV によるものであることが明らかにされている⁴⁾。

中国では 1982 年以来 9 回の流行が報告され, 発生地域は吉林, 遼寧, 河北, 河東, 内蒙古, 新疆ウイグルの 6 省と自治区で起こり, そのうち 5 つの流行は水系伝播で, 他は食物伝播によるものである。その後, 新疆ウイグル自治区では 1986-1991 年に大規模な 4 つの流行が発生し, 広州でも流行があった⁵⁾。

アジアの他の国においては, パキスタン, ミャンマ

Hepatitis E: Etiology and clinics of another enterically transmitted hepatitis.

Naoki Nakazono¹⁾, Osamu Kawamata²⁾, Ryuji Kawaguchi^{*2)}, Huang Rutong¹⁾, Kazumasa Hikiji²⁾, Yutaka Tsukada²⁾, and Keizo Ishii²⁾

¹⁾ Department of Public Health, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka 570.

²⁾ Center for Molecular Biology and Cytogenetics, SRL Inc., Komiya-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192

¹⁾ 〒570 大阪府守口市文園町 10-15

²⁾ 〒192 東京都八王子市小宮町 51

* 別刷請求先 (Corresponding)

図1 E型肝炎の発生地域（黒塗り）

一の流行からウイルスが検出され、またネパール、タイ、ボルネオでも疫学的に似た流行があった。旧ソ連の中央アジア地区でもいくつかの流行が知られ、病原ウイルスも検出されている⁶⁾。このようにアジアでは発展途上国に広範囲かつ頻繁に流行が発生している。

アフリカでは北部（アルジェリア）、西部（アイボリーコスト）、南部（ボツワナ）および東部（スーダン、エチオピア、ソマリア）のそれぞれから ET-NANB 肝炎の流行が報告されている^{2,4)}。特にアフリカ東部の流行は大規模で、主として難民にみられ、またエチオピアでは E 型肝炎が急性肝炎の主因の一つであり、感染妊婦の主要な死因となっている⁷⁾。

中央アメリカでは1986年にメキシコシティに近い村落で流行し、HEV が検出された⁸⁾。しかし、南アメリカでの流行の報告はない。これらを総合すると、HEV の流行はアジア、アフリカおよび中米の三大陸で起こり、その発生地域は赤道付近に集中している（図1）。

先進国での発生もしばしばみられるが、いずれも発展途上国から帰国した場合（輸入肝炎）かそれを媒介とした2次感染に限定される。米国では三大陸からの輸入例が報告されており、また英国、ドイツ、オランダなどでの報告例もある⁹⁾。わが国でもインド旅行から帰国後、発症した例がある¹⁰⁾。

II 臨床および病理所見

E 型肝炎は臨床的には A 型肝炎と類似する。臨床所見は主に発黄した入院患者から得られるが、E 型肝炎に感染すると、平均40日（22-60日）の潜伏期の後に、発熱と消化器症状が急速に始まる。消化器症状は悪心、腹痛などで、時に下痢もみられ、数日の倦怠感、食欲不振などの症状が先行することもある。黄疸は平均5日（0-10日）後に出現し、しばしばかゆみを伴い、肝腫大もみられる。この時期に、尿は褐色で時に関節痛も訴えるが、脾腫大は稀である。発黄後は通常消化器症状が消失し、黄疸は出現後5-15日に最高となり、3-6週後に消失する。流行時には急性無黄疸性肝炎、劇症肝炎および亜急性肝炎の患者もみられる。致死率は3-5%で、長期観察での慢性肝障害はみられない。

検査所見では、血清ビリルビン値は発病初期から極期にかけて次第に増加するが、5-15mg/dl のことが多い。血清トランスアミナーゼ（グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、GPT）値は感染時期や症状によって変動するが、一般に発病直後に最高値を示し、比較的急速に低下する。急性期には通常400単位以上となり、GPT 値がグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）値よりも高いことが多い。

妊婦の感染が重症で予後が悪いことは多くの E 型肝炎の流行で共通している。例えば、カシミールでの流

行の平均罹患率は1.7%であったが、そこでの妊婦の罹患率17.3%は非妊婦（経産婦）の2.1%、男性（15-47歳）の2.8%より有意に高い。肝炎発症を妊婦時期別にみると、妊娠初期に比して中期、後期で2倍以上に高い。また妊婦の重症肝炎発生率は22.2%で対照群に比して有意に高く、重症肝炎は遅い妊娠時期の患者に多く発生している。しかし、治癒した妊婦の胎児発育には影響ない¹¹⁾。妊婦の高い感受性と重症化の原因は不明であるが、これはE型肝炎が他の肝炎と違う特徴の一つである。

HEVが劇症肝炎の1つの原因であることは以前から指摘されていた。血清材料を用いたreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により、一部の劇症肝炎からHEVのゲノムRNAが検出されている¹²⁾。

E型肝炎の肝の病理所見は基本的には急性期の組織学的病変を示す。またE型肝炎では肝の胆汁うっ滞性の肝炎像を特徴とし、拡張した小血管周囲に肝細胞の偽管性配列と胆管の増殖を伴う。生検肝の58%に組織学的な胆汁うっ滞像をみた例も報告があり、肝の胆汁うっ滞は多くのHEV感染患者で確認されている⁵⁾。

III HEVの性状と分子化学的構造

a) 動物感染モデルの作製

ヒト以外の霊長類へのウイルスの接種については1983年に、免疫電子顕微鏡(IEM)で陽性に認められたE型肝炎ウイルス様粒子(27-30nm)を有する患者の便材料をカンクイザルに接種したのが最初の報告である¹³⁾。この感染実験では接種後2-4-36日にGPTが上昇し、接種したものと同様の粒子がサル便中に排出され、またそれはIEMでも陽性に認められた。次いで接種動物をカンクイザルからミドリザル、タマリンと換えて行った実験や、流行地を換えて採取した患者材料を用いた接種でも、同様な感染結果が得られた¹⁴⁾。さらにインドではチンパンジーへの接種で¹⁵⁾、またロシアではブタへの接種で⁶⁾、それぞれ感染実験に成功している。

カンクイザルは最も高率にHEV感染を起こす動物で、感染すると明瞭な肝炎像の変化が認められる。2-15kgのカンクイザルにHEV陽性の胆汁または便材料を静脈内に接種すると、接種10-19日後の早期所見としては、血清GPTの上昇が認められ、12-14日後には肝の病理組織学的変化が、また14-22日後には肝におけるHEV抗原と胆汁内のウイルス粒子の出現が認められる¹⁶⁾。その後肝病変が拡がり28-39日後にはGPT値がピークとなる。そのころは血中の抗HEV抗体が検出され、肝の

HEV抗原は消失するが病理変化は持続してみられる。

b) 形態学および分子化学的性状

HEVはそのウイルス表面に突起と窪みを持つが、エンペロープを持たない直径30-34nmの球形粒子である。粒子の大きさは直径27nm程度とする報告もある²⁾。HEV感染粒子の沈降係数は183Sで、一部小型の165Sを示すものもあるが、これは183S粒子が体内の消化酵素の処理を受けたものと考えられている。塩化セシウム密度勾配遠心法から得られる浮遊密度は1.29~1.35g/cm³である。HEVはまた高濃塩濃度下や凍結融解で不活化される。これらの性状を総合して、HEVはカリシウイルス科(Caliciviridae)に近いと考えられている¹⁷⁾。同様の感染経路および臨床症状を示すピコルナウイルス属のHAVはGC含量(HEVの58%に対し、HAVは37%)も基本構造(オープンリーディングフレーム(ORF)のサイズと位置など)も大きく異なり、HEVとピコルナウイルスとは全く別種である。一方、非構造タンパクのコンピュータ解析から、風疹ウイルスやある種の植物ウイルスとの類似が指摘され、新しいスーパーグループへの分類も提唱されている¹⁸⁾。

c) HEVの遺伝子構造

HEVは+鎖の一本鎖RNAウイルスで、約7.2kbのゲノムRNAを有する。HEVの遺伝子解析はマンマの分離株で初めて行われ¹⁹⁾、ついでパキスタン株²⁰⁾、メキシコ株²¹⁾および中国株^{22,23)}などで塩基配列が決定された。

HEVゲノムの基本構造は5'端から3'端へ向かって、5'-非翻訳領域-非構造領域-構造領域-非翻訳領域-ポリA-3'となる。翻訳領域には3つのORF(ORF1~ORF3)がある。

ORF1は最大のフレームで、1,693アミノ酸をコードする非構造タンパク領域である。そこにはパパイン様プロテアーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ポリプロリンヒンジ、ヘリカーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼおよび機能が明らかでないX、Y-ドメイン遺伝子が配置され、またORF-1上には超可変領域が存在する¹⁸⁾。

ORF2はORF1の下流にある660アミノ酸をコードする構造蛋白質領域で、先頭にシグナル配列を有する。ORF3はORF1、2と一部重複する123アミノ酸をコードする小さな構造タンパク領域であるが、既存のタンパクとのアミノ酸の相同性も低く、その機能は十分に明らかではない(図2)。

図2 E型肝炎ウイルスゲノムの構造

インド株には ORF3 に大きな欠失があるという報告もあるが、その他の遺伝子変異の多くは点変異であり^{21), 22)}, 他の RNA ウイルス同様に 5' 非翻訳領域や機能蛋白領域の塩基配列はよく保存されている。

遺伝子の全配列が決定された株で相同性を比較すると、大陸を隔てたメキシコ株とアジア株(パキスタン, ミャンマー, および中国株)の間で相同性が低い²¹⁾。

フレーム別では ORF3 が最もよく保存され、次いで ORF2 が保存されている。しかし、ORF1 でもポリメラーゼを含む領域が保存されていることは多くの報告で一致している³²⁾。同じ地域から分離された HEV ゲノムの塩基配列は HEV が RNA ウイルスでありながら他の RNA ウイルス、例えば HCV や HIV に比べて比較的変異が少ない。これは HEV がエンベロープを有さず、その抗原としての変異速度が遅く、従って HEV 感染による慢性化が起こらないことを示唆するものと思われる。

d) 抗原決定基

Reyes らはビルマの患者便由来の感染サル胆汁から 1 つのクローン (ET1.1) を単離した¹⁾。ET1.1 は ORF1 の下流域に位置し、1,299bp からなり、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードする。

また、Yarborough らはメキシコの患者材料から、2 つのクローン (406.3.2 と 406.4.2) を単離した。クローン 406.3.2 は ORF2 の最下流域に、またクローン 406.4.2 は ORF3 上に位置している。これらのクローンを用いたエピトープ解析の結果から、これらは各地の流行患者血清、感染サル血清と特異的に反応する抗原決定基をコードしていることが明らかになった²⁴⁾。これらの抗原は後にミャンマー株からも単離され、ELISA による血清診断に利用可能となった。

構造領域 (ORF2) から単離されたもう 1 つのクローン C 2 は、メキシコ株に由来する 1,700bp の断片で、これを用いた遺伝子組換え技術により、タンパクが精製された²⁵⁾。C 2 蛋白はウェスタンブロットで HAV または HBV 患者血清とは反応せず、広く各地の HEV 患者血清と特異的に反応する抗原決定基を有する。C 2 蛋白によって免疫されたカンクイザルは、野性型の HEV (ミャンマー株とパキスタン株) の攻撃から防御され、生化学的にも、また病理組織学的にも肝炎の所見は認められなかった²⁶⁾。HEV のウイルス遺伝子の全領域をカバーして作製した合成ペプチドを抗 HEV 抗体と反応させて抗原決定基マップを作成した報告がある。それによると抗原決定基はすべての 3 つの ORFs 上に同定されたが、最も強い反応性は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域で、次いで ORF 2 で強い免疫反応がみられ、ORF 3 の決定基はカルボキシル末端と接する領域に限定されていた²⁷⁾。

Khudyakov らは構造領域の ORF2 と ORF3 の抗原決定基について一連の研究を行った。まず両フレームの殆ど全領域をコードする 15 個のオリゴペプチドを合成し、ORF 2 に 2 つの強い免疫原性をもつ領域を見出した。さらに別のペプチドを用いて、免疫原性を持つ領域として少なくとも 2 つの領域 (アミノ酸番号 394-470 位置と 546-580 位置) を同定した²⁸⁾。ORF3 でも同様にアミノ酸番号 91-123 位置の領域に強い免疫原性が検出され、異なった流行地の患者血清に対する反応性に差があることが明らかになった²⁹⁾。

大分子のタンパクを発現させて診断用抗原を作る試みもされている。HEV 構造蛋白を、遺伝子組換えの手法を用いて、バキュロウイルスでクローニングし、ORF2 領域のみを発現させた報告や³⁰⁾、ORF2 と ORF 3 の全領域のタンパク質を発現させた報告³¹⁾がある。

e) *in vitro* 培養

従来多くの罹患者材料を用いて種々の培養細胞株に対する感染実験を行い、ウイルスの分離が試みられたが、分離出来ないというのが定説であった²⁾。しかし最近、培養細胞（ヒト胎児肺2倍体(2BS)細胞）を用いて、肝炎患者便からHEVを分離した報告がなされた³²⁾。Huangらによると1987年の新疆省の流行時の患者便から得られたHEVを2BS細胞に感染させたところ、2代培養でCPEを生じ、またこの感染細胞は継代でき、再現性もあったという。この分離株はHEV感染チンパンジー血清によって、また中国、ミャンマー及びキルギスタンの患者血清によっても凝集される。この分離株はミャンマー株ゲノムの塩基配列と高い相同性がみられたという(私信)。培養細胞によるHEVの分離はこの報告が最初であるが、その後中央アジアの流行株を培養株化させたという報告もある³³⁾。

f) ウイルスの排出

HEVは胆汁や血清中にも存在するが便を通じて排泄される。排出期間は発症して6病日以内が多い³²⁾。便内のHEV濃度は電子顕微鏡のグリッド当たり $<1-5$ 粒子で³⁴⁾、これは便1g当たり 10^8 粒子に相当する。通常HAV, Rota, Norwalkの各ウイルスではこれより高い粒子数が便中にみられ、HAVでは排出期間も長い。E型肝炎の流行時に家族内感染が少なく、小児患者が少ないという所見は、ウイルスの安定性のほかに、排出期間と関連することが予想される。

IV 診 断

初期の研究では便からの電子顕微鏡像によるウイルス粒子の検出、免疫電顕による病原ウイルスの同定、および生検肝の蛍光抗体法による染色などが診断方法として行われた。従来、便材料へのHEV排出が少ないことから便を用いた診断法では十分ではなかった。しかし、近年HEVの塩基配列の決定やcDNAクローンの単離がなされるにつれ、血清反応や遺伝子診断法が開発された。そして以下に示すような感度、特異性の高い病原診断の試みが始まった。

a) 酵素免疫測定 (ELISA) 法

カシミールの流行で肝炎患者(45名)の血清で前述の406, 3, 2と406, 4, 2と領域を抗原としてELISAで抗体を測定した結果、IgG抗体は71%に検出され、その陽性者の75%からIgM抗体が検出された³⁵⁾。

非流行国での散発例でも、HEV肝炎の血清診断に用いられた報告がある。香港の急性肝炎患者の17%がELISA法によるHEV抗体測定でIgG抗体陽性であり、その約1/3にIgM抗体も検出された。また急性非A非B非C(NANBNC)型肝炎患者では33%からIgM抗体が検出された³⁶⁾。シンガポールではNANBNC肝炎の12%が、またその他の肝疾患で12-25%がIgG抗体陽性を示した。スペインでは2種類の混合抗原を用いて測定したところ、NANBNC肝炎患者の6%がIgG抗体陽性であった⁹⁾。

b) ウェスタンブロット (WB) 法

Favorovら³⁷⁾は抗C2タンパク抗体を用いたWB法によって、ソ連、メキシコの146名のNANBNC肝炎患者についてHEV抗体を調べたところ、IgG抗体を93%に、IgM抗体を73%に検出した。IgM抗体は黄疸発症後26日以内の患者の73%で、発病後1-4ヶ月で50%、6-7ヶ月で6%に検出されたが、8ヶ月以降は検出されていない。

c) RT-PCRによる遺伝子検出

ウイルスの存在を直接知る方法として、一般的に用いられる方法であり、HEVゲノムのポリメラーゼをコードする領域のRNAに対するcDNA合成と、その増幅により特異的にウイルスを検出する方法(RT-PCR法)がある。この方法により、HEV感染患者10名中6名の便材料からHEV遺伝子が検出された³⁸⁾。発病後、2-3病日経過した患者の血清でもRT-PCR法により、高率にHEV遺伝子が検出される³⁹⁾。

V 伝播の特徴

a) 家族内伝播

HEV感染では、家族集積性がHAV感染により低い³⁾。例えばインドの旅行では家族内に1名の患者が86%、2名が10%、3名が4%であり、家族内の二次感染は15家族、26名に過ぎない⁴⁾。中国の流行では複数患者発生は19.5%であり、患者との接触者の感染にたいする相対リスクは18倍という⁵⁾。またスーデンにおける散発患児の研究で、患者派生が住居内の給水設備と関連するとした知見も示唆に富む⁴⁰⁾。

b) 好発季節

大流行が雨期または洪水時に起こることは定説になっている。例外として給水施設の故障によることもある。食物伝播の流行は特に好発季節はない⁵⁾。インドの

汚水処理施設では濃縮下水を用いて RT-PCR 法でウイルス遺伝子を検出することで, 水系流行予防をモニターする方法も考えられている⁴¹⁾。

VI 予 防

上下水道が比較的整備されているわが国においては, HEV が常在するにしても E 型肝炎が集団発生する可能性は低い。またその予防には A 型肝炎と同様に感染源と感染経路を絶つことが重要で, 患者便の衛生的処理と水, 食物の衛生的管理にある。また貝産物が感染源とする報告もある⁶⁾。

A 型肝炎のように γ -グロブリンが E 型肝炎の予防に有効かどうかは不明である。流行中に γ -グロブリンによる予防を試みた報告はある。メキシコでの流行時, ヒト免疫グロブリンを住民に注射したが, 2 週間以後に 6 名が発病し, 効果が疑われた⁵⁾。また中国では自家製のヒト免疫グロブリンを住民に用い, 二重盲検法で 2 月半観察し, 免疫グロブリン群 78 名中 7 名, 対照群 66 名中 5 名が発病し, 投与効果は無効と判定された⁵⁾。

VII ま と め

E 型肝炎に関する疫学的, 臨床的知見および HEV の特性について述べた。E 型肝炎は熱帯の発展途上国にとっては, 今なお深刻な感染症であり, 症状は A 型肝炎に似ているが, 妊婦への感染率と重症度では A 型肝炎よりも手ごわい病気である。今後の課題として, 妊婦への高い感染理由の説明と, 効率的なウイルス感染細胞培養株の樹立があろう。さらにインドなどで毎年のごとく見られる集団発生を防止するために, また諸先進国から派遣される海外協力事業従事者のためにもワクチンの開発が待たれるところである。

文 献

- 1) Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.-C., Young, L.A., Fry, K.E. and Bradley, D.W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **247**, 1335-1339.
- 2) Bradley, D.W. (1990). Hepatitis non-A, non-B viruses become identified as hepatitis C and E viruses. *Progr. Med. Virol.* **37**, 101-135.
- 3) Naik, S.R., Aggarwal, R., Salunke, P.N. and Mehrotra, N.N. (1992). A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India.

Bull. WH **070**, 597-604.

- 4) Ramalingaswami, V., and Purcell, R.H. (1988). Waterborne non-A, non-B hepatitis, *Lancet* **1**, 571-573.
- 5) Zhuang, H., Cao, X.-Y., Lin, C.-B. and Wang, G.-M. (1991). Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol. Jpn.* **26**, Suppl. **3**, 135-138.
- 6) Balayan, M.S. (1993). Hepatitis E virus infection in Europe: Regional situation regarding laboratory diagnosis and epidemiology. *Clin. Diag. Virol.* **1**, 1-9.
- 7) Tsega, E., Hansson, B.-G., Krawczynski, K. and Nordenfelt, E. (1992). Acute sporadic viral hepatitis in Ethiopia: Causes, risk factors, and effects on pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 961-965.
- 8) Velazquez, O., Stetler, H.O., Avila, C., Ornelas, G., Alvarez, C., Hadler, S.C., Bradley, D.W. and Sepulveda, J. (1990). Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico. 1986-1987. *JAMA* **263**, 3281-3285.
- 9) CDC (1993). Hepatitis E among U.S. travelers. 1989-1992. *MMWR* **42**, 1-4.
- 10) Hino, K., Kondo, T., Niwa, H., Uchida, T., Shikata, T., Rikihisa, T. and Mizuno, K. (1991). A small epidemic of enterically transmitted non-A, non-B acute hepatitis. *Gastroenterol. Jpn.* **26** (Suppl. 3), 139-141.
- 11) Khuroo, M.S., Teli, M.R., Skidmore, S., Sofi, M. A. and Khuroo, M.I. (1981). Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am. J. Med.* **70**, 252-255.
- 12) Nanda, S.K., Yalcinskaya, K., Panigrahi, A.K., Acharya, S.K., Jameel, S. and Panda, S.K. (1994). Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminant hepatitis. *J. Med. Virol.* **42**, 133-137.
- 13) Kane, M.A., Bradley, D.W., Schreetha, S.M., Maynard, J.E., Cook, E.H., Mishra, R.P. and Joshi, D.D. (1984). Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal. Recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* **252**, 3140-3145.
- 14) Arankalle, V.A., Tichehurst, J., Sreenivasan, M. A., Kapikian, A.Z., Popper, H., Pavri, K.M. and

- Purcell, R.H. (1988). Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A. non-B hepatitis. *Lancet* **1**, 550-554.
- 16) Longer, C.F., Denny, S.L., Caudill, J.D., Miele, T.A., Asher, L.V.S., Myint, K.S.A., Hung, C.C., Engler, W.F., LeDuc, J.W., Binn, L.N. and Ticehurst, J.R. (1993). Experimental hepatitis E: Pathogenesis in cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* **168**, 602-609.
 - 17) Bradley, D.W. and Balayan, M.S. (1988). Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **i**, 819.
 - 18) Koonin, E.V., Gorbalenya, A.E., Purdy M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R. and Bradley, D.W. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8259-8263.
 - 19) Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huaug, C.-C., Bradley, D.W., Fry, K.E. and Reyes, G.R. (1991). Hepatitis E virus: Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**, 120-131.
 - 20) Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Reyes, G.R., Tsareva, T.S., Legters, L.J., Malik, I.A., Iqbal, M. and Purcell, R.H. (1992). Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 559-563.
 - 21) Huang, C.-C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K.Y., Fry, K.E., Bradley, D.W., Tam, A.W. and Reyes, G.R. (1992). Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* **191**, 550-558.
 - 22) Aye, T.T., Uchida, T., Ma, X.-Z., Iida, F., Shikata, T., Zhuang, H., and Win, K.M. (1992). Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3512.
 - 23) Aye, T.T., Uchida, T., Ma, X.-Z., Iida, F., Shikata, T., Ichikawa, M., Rikihisa, T. and Win, K.M. (1993). Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes* **7**, 95-110.
 - 24) Yarbough, P.O., Tam, A.W., Fry, Krawczynski, K., McCaustland, K.A., Bradley, D.W. and Reyes, G.R., (1991). Hepatitis E virus: Identification of type - common epitopes. *J. Virol.* **65**, 5790-5797.
 - 25) Purdy, M.A., McCaustland, K.A., Krawczynski, K., Tam, A., Beach, M.J., Tassopoulos, N.C., Reyes, G.R. and Bradley, D.W. (1992). Expression of a hepatitis E virus-trp E fusion protein containing epitopes recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Arch. Virol.* **123**, 335-349.
 - 26) Purdy, M.A., McCaustland, K.A., Krawczynski, K., Spelbring, J., Reyes, G.R. and Bradley, D.W. (1993). Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* **41**, 90-94.
 - 27) Kaur, M., Hyams, K.C., Purdy, M. A., Krawczynski, K., Ching, W. H., Fry, K. E., Reyes, G.R., Bradley, D.W. and Carl, M. (1992). Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 3855-3858.
 - 28) Khudyakov, Y.E., Favorov, M. O., Jue, D.L., Hine, T.K. and Field, H. A. (1994). Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology* **198**, 390-393.
 - 29) Khudyakov, Y.E., Khudyakova, N. S., Jue, D. L., Wells, T. W., Padhya, N. and Fields, H.A. (1994). Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **75**, 641-646.
 - 30) Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Kapikian, A. Z., Ticehurst, J., London, W. and Purcell, R. H. (1993). ELISA for antibody to hepatitis E virus based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: Identification of HEV infection in primates. *J. Infect. Dis.* **168**, 369-378.
 - 31) He, J., Tam, A. W., Yarbough, P. O., Reyes, G. R. and Carl, M. (1993). Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative struc-

- tural proteins expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2167-2173.
- 32) Huang, R. T., Li, D. R., Wej, J., Huang, X. R., Yuan, X. T. and Tiaan, X. (1992). Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J. Gen. Virol.* **73**, 1143-1148.
 - 33) Kazachkov, Y. A., Balayan, M. S., Ivannikova, T.A., Panina, L. I., Orlova, T. M., Zamyatina, N. A. and kusov, Y. Y. (1992). Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch. Virol.* **127**, 399-402.
 - 34) Ticehurst, J., Popkin, T. J., Bryan, J. P., Innis, B.L., Duncan, J. F., Ahmed, A., Iqbal, M., Malik, I., Kapikian, A. Z., Legters, L. J. and Purcell, R. H. (1992). Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: Serological responses and pattern of virus excretion. *J. Med. Virol.* **36**, 84-92.
 - 35) Skimore, S. J., Yarbough, P. O., Gabor, K.A. and Reyes, G. R. (1992). Hepatitis E virus: The cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J. Med. Virol.* **37**, 58-60.
 - 36) Lok, A.S.F., Kwan, W.-K., Moeckli, R., Yarbough, P. O., Chan, R.T., Reyes, G. R., Lai, C.-L., Chung, H. -T, and Lai, T. S. T. (1992). Seroepidemiological survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassay. *Lancet* **340**, 1205-1208.
 - 37) Favorov, M. O., Fields, H. A., Purdy, M.A. Yashima, T. L., Aleksadrov, A. G., Alter, M. J., Yarasheva, D. M., Bradley, D. W. and Margolis, H. S. (1992). Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* **36**, 246-250.
 - 38) Ray, R., Aggarwal, R., Salunke, P. N., Methrotra, N. N., Talwar, G. P. and Naik, S. R. (1991). Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in north India. *Lancet* **338**, 783-784.
 - 39) Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Mushahwar, I. K., Ritter, A., Sutherland, R., Moaness, A. and Kamel, M. A. (1993). Viraemia in Egyptian children with hepatitis E virus infection. *Lancet* **341**, 378.
 - 40) Hyams, K. C., Purdy, M. A., Kaur, M., McCarthy, M. C., Hussain, M. A., El-Tigani, A., Krawczynski, K., Bradley, D. W. and Carl, M. (1992). Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: Analysis based on a new Western blot assay. *J. Infect. Dis.* **165**, 1001-1005.
 - 41) Jothikumar, N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S. and Khanua, P. (1993). Detection of hepatitis E virus in raw and treated waste water with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2558-2562.