

E 型肝炎ウイルス 検出マニュアル

(第 2 版)

平成 30 年 12 月

目 次

1. 疾患の概説	3
2. 検査に関する一般的注意	5
(1) 作業上の注意	
(2) 検査材料の採取	
(3) 検査材料の輸送	
(4) 検査の進め方	
3. 検査方法	6
(1) 遺伝子検査	
(1-1) RT-PCR 法	
(1-2) リアルタイム PCR 法	
(2) 血清学的検査：ELISAによる抗HEV IgGとIgM抗体の検出	
4. 参考文献	16
5. 連絡先	18
6. 執筆者一覧	18
7. 謝辞	18

1. 疾患の概説

E型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus, HEV) は、E型肝炎の原因ウイルスである¹⁾。発展途上国では、糞便に排泄されたHEVによる経口感染により、散発的に発生している疾患であるが、ときに大規模に流行することもある。E型肝炎は、日本ではこれまであまり馴染みのない疾患であり、輸入感染症と認識されてきた。しかし、90年代後半からブタ、イノシシ、シカ、サル、ウサギ、ラクダ、マングースなどからヒト由来HEVと遺伝学的に区別できないHEVが次々と分離され、さらに、イノシシ、ブタ、シカ、ラクダ由来のHEVはヒトに感染することが証明され²⁻⁴⁾、E型肝炎は人獣共通感染症であることが明らかとなってきた^{5,6)}。加熱不十分の豚肉やシカ及びイノシシなどの野生動物の肉の喫食による食中毒事例もしばしば報告されていることから、E型肝炎ウイルスも原因不明食中毒の一端を担っていたものと考えられる⁷⁾。

HEVはエンベロープを持たないプラス一本鎖のRNAウイルスであり、ヘペウイルス科 (*Hepeviridae*)、*Orthohepevirus* 属に分類される。ヘペウイルス科には *Piscihepevirus* 属もあり、魚由来のCutthroat trout virusはこの属に分類されるが、それ以外のヒトを含めたほ乳類、鳥類、魚類など様々な動物から分離されているHEV株はすべて *Orthohepevirus* 属に分類される⁸⁾。 *Orthohepevirus* 属のHEVはさらに *Orthohepevirus* A, B, C, Dの四つのspeciesに分けられている。 *Orthohepevirus A*はG1からG8まで8つの遺伝子型が含まれ、ヒト、ブタ、イノシシ、シカ、ニホンザル、マングース、ウサギ、ラクダ由来HEVがこのspeciesに属する。トリ由来Avian HEVは *Orthohepevirus B*、フェレット、ラット、ミンク由来HEVは *Orthohepevirus C*、コウモリ由来Bat HEVは *Orthohepevirus D*に属する。ただし、最近ヘラジカやチョウゲンボウから検出されたMoose HEV, Kestrel HEVが属するspeciesは未確定である。

HEVゲノムの全長は6.9~7.2 kbであり、5'末端にはcap構造が、3'末端にはポリA鎖が付加されている。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⁸⁾。5'末端の27塩基の非翻訳領域に続く約5,000塩基のORF1は非構造タンパク質をコードする。3'末端にある約2,000塩基のORF2は72 kDaの構造タンパク質をコードする領域である。ORF3はORF1とORF2の間に位置し、多様な機能を有する。Ferret HEVとrat HEVはORF4のモチーフが存在することが確認されたが、その機能はまだ不明である。

E型肝炎は臨床的にはA型肝炎に類似している。一部の不顕性感染例を除き、臨床所見は主に黄疸を伴う急性肝炎である。患者は平均6週間の潜伏期の後に発熱と悪心、腹痛等の消化器症状が急速に始まる。ときには倦怠感、食欲不振等の症状が先行することもある。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値は著しく上昇する。抗HEV-IgG、IgM、IgAが検出される。発症前後の短期間に血清および血漿、または糞便からHEV-RNAが

RT-PCRで検出できる（図1）。E型肝炎の特徴として高い死亡率があげられる。死亡率はA型肝炎の10倍ともいわれ、妊婦では実に20%に達するという報告もある。また、免疫力が低下したがん患者、臓器移植者、HIV感染者などにHEVが持続感染し、慢性肝炎を引き起こすケースが増えている。現在、ヒトに感染するHEVには少なくとも5つの遺伝子型が存在する⁹⁾。ミャンマーをはじめ、アジアで分離された株の大部分は1型であり、90年代にメキシコで大流行を起こしたメキシコ株は2型である。90年代後半にアメリカ、中国の散発症例からそれぞれ3型および4型HEVが分離された^{2), 10)}。1型および2型HEVと異なり、3型および4型HEVはヒトだけではなく、イノシシやブタなどの動物にも感染する。ヒトコブラクダ由来の7型HEVによるヒトへの感染例も報告されている⁹⁾。

なお、E型肝炎は感染症法に基づき、医師がすべての患者の発生についてただちに届出を行う4類感染症に分類されている。

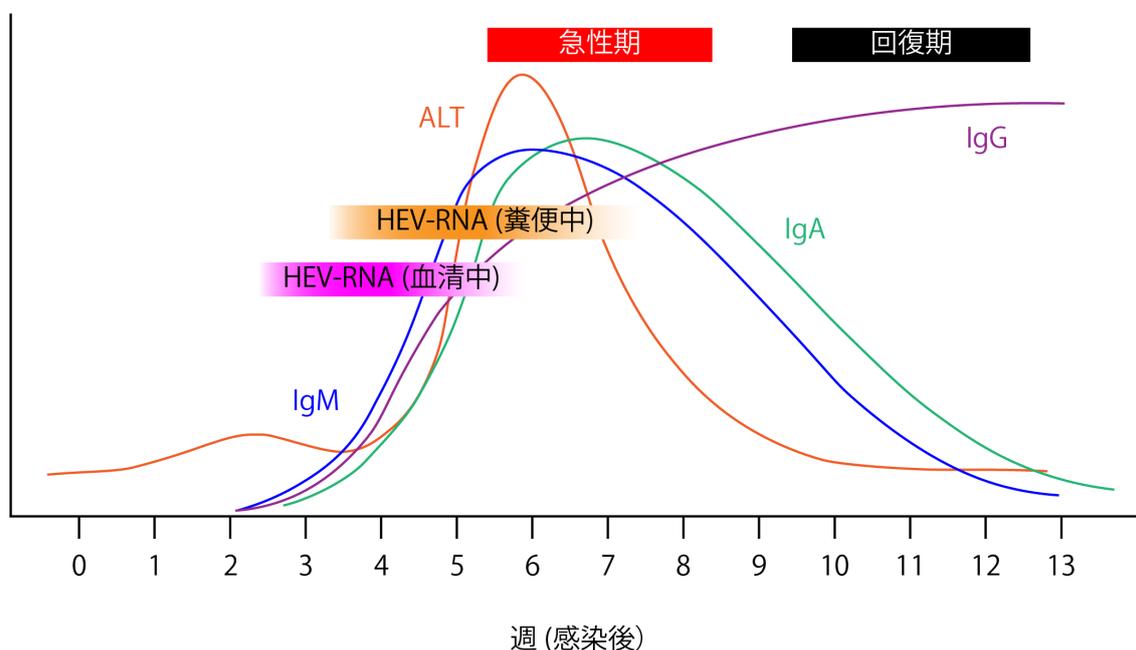


図1 E型肝炎の代表的な臨床経過（文献11より改変）

2. 検査に関する一般的注意

(1) 作業上の注意

臨床検体の取り扱いは、バイオセーフティに十分留意した上で行なう。検体の処理にはクラスIIの安全キャビネットを使用する。

(2) 検査材料の採取

臨床検体は患者の急性期に採取された血清と糞便が一般的である。食中毒事例では感染源と疑われる肉、肝臓などの食材を採取する必要がある。いずれの場合でも検査をより正確で効果あるものにするために検体は発症後できるだけ早い時期に採取し、速やかに検査に供する。数週間検査を実施できない場合は-20°C以下で保存する。

(3) 検査材料の輸送

HEVは比較的外界の環境に抵抗性であるが、保管、輸送中の凍結融解は繰り返さないように留意する。-20°Cでの保管・輸送が確保できなければ、4°Cで保管・輸送する。国立感染症研究所への輸送にあたっては冷却を保たれる状態で包装し、被験者の年齢、発病日、検体採取日、最近の海外渡航歴、被験者の周囲の発生状況など必要事項を記入のうえ送付する。送付先にはあらかじめ検体数、搬入日などを連絡しておくこと。

病原体等の輸送・運搬に際しては、輸送中の安全を確保し輸送業者に安心して運搬していただくため、適切な梱包および輸送方法等に留意する。

参考：国立感染症研究所バイオセーフティ管理室HP

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe.html>

(4) 検査の進め方

RT-PCRを用いてHEV遺伝子を増幅し、さらに塩基配列解析によってウイルスを同定することができる。RT-PCRによるHEV遺伝子の増幅領域は図2に示している。また、抗体検出ELISA法を用いて、抗HEV IgA、IgM、IgG抗体を検出することにより、迅速な臨床診断も可能である。また、抗体検出法は多数の検体を扱う場合は有用である。

PCRによるHEV増幅領域（数字はプライマー領域を含んだ長さを示す）

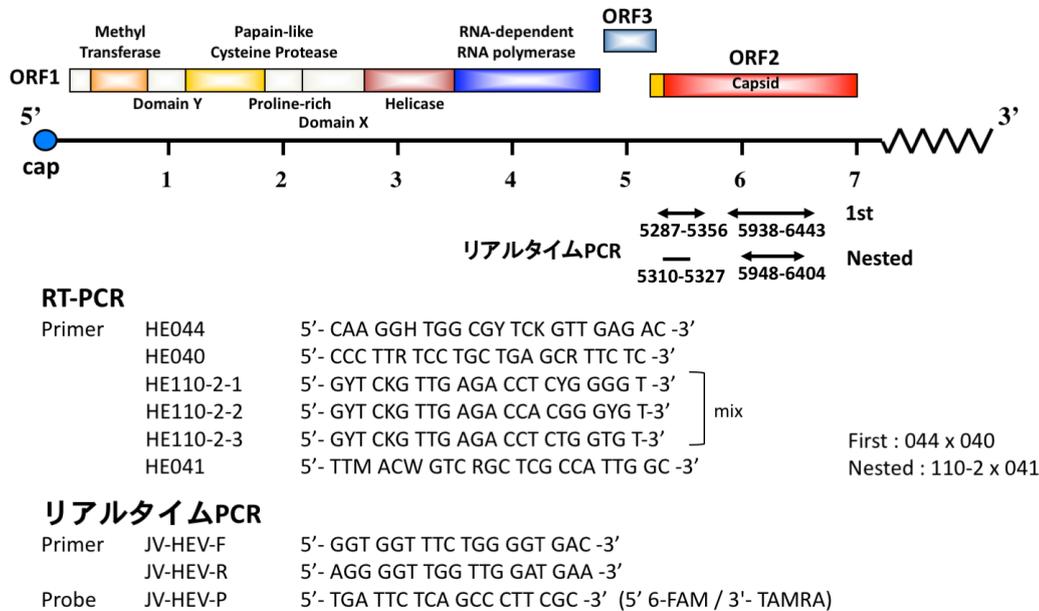


図2 HEV検出プライマー及びプローブの配列と増幅領域

3. 検査方法

(1) 遺伝子検査

遺伝子検査において、コンベンショナル PCR 及びリアルタイム PCR 共に、コンタミネーションに十分注意し、陽性コントロール (PCR 増幅配列を含んだ DNA 又は RNA) と陰性コントロール (滅菌水) を用いることを推奨する。

(1-1) RT-PCR 法

(1) 器材および試薬等

- 1) 遠心分離器
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) マイクロピペット
- 4) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 5) マイクロチューブ
- 6) RNA 抽出キット
- 7) 純エタノール
- 8) 低速遠心機
- 9) 遺伝子増幅装置
- 10) 逆転写酵素

- 11) DNA ポリメラーゼ
- 12) アガロースゲル電気泳動装置
- 13) トランスイルミネータ
- 14) プライマー¹²⁾

First PCR		
Forward primer	HE044	5'- CAA GGH TGG CGY TCK GTT GAG AC -3'
Reverse primer	HE040	5'- CCC TTR TCC TGC TGA GCR TTC TC -3'
Nested PCR		
Forward primer (Mix)	HE110-2-1	5'- GYT CKG TTG AGA CCT CYG GGG T -3'
	HE110-2-2	5'- GYT CKG TTG AGA CCA CGG GYG T -3'
	HE110-2-3	5'- GYT CKG TTG AGA CCT CTG GTG T -3'
Reverse primer	HE041	5'- TTM ACW GTC RGC TCG CCA TTG GC -3'

* Forward primer は 3 種類を混ぜた mix primer を用いるが、使用前に混ぜておくことで、操作が簡便になることに加え、コンタミネーションのリスクを軽減することができる。

(2) 材料の前処理

血清、血漿はそのまま RNA の抽出に使用できる。糞便は 10%乳剤をつくり、RNA 抽出材料とする。貝類等の食材も 10%乳剤が RNA 抽出の出発材料である。

・糞便抽出液の作製

- ① 15 mL または 50 mL の遠心チューブに糞便の 9 倍量の PBS を加えておく。
- ② 糞便を遠心チューブにいれ、10%糞便懸濁液を作る。
- ③ 20 分攪拌する。
- ④ 3000 rpm で 20 分遠心する。
- ⑤ 上清を新しいチューブに移し、10%糞便乳剤とする。

・食品の処理

食品のウイルス標準試験法検討委員会のホームページに「一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法」標準試験法案 V1.01 として、詳細が掲載されているので参照されたい。

<http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest.htm>

(3) RNA の抽出

QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) 等の市販されているウイルス RNA 抽出キットを使用し、説明書に従い、RNA を抽出する。

検体が組織の場合は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 等を使用する。

・ DNase 処理 (オプション)

食品等には目的とする HEV RNA 以外に、食品等に由来する様々な DNA が含まれるため、しばしば PCR で非特異的増幅反応が起こる。この様な場合には、DNase 処理を行うことで非特異的増幅反応を抑制できる。糞便および血清から RNA を抽出した場合は、通常 DNase 処理は必要ない。

(4) RT-PCR 反応

(4)-1. 1-step RT-PCR の場合

市販されている 1-step RT-PCR キットを使用し、説明書に従い、逆転写反応及び first PCR を行う。

ここでは、One-step RT-PCR kit (QIAGEN) を用いた場合を示す。

(i) 表 1 の 1-step RT-PCR 反応混合液を作製する。

試薬	1 検体当たりの使用量 [μ L]
DDW	13.0
5x buffer	5.0
dNTPs	1.0
Forward primer [10 μ M]	1.0
Reverse primer [10 μ M]	1.0
Enzyme mix	1.0
RNA	3.0
計	25.0

(ii) 下記の条件で RT-PCR 反応を行う。

50°C	30 分	
94°C	15 分	
94°C	30 秒	} 45 サイクル
55°C	30 秒	
72°C	1 分	
72°C	7 分	
4°C	保存	

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

(4)-2. 2-step RT-PCR の場合

1) cDNA 合成

市販されている cDNA 合成キットを使用し、説明書に従い cDNA を合成する。

ここでは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific)

を用いて行う場合を示す。

- (i) 表 2 の逆転写反応混合液を作製する。

表 2 逆転写反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	3.2
10x RT Random primer	2.0
dNTPs	0.8
10x RT buffer	2.0
RNase Inhibitor	1.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
RNA	10.0
計	20.0

- (ii) 下記の条件で RT 反応を行う。

25°C 10 分

37°C 120 分

85°C 5 分

4°C 保存

2) First PCR 反応

市販されている DNA ポリメラーゼを使用し、説明書に従い、first PCR を行う。

ここでは、ExTaq (TaKaRa) を用いた場合を示す。

- (i) 表 3 の First PCR 反応混合液を作製する。

表 3 First PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	33.75
10x ExTaq buffer	5.0
dNTPs	4.0
Forward primer [10 μM]	1.0
Reverse primer [10 μM]	1.0
TaKaRa ExTaq	0.25
cDNA (上記 RT 反応液)	5.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

96°C 2分	} 40 サイクル
94°C 30秒	
55°C 30秒	
72°C 75秒	
72°C 7分	
4°C保存	

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

(5) Nested PCR 反応

市販されている DNA ポリメラーゼを使用し、説明書に従い、nested PCR を行う。
ここでは、ExTaq (TaKaRa) を用いた場合を示す。

(i) 表 4 の Nested PCR 反応混合液を作製する。

表 4 Nested PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	36.75
10x ExTaq buffer	5.0
dNTPs	4.0
Forward primer [10 μM]	1.0
Reverse primer [10 μM]	1.0
TaKaRa ExTaq	0.25
DNA (1st PCR 反応液)	2.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

96°C 2分	} 35 サイクル
94°C 30秒	
55°C 30秒	
72°C 75秒	
72°C 7分	
4°C 保存	

ただし、増幅条件はプライマー、サーマルサイクラーによって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

(6) PCR 産物の電気泳動

PCR 産物 10 μL を 2.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染

色により結果を確認する。

結果の判定

- ① 陽性コントロールのバンドが認められること。
- ② 陰性コントロールのバンド (コンタミネーション) が認められないこと。
- ③ 目的とするサイズの PCR 産物であれば PCR 陽性とする (First 506 bp、あるいは Nested 457 bp)。

(7) シークエンス検査

PCR 産物が電気泳動で確認できたら、市販の PCR 産物ゲル抽出精製キット (QIAquick Gel Extraction Kit、QIAGEN 等) を用いて目的とするバンドを切り出して精製する。

PCR 産物が電気泳動によりシングルバンドで確認できた場合は、市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit、QIAGEN 等) を用いて精製することもできる。

精製した RT-PCR 産物について BigDye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) 等を用いてシーケンシング反応を行い、シーケンサーで塩基配列を確認する (詳細はキットの取り扱い説明書を参照すること)。

シーケンシング反応に first PCR 産物を用いる場合、forward primer は mix primer を用いる。

得られた塩基配列に基づき系統樹を作成し、検体の塩基配列が既知の HEV 遺伝子型に含まれることを確認する。この時、陽性コントロールのコンタミネーションでない事を確認する事が望ましい。

(9) 参照株

HEV の遺伝子型を決定する参照株に国際的な取り決めはないが、全ゲノムの塩基配列が決定されている株について表 5 に記した。また「HEV genotyping tool」(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hev/>) 等の使用も有用である。

表 5 HEV の系統樹解析に使用する参照株

遺伝子型	アクセッション番号
Genotype 1	NC_001434
Genotype 2	M74506
Genotype 3	AF060668
Genotype 4	AJ272108
Genotype 5	AB573435
Genotype 6	AB602441
Rabbit HEV	FJ906895
Rat HEV	GU345042
Avian HEV	AY535004
Bat HEV	JQ001749
Ferret HEV	JN998606

(注) HEV 検出プライマーについて

上記に示したプライマー配列によって増幅した核酸の塩基配列は、ウイルス株の分子疫学的手法による解析の実施において望ましいものの、より相同性の高い ORF1 をターゲットとしたプライマー¹³⁾を用いると、核酸を検出しやすい場合がある。

(1-2) リアルタイム PCR 法

(1) 器材および試薬等

- 1) ボルテックスミキサー
- 2) マイクロピペット
- 3) フィルター付きマイクロピペットチップ
- 4) マイクロチューブ(1.5ml)
- 5) プレート遠心機
- 6) リアルタイム PCR 専用プレート
- 7) リアルタイム PCR 装置
- 8) リアルタイム PCR 酵素
- 9) プライマー及びプローブ¹⁴⁾

Forward Primer	JV-HEV-F	5'- GGT GGT TTC TGG GGT GAC -3'
Reverse Primer	JV-HEV-R	5'- AGG GGT TGG TTG GAT GAA -3'
Probe	JV-HEV-P	5'- TGA TTC TCA GCC CTT CGC -3' (5' 6-FAM / 3'- TAMRA)

(2) リアルタイム RT-PCR 反応

(2-1) 1-step リアルタイム RT-PCR の場合

1) リアルタイム RT-PCR 反応および蛍光強度測定

使用機器に適合した市販されているリアルタイム PCR 酵素を使用し、説明書に従い、リアルタイム PCR を行う。

ここでは、機器として 7500 Fast Real-Time PCR system を、試薬として TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合を示す。

- (i) 表 6 のリアルタイム PCR 反応混合液を作製する。

表 6 リアルタイム PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
DDW	5.9
TaqMan Fast virus 1-step Master Mix	5.0
Forward primer [10 μM]	1.8
Reverse primer [10 μM]	1.8
Probe [10 μM]	0.5
RNA	5.0
計	20.0

- (ii) 下記の条件で RT-PCR 反応を行う。

50°C 5 分

95°C 20 秒

95°C 3 秒

60°C 30 秒 } 40 サイクル

ただし、増幅条件はプライマー、プローブ、使用機器、使用酵素によって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

陽性コントロールを 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度(コピー数)を算出する。

(2-2) 2-step RT-リアルタイム PCR の場合

1) cDNA 合成

cDNA の調製は既出の方法で行う。

2) リアルタイム PCR 反応および蛍光強度測定

使用機器に適合した市販されているリアルタイム PCR 酵素を使用し、説明書に従い、リアルタイム PCR を行う。

ここでは、機器として 7500 Fast Real-Time PCR system を、試薬として TaqMan Universal Master mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合を示す。

- (i) 表 7 のリアルタイム PCR 反応混合液を作製する。

表7 リアルタイム PCR 反応混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 [μL]
cDNA (RT 反応液)	5.0
Forward primer [10 μM]	2.0
Reverse primer [10 μM]	2.0
Probe [4 μM]	3.0
TaqMan Universal Master Mix	25.0
DDW	13.0
計	50.0

(ii) 下記の条件で PCR 反応を行う。

50°C 2分

95°C 10分

95°C 15秒

56°C 2分 } 50 サイクル

ただし、増幅条件はプライマー、プローブ、使用機器、使用酵素によって異なるので、それぞれ最適化を行うこと。

陽性コントロールを 10^7 から 10^0 コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度(コピー数)を算出する。

(3) 判定

サンプルのコピー数が 2 ウェル共に 10 コピー以上の時に陽性とする。判断が困難な場合は再検し判定する。

(注) HEV 検出プライマーについて

過去の検出マニュアル等で使用されてきたものも含めたプライマー及びプローブを表 8 に示した。ここに記載されているプライマー及びプローブの各セットを用いることで、HEV の検出は可能であるが、一部検出できない株が存在することが明らかとなってきた。本検出マニュアルにおいて示すプライマー及びプローブは、検出感度の改良と分子疫学的解析能の向上を図る為に新たに設計されたものであり、今後の検査においては、本検出マニュアルに示したプライマー及びプローブの使用を推奨したい。

表 8 HEV 検出プライマー及びプローブ

*1	名称	配列	位置*2	参考 文献
F	HEV-F1	5'- TAY CGH AAY CAA GGH TGG CG -3'	5,929-5,948	15
R	HEV-R2	5'- TGY TGG TTR TCR TAR TCC TG -3'	6,493-6,512	
F	HEV-F2	5'- GGB GTB GCN GAG GAG GAG GC -3'	5,965-5,984	
R	HEV-R1	5'- CGA CGA AAT YAA TTC TGT CG -3'	6,323-6,342	
F	HE044	5' - CAA GGH TGG CGY TCK GTT GAG AC -3'	5,938-5,960	12
R	HE040	5' - CCC TTR TCC TGC TGA GCR TTC TC -3'	6,421-6,443	
F	HE110-2-1	5' - GYT CKG TTG AGA CCT CYG GGG T -3'	5,948-5,969	
F	HE110-2-2	5' - GYT CKG TTG AGA CCA CGG GYG T -3'		
F	HE110-2-3	5' - GYT CKG TTG AGA CCT CTG GTG T -3'		
R	HE041	5' - TTM ACW GTC RGC TCG CCA TTG GC -3'	6,382-6,404	
F	JV-HEV-F	5' - GGT GGT TTC TGG GGT GAC -3'	5,287-5,304	14
R	JV-HEV-R	5' - AGG GGT TGG TTG GAT GAA -3'	5,339-5,356	
P	JV-HEV-P	5' - TGA TTC TCA GCC CTT CGC -3'	5,310-5,327	

*1 F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー、P: プローブを表す。

*2 HEV 83-2 (G3) 株 (Accession No. AB740232) の配列に基づく。

(2) 血清学的検査：ELISAによる抗HEV抗体の検出

E型肝炎を発症した時点でE型肝炎ウイルスに対する特異的な血中IgG、IgMおよびIgA抗体が誘導されている。抗体検出はHEV ORF2の組換えタンパク質を固相化抗原としたELISAを用いる^{16), 17)}。2011年10月から抗HEV IgA抗体を検出するE型肝炎の診断薬が保険適応となっている。

4. 参考文献

1. Purcell RH, Emerson SU: Hepatitis E virus; in Knipe DM and Howley PM (eds): Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, vol 1, pp 3051-3061.
2. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 9860-5.
3. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Fukai K, Muramatsu U, Yoshikawa A. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289: 929-36.
4. Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 2006;34(3): 137-40.
5. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 1958-60.
6. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362: 371-3.
7. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis* 2010;202(6): 825-34.
8. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185: 120-31.
9. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PP, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK, Purdy MA, Teo CG. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 2016;150: 355-7 e3
10. Wang Y, Zhang H, Ling R, Li H, Harrison TJ. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol* 2000;81: 1675-86.
11. Pérez-Gracia MT, García M, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol* 2015;3:117-126.
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
13. Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 2010;91: 750-8.
 14. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 2006;131: 65-71.
 15. Albert W. Tam, Matthew M. Smith, Martha E. Guerra, Chiao-Chain Huang, Daniel W. Bradley, Kirk E. Fry, Gregory R. Reyes. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185: 120-131.
 16. 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.
 17. Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) Is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 2005;43:49-56.

5. 連絡先

陽性コントロール、PCRプライマーの分与、その他の問い合わせは、国立感染症研究所 ウイルス第二部 第五室まで。

国立感染症研究所ウイルス第二部第五室

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

鈴木 亮介

電話 042-848-7037

ファックス 042-561-4729

メール ryosuke@niid.go.jp

6. 執筆者一覧

国立感染症研究所

李 天成、杉山隆一、吉崎佐矢香

武田直和、石井孝司、鈴木亮介

7. 謝辞

本検査マニュアルの作成にあたり、ご意見、ご協力を頂きました以下の先生方に深謝致します。（敬称略）

川崎市健康安全研究所

駒根綾子、清水英明

長野県環境保全研究所

塚田竜介