

## 5'非翻訳領域の塩基配列の組み合わせによる HCV genotype の新しい測定法

都築 昌之

HCV genotype の分類は、ウィルス量とともに C 型肝炎治療におけるインターフェロン治療効果の予測にきわめて重要である。遺伝子型の分類には HCV のコア領域を型特異的プライマーによる PCR を行って診断する方法や、免疫血清学的に ELISA 法を用いた分類が一般的である。しかし、ウィルス量が少ない血清においては遺伝子型の分類が不十分である。今回、アンプリコア HCV モニター v 2.0 にて得られた PCR 産物のダイレクトシーケンシングによる 5'非翻訳領域 (5' Untranslated region ; 5' UTR) の塩基配列の検討により、遺伝子型を正確に診断できる方法を考案した。諸種の HCV 陽性血清 290 検体を用い、この方法 (5' UTR genotype 法) により genotype の分類を行い、type-specific PCR 法 (岡本法) や、serogroup 分類 (Kohara 法) との対比を行った。Genotype は、5' UTR の -167, -163, -161 の 3 個所の塩基の組み合わせにより、1b は T, A, G, 2a は T, G, G, 2b は T, G, A に相当することが明らかとなった。岡本法と本法との対比では 290 検体中 289 検体 (99.7%) に合致していた。一方、serogroup 分類では、41 検体 (14.1%) に型分類判定不能とされたものがあつたが、本法ではこれらの検体についても正確に型分類が可能であつた。各型別の血清を段階希釈し、本法による genotype 判定可能なウィルス量について検討したところ、いずれの型においても 100 copy/ml 前後のウィルス量までは判定可能であつた。本法は一度の検査で HCV RNA 定量と genotype 分類が同時に測定しうる有用な方法であると思われる。

(平成13年8月18日受理)

### A New Method for Determining HCV RNA Genotype Using 5' UTR Sequence

Masayuki TSUZUKI

The determination of HCV genotype and viral load are important in the evaluation of interferon therapy for chronic hepatitis C. The type-specific PCR method employing type-specific primers in the core region and the immuno serological method (ELISA) are commonly used for genotype classification. However, especially with the ELISA method, it is often impossible to do genotype classification in low dose RNA serum. We developed a new method for precise genotype determination based on differences in the nucleotide sequence of the 5' UTR region. 290 samples of HCV RNA positive serum were examined using this 5' UTR method, and compared with type-specific PCR results (Okamoto's method) or serogroup findings (Kohara's method). The

combination of three nucleotides (-167, -163, -161) of 5' UTR could determine genotypes, 1 b is equivalent to T, A, G, 2 a to T, G, G, and 2 b to T, G, A. The correlation with Okamoto's method was 99.7% (289/290). With the serogroup method, 41 cases (14.1%) were judged as suspended, but with the 5' UTR genotype method, these suspended cases were classified. The minimum viral loads necessary for differentiation of genotype were examined by serial dilution of each type of serum. Determination of genotype could be achieved with 100 copy/ml of RNA. This new method seems to be useful since the determination of genotype and examination of HCV RNA can be done at the same time. (Accepted on August 18, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 27(3): 193-200, 2001

**Key Words** ① Hepatitis C virus (HCV) ② HCV genotype  
 ③ HCV RNA ④ 5' Untranslated region (5' UTR)  
 ⑤ Polymerase chain reaction (PCR)

はじめに

HCV 遺伝子は全長約9.5 kb の 1 本鎖 RNA である<sup>1)</sup>. HCV RNA は5'末端に構造遺伝子, 3'末端に非構造遺伝子を持つ. HCV RNA の5'末端と3'末端にはそれぞれ短い非翻訳領域(Untranslated region ; UTR)があり, 中央部にはゲノム全体の約95%をしめ一本の長い polyprotein 前駆体をコードする open reading frame (ORF)がある. polyprotein 前駆体は3010~3037のアミノ酸残基からなる<sup>2)</sup> (Fig. 1). HCV は遺伝子変異が速いウイルスで, 数多くの HCV 遺伝子型が知られている. HCV 遺伝子型は従来 I, II, III, IV, V型と呼ばれる5種類の遺伝子型があると知られ, 全塩基配列が20%以上異なっていることがこれらの遺伝子型を分類する基準となっている<sup>3),4)</sup>. I~V型の5種類の遺伝子型は Simmonds らの提唱する分類<sup>5)</sup>に従いそれぞれ 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 3 a 型と呼ばれている.

コア遺伝子領域は塩基配列の保存性が高く, しかも遺伝子型に特徴的な塩基配列を備えている. そのためコア領域での型特異的なプライマーを用いた PCR 法による遺伝子分類が行われている<sup>4),6)</sup>. 岡本らは HCV のコア領域を型特異的プライマーによって PCR し, 塩基配列を決定することなく, 増幅された遺伝子断片の長さで HCV の遺伝子型を分類する方法を開発し<sup>4)</sup>, これが現在の遺伝子型分類の基礎となっている. また, Kohara らは ELISA 法を用いて血清学的に serogroup 1 と serogroup 2 に分類する方法を開発した<sup>7)</sup>. さらに Enomoto らは HCV の NS 5 領域の塩基配列を用いて型分類を行う方法を報告している<sup>8)</sup>. 一方, 5'UTR を利用した遺伝子型分類法としては restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法や, 5'UTR の型特異的配列をプローブとしたハイブリダイゼーション法が報告されている<sup>9),10)</sup>.

HCV genotype 分類の重要性は, HCV による C 型慢性肝炎の治療に関与する点である. 現在 C 型肝炎はインターフェロン (IFN) による治

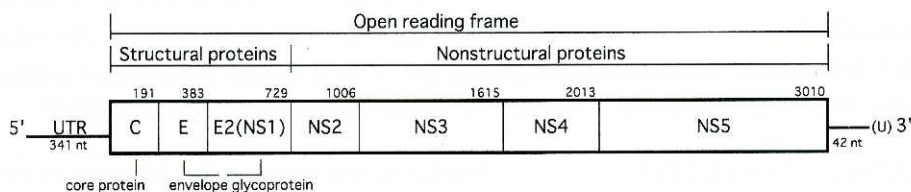


Fig. 1. A proposed genetic organization of the HCV genome

療が中心であるが、その治療効果は血中ウイルス量と HCV の遺伝子型により左右されることはよく知られている。genotype 2a および 2b の感染者は、1b 感染者に比べ IFN の著効率が有意に高いことが知られている<sup>11)</sup>。我が国では安価で保健適応のある免疫血清学的方法を用いる serotype による型分類が一般的である。しかしながら、この方法では低ウイルス量で抗体が産生されにくい検体などにおいては型別判定が不能と報告される場合も多い。そこで今回、HCV-RNA の定量に広く使われているアンプリコア HCV モニター v2.0 キットを利用し 5' UTR の塩基配列の違いを用いた genotype 分類を試み、3 個の塩基の組み合わせで genotype 分類が可能となった。この新しい genotype の詳細を述べ、従来の方法との対比を行ったので報告する。

## 対象と方法

対象：1999年5月から7月の間に川崎医科大学消化器1内科を受診したC型肝炎患者から採取した血清290検体を対象とした。

1) 採血：患者末梢血を採取後1時間以内に遠心し血清分離して-70℃で保存した。保存血清の解析は血清採取後3ヶ月以内に行った。

2) HCV RNA 定量：アンプリコア HCV モニター v2.0 キット (Roche Diagnostics co., Ltd., Tokyo, Japan) を推奨されているコンディションの基に使用し、血清中の HCV RNA を Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって検出、定量した。また同キットにより HCV RNA におけるコア蛋白領域の開始コドン (ATG) より 5' 側へ数えて、-273 から -29 の 5' UTR の 244bp が増幅された<sup>12)</sup>。

3) DNA 精製：アンプリコア HCV モニター v2.0 の PCR 産物は 60  $\mu$ l の DNA 断片の溶解液で、そのうちの 1  $\mu$ l を 3% アガロースゲルで電気泳動し 244 bp のバンドが検出されたら GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) により DNA

を精製した。244 bp のバンドが検出されない検体については、PCR 産物の残りを利用して nested PCR を行った上、3% アガロースゲルで電気泳動し、DNA を精製した。

4) Nested PCR：アンプリコア HCV モニター v2.0 により増幅された 244bp の塩基配列の内側にプライマーを設定した。センスプライマーは 5' UTR の -271 から -252 の領域の 5'-GAAAGCG TCTAGCCATGGCG-3' (Geno-5)、アンチセンスプライマーは -64 から -43 の領域の 5'-CTATC AGGCAGTACCACAAGGC-3 (Geno-6) に設定し、LKB Gene Assembler Plus DNA Synthesizer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて合成した<sup>13)</sup>。アンプリコア HCV モニターの PCR 産物 2  $\mu$ l と、8 pmol の Geno-5、Geno-6 プライマーをそれぞれ 0.4  $\mu$ l、Thermoprime plus kit (75 mM Tris-HCl (pH 8.3), 20 mM ammonium sulfate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (v/v) Tween 20, 0.8 mM の各 deoxynucleotides, Taq DNA polymerase 0.5 units) (Advanced Biotechnologies; Surrey, UK) の混合液計 20  $\mu$ l を作成し DNA thermal cycler (Lobocycler 40, Stratagene; CA, USA) にて、94℃ 3 分の後、94℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 1 分 30 秒を 35 サイクル、72℃ 10 分の設定で PCR を行った。

5) Direct sequencing：GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit により精製した DNA は、BigDye termination sequencing kit (Amersham Pharmacia LKB, Buckinghamshire, England) を用いて、Sanger らの dideoxy-mediated chain-termination method に従いシーケンスを行った<sup>14), 15)</sup>。シーケンスプライマーは、5' UTR の -210 から -189 の領域の 5'-GGAGAGCCATAG TGGTCTGCGG-3' (Geno-7) を使用した。精製した DNA の溶解液 2  $\mu$ l に 1.6 pmol のプライマー Geno-7 を加えて 65℃ 5 分間インキュベートし、37℃ まで冷却した。これに DNA polymerase と 'ddA', 'ddC', 'ddG', 'ddT' を含む BigDye terminator RRmix solution 4  $\mu$ l を加え、DNA thermal cycler にて 96℃ 30 秒、50℃ 30 秒、60℃ 2 分を 40 サイクルの設定でシーケンス反応を行っ

た. ABI 3700 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, MI, USA) による電気泳動にてシーケンスを決定した.

結 果

1. 5'UTR における各 genotype の塩基の特異性.

290検体全てにつきアンプリコア HCV モニター v2.0 の PCR 産物を利用しダイレクトシーケンスを行った. 290検体のシーケンスの

Table 1. Type specific nucleotide in 5'UTR region

Nucleotide position			Genotype
-167	-163	-161	
T	A	G	1b
T	G	G	2a
T	G	A	2b

Table 2. Auxiliary nucleotide in 5'UTR region

	Nucleotide position						Genotype
	-159	-155	-132	-128	-124	-122	
C/T	C	G	A/T	C	T	A	1b
A	T	A	T	C	C	C/T	2a
A	T	A	T	T	C	C/T	2b

Table 3. Coincidence between type-specific PCR (Okamoto's method) and 5'UTR genotype

		5'UTR Genotype				
		1b	2a	2b	1b, 2b	total
Type-specific PCR (Okamoto's Method)	1b	220	0	0	0	220
	2a	0	41	0	0	41
	2b	0	0	26	0	26
	1b, 2a	0	1	0	0	1
	1b, 2b	0	0	0	2	2
total		220	42	26	2	290
%		75.8	14.5	9	0.7	100

Agreement rate was 99.7% (289/290), except one case. One case with genotype 1b 2a decided by Okamoto's method became genotype 2a by 5'UTR genotype method.

結果をコンピューター解析し, 5'UTR のシーケンスのうちの塩基配列より 3箇所の塩基配列が共通してみられるものを郡別に分類した. その結果, -167, -163, -161番目の塩基配列がおのおの T. A. G., T. G. G., T. G. A., のものを Type-specific PCR 法 (岡本法)<sup>5)</sup> による分類の結果と対比した. その結果, 3つの塩基が T. A. G. は1b, T. G. G. は 2a, T. G. A. は 2b に相当することが確認された (Table 1).

2. Genotype の補助診断.

上記-167, -163, -161番目の読み取りのみでも genotype の分類は可能であるが, これらは近接した位置の塩基であり判別が困難な場合もあるため補助診断が必要となる. 5'UTR のシーケンス内には他にも型特異的配列が存在することが明らかとなった (Table 2). これらの領域を確認領域として上記3箇所の配列とともに認識し型判定を行った. -155, -132, -124, -122の塩基についての各 genotype に特異的な塩基を示す. ただ, 1bにおいては, -159がCかT, -128がAかTいずれかであっても1bと判定しうる. また, 2aと2bの塩基配列は, -124の塩基が2aがC, 2bがTと一箇所の違いのみである. また, -119の塩基はCかTいずれでもよい.

3. 5'UTR genotype (5'UTR 法) と type-specific PCR 法 (岡本法) との合致率.

290検体のうち 1b, 2a, 2b, および1b 2a は岡本法と完全に合致した. しかし, 岡本法で1b 2aとされたものは5'UTR 法では2aと判定され, 290検体中この1検体のみが解離を認めた. 従って両方の一致率は99.7%であった (Table 3).

4. 5'UTR 法と serogroup 分類 (Kohara らの方法)<sup>7)</sup> との合致率.

Serogroup 1 は 1b, serogroup 2 は 2a と 2b に相当することが知

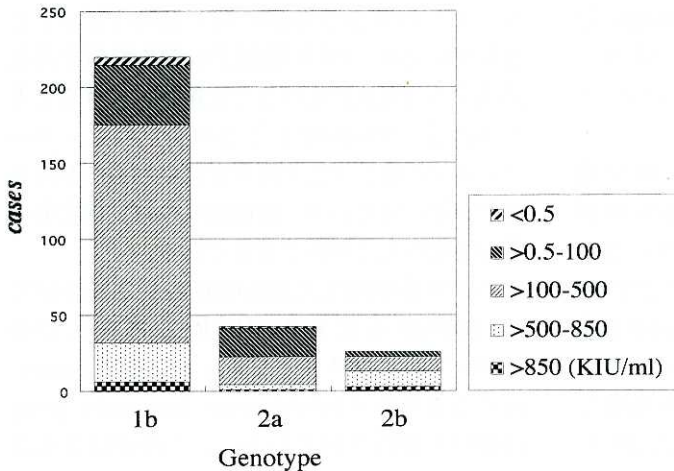
**Table 4.** Coincidence between serogroup and 5'UTR genotype

Serogroup	5'UTR Genotype				total
	1b	2a	2b	1b, 2b	
1	193	1	2	1	197 (67.9)
2	2	35	15	0	52 (18.0)
suspended	25	6	9	1	41 (14.1)
total	220	42	26	2	290 (100)

In serogroup 1, 193 out of 197 cases (98.9%) agreed, while in serogroup 2, 50 out of 52 cases (96.2%) matched together. 41 cases (14.1%) were suspended by serogroup determination. Thus, only 243 out of 290 cases (83.3%) were correctly classified by serogroup method.

**Table 5.** 5'UTR genotype according to difference of HCV RNA viral load

Amplicor v2.0 (KIU/ml)	5'UTR Genotype				
	1b 220	2a 42	2b 26	1b, 2b 2	total 290
<0.5	5 (2.3%)	1 (2.4%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (2.1%)
>0.5 - 100	40 (18.2%)	19 (45.2%)	4 (15.4%)	0 (0%)	63 (21.7%)
>100 - 500	143 (65.0%)	18 (42.9%)	9 (36.4%)	2 (100%)	172 (59.3%)
>500 - 850	26 (11.8%)	3 (7.1%)	10 (38.5%)	0 (0%)	39 (13.5%)
>850	6 (2.7%)	1 (2.4%)	3 (11.5%)	0 (0%)	10 (3.4%)

**Fig. 2.** Distribution of viral load in each genotype

られている。今回検討した290検体について5'UTR法による genotype 分類と serogroup 分類の一致率について検討した (Table 4)。Serogroup では290検体中 group 1 と判定されたものが197検体(67.9%)、group 2 と判定されたものは52検体 (18.0%)、group 1, 2 いずれとも判定が不可能であったものは41検体 (14.1%)

みられた。Serogroup 1のうち5'UTR法により1bと判定されたものは193検体であったが、2aが1検体、2bが2検体、1b 2bが1検体と、計4検体は1b以外の genotype であることが明らかとなった。従って5'UTR法との一致率は98.0%であった。一方、Serogroup 2については2aと2b合わせて50検体であり、52検体中50検体96.2%の一致率であった。残りの2検体は1bであった。Serogroupで判定不能とされた41検体の内訳は、1b 25検体、2a 6検体、2b 9検体、1b 2b 1検体と諸タイプが含まれていた。従って、serogroup による判定可能な検体は290検体中243検体 (83.8%) にとどまった。

5. ウィルス量別にみた5'UTR genotype の分布。

Table 5は5'UTR genotype で分けられた各検体のHCV RNA量について検討した結果である。1b 220検体においてはHCV RNA量が100~500 KIU/mlの範囲のものが143検体(65%)であった。2a 42検体のHCV RNA量は0.5~100 KIU/mlが19検体(45.2%)と低ウィルス量のものがやや多い傾向を示した。2b 26検体については、HCV RNA量が500~850 KIU/mlのものが10検体(38.5%)と高ウィルス量のものが多い

傾向を示した。Figure 2は、Table 5で示した genotype 1b, 2a, 2bのウィルス量別の分布をグラフで示したものである。

6. 5'UTR法による genotype 判定の鋭敏性。

Table 6は、genotype 別に各々2検体ずつ選び、血清を段階的に希釈し、genotype を判定し得る希釈限界について検討したものである。

**Table 6.** Detectability of HCV RNA by serial dilution of serum of 6 patients including different genotypes (1000 copy/ml  $\approx$  1 KIU/ml)

Specimen	Detectable dilution ratio.				
	×2	×4	×8	×16	×32
<b>A(1b)</b> $3.2 \times 10^3$	○	○	○	○	○
<b>B(1b)</b> $2.5 \times 10^3$	○	○	○	○	○
<b>C(2a)</b> $1.5 \times 10^3$	○	○	○	○	×
<b>D(2a)</b> $1.1 \times 10^3$	○	○	○	×	×
<b>E(2b)</b> $1.8 \times 10^3$	○	○	○	×	×
<b>F(2b)</b> $2.5 \times 10^3$	○	○	○	○	×

1b 2 検体とも32倍希釈まで genotype 判定可能であった。2a, 2bについては2検体のうち1検体は16倍希釈まで、もう1検体は8倍希釈まで genotype 判定可能であった。HCV RNA 量が100 copy/ml 前後の量においても genotype 判定が可能であった。

## 考 察

アンプリコア HCV モニター v 2.0 の PCR 産物をダイレクトシーケンスして genotype 分類を行う測定系を開発した。この方法により、C 型肝炎の患者血清290検体すべてについて genotype 分類を施行し得た。

今回の測定系で選択した 5'UTR は、HCV 遺伝子の中で最も変異が少なく異なる HCV 株間でも92%以上のホモロジーを示す保存性の高い領域であるとされている<sup>16)</sup>。そのため5'UTR は検出率の高いプライマーの設定が可能な領域であると考えられており、アンプリコア HCV モニター v 2.0 キットはこの5'UTR を増幅し HCV RNA 定量を行うものである。また、HCV の型分類については、岡本法ではコア蛋白領域、Kohara らによる serogroup 分類は NS 3/NS 4 領域<sup>7)</sup>、Enomoto らの方法では NS 5 領域<sup>8)</sup>を用いられていたが、今回のわれわれの検討では、5'UTR の HCV 各遺伝子型に特異的な塩基配列を認識することにより290検体すべてについての genotype 分類が可能であった。岡本法による genotype の判定は、type specific primer を用いた PCR を行い PCR 産物の長さの違いを電気泳

動で判定するもので<sup>4)</sup>、シーケンスの操作を必要としない点で簡便であるが HCV RNA 量の測定とは別の測定系である。また Serogroup 分類は、岡本法に並び現在広く行われている HCV 遺伝子型分類法であるが、この方法はアミノ酸配列の相同性が低い NS 4 の前半領域の1676~1760番目までのアミノ酸をコードする遺伝子

を大腸菌由来の蛋白質である TrpE と融合発現させ、発現蛋白質 C 14-1 (グループ 1 HCV 特異抗原) および C 14-2 (グループ 2 HCV 特異抗原) を作成しそれぞれの抗原を用いて ELISA 法にて Group 特異抗体の検出を行うものである<sup>17)</sup>。今回の検討で14.1% (41/290検体) が serogroup 判定保留とされたが、我々の方法ではこれらの14.1%の検体についても全て型判定が可能であった。グループ特異抗体による分類は、抗体を検出する操作のみのため簡便であり、また PCR 法と非常に高い相関性を示すとされているが、HCV 遺伝子の塩基配列を直接認識する分類法に比べると正確性に欠けると考えられる。Serogroup 1 と 2 の間ではインターフェロン治療に対して顕著な反応の違いがあることが知られており、genotype の判定は治療方針の決定の上で極めて重要である。

5'UTR を利用した genotype の判定については、Stuyver らにより 5'UTR を PCR した後リバースハイブリダイゼーション法で genotype の分類を行う hybridization line probe assay (LiPA) が報告されている<sup>10)</sup>。この方法は本法と同じ5'UTR の型特異的塩基配列を利用した方法であるが、感度と特異性が高く簡便であると評価されている。他に、5'UTR の型特異的塩基配列を利用した方法として、近年、Germer ら<sup>18)</sup>、Doglio ら<sup>19)</sup>による HCV アンプリコア定性キットを利用した genotype 分類法など数種類の報告がみられるが、いずれにおいても HCV RNA 定量と genotype 分類の同時測定が可能で報告はみられなかった。しかし

今回の我々の方法はアンプリコア HCV モニターにて HCV RNA 定量を行った後 PCR 産物をダイレクトシーケンスするという一連の測定系として施行され、臨床の場合においては、一つの検体を提出するのみで一度に HCV RNA 量と genotype 判定の両方の結果が得られるものである。従来 HCV RNA 量測定と HCV 型分類を別々に発注していたのに比べて有用性が高いと考えられる。

5'UTR genotype 分類における genotype 1b, 2a, 2b のウイルス量別の分布の検討では、1b は、100~500 KIU/ml が 65% を占めていた。一方、2a では、0.5~100 KIU/ml が 45.2% を占めやや低ウイルスのものが多い傾向であった。逆に、2b においては 500~800 KIU/ml のものが 38.5% を占め高ウイルスのものが多い傾向であった。Genotype と HCV RNA 量との間の関連については必ずしも一定の見解がなく今後の検討課題であると思われる。

HCV RNA の検出は、最も保存性の高い 5' UTR に由来するプライマーを設定することにより、PCR に使用するプライマー配列において HCV RNA の変異が少ないため false negative を最小限にすることができる。約 340 の塩基長からなる 5'UTR 内にも可変部位が存在し塩基置換が認められるが、この可変部位を避けてプライマーを設定することが重要である。HCV RNA の 1st PCR 産物を鋳型にして、その内側に設定したプライマーを用いてもう一度増幅する nested PCR 法は<sup>20)</sup>、感度も良くしかも特異的に HCV ゲノムを検出する方法である。今回新たに開発した 5'UTR 法では、ウイルス量が 1000 copy/ml においてはアンプリコア HCV モニター v.2.0 キットを利用した簡便な操作によ

り 1st PCR のみで十分な PCR 産物を得ることができシーケンスから genotype 分類までが可能であったが、同キットの定量感度 (500 copy/ml) 未満の検体については、nested PCR を施行することにより 100 copy/ml 前後まで HCV RNA の検出が可能となり、これと同時に genotype 分類も可能であった。今後、HCV RNA の定量と同時に genotype の判定が可能である本法が広く日常臨床で利用されるようになることが望まれる。

## 結 語

5'UTR の -167, -163, -161 の 3 つの部位の塩基の組み合わせにより遺伝子型の分類が可能となった。Serogroup 分類における判定不能例についても genotype 分類が 100% 可能であった。従来の方法においては HCV RNA の検出と遺伝子型分類の同時測定は不能であったが、本法を用いれば HCV RNA 定量と同時に genotype 分類が可能であった。また nested PCR を用いることにより低ウイルス量の検体においても HCV RNA 定量と genotype 分類が可能であった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閲を賜りました川崎医科大学消化器 I 内科教室 山本晋一郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究について直接御指導いただいた同 久保木真講師に深く感謝いたします。また、研究に御協力いただいた同教室員各位ならびに大塚アッセイ研究所 木下盛敏氏、福田陽司氏に厚くお礼申し上げます。なお、本論文の要旨は第 51 回 AASLD (American Association for the Study of Liver Disease.) (2000. 10. 29.) において発表した。

## 文 献

- 1) Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q-L: Molecular biology of hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14: 381-338, 1991
- 2) Okamoto H, Mishiro S: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology* 37: 68-76, 1994
- 3) Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Iizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S: Full length sequence

- of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates : comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188 : 331 - 341, 1992
- 4) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M : Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers : application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73 : 673 - 679, 1992
  - 5) Simmonds P : Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21 : 570 - 583, 1995
  - 6) Okamoto H, Kobata S, Tokita H, Inoue T, Woodfield GD, Holland PV, Al-Knawy BA, Uzunalimoglu O, Miyakawa Y, Mayumi M : A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods* 57 : 31 - 45, 1996
  - 7) Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Yamaguchi K, Maki N, Toyoshima A, Miki K, Tanaka S, Hattori N, Nomoto A : A second group of hepatitis C viruses. *Virus Genes* 5 : 243 - 254, 1991
  - 8) Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T : There are two major types hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 170 : 1021 - 1025, 1990
  - 9) Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EAC, Seed CRG, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA, Kiyokawa H, Olim G, Duraisamy G, Cuypers T, Saeed AA, Teo D, Conradie J, Kew MC, Lin M, Nuchaprayoon C, Ndimbie Ok, Yap PL : Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 76 : 1197 - 1204, 1995
  - 10) Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Lunel F, Laurent-Puig P, Pawlitsky J-M, Kleter B, Bassit L, Nkengasong J, van Doorn L-J, Maertens G : Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UTR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Res* 38 : 137 - 157, 1995
  - 11) Iino S, Hino K, Yasuda K : Current state of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology* 37 : 87 - 100, 1994
  - 12) Karen KY Young, Robert M Resnick, Thomas W Myers : Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 31 : 882 - 886, 1993
  - 13) Schulhof JC, Molko D, Teoule R : The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups. *Nucleic Acid Res* 15 : 397 - 416, 1987
  - 14) Hultman T, Stahl S, Hornes E, Uhlen M : Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acid Res* 17 : 4937 - 4946, 1989
  - 15) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5463 - 5467, 1977
  - 16) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Akahane Y, Miyakawa Y, Mayumi M : Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier : comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 72 : 2697 - 2704, 1991
  - 17) Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Yagi S, Tanaka S, Hasegawa A, Ohta Y, Hattori N, Kohara M : Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus. *Hepatology* 19 : 1347 - 1353, 1994
  - 18) Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH : Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 37 : 2625 - 2630, 1999
  - 19) Doglio A, Laffont C, Thyss S, Lefebvre JC : Rapid genotyping of hepatitis C virus by direct cycle sequencing of PCR-amplified cDNAs and capillary electrophoresis analysis. *Res Virol* 149 : 219 - 227, 1998
  - 20) Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JAJ, Contreras M, Aloysius S : Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335 : 1419 - 1422, 1990