

日本人から検出された新たなC型肝炎ウイルスサブタイプ
(genotype-3b)の全塩基配列の決定とその構造の解析

茶 山 一 彰

①

日本人から検出された希なC型肝炎ウイルスサブタイプ
(genotype 3b) の全塩基配列の決定とその構造の解析

茶山一彰

＜緒言＞

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年に米国Chiron社のM. Houghtonらのグループにより λ gt11のスクリーニング法を用いて、感染実験に使用されていた高感染力価のチンパンジーの血清から発見されたRNAウイルスである(1,2)。それまで肝炎ウイルスには経口感染するA型肝炎ウイルス(3)と、輸血、性行為など非経口的な経路から感染するB型肝炎ウイルス(4)の2種類が存在することが知られていた。しかし、肝炎を起こすウイルスがこの2種類以外にも存在することは当時既に明らかであり(5-7)、いわゆる非A非B型肝炎ウイルスと称されていた。疫学的な研究と、チンパンジーの感染実験などにより、この非A非B型肝炎ウイルスには経口感染するものと、輸血など経口感染以外の経路で感染するものの2種類が存在することが明らかにされていた(5-8)。最近、経口感染し、インド、東南アジアなどで雨季に大流行を引き起こす原因ウイルスとして、E型肝炎ウイルスが発見された(9)。このウイルスと、非経口経路で感染するHCVの発見(1,2)により、ウイルス性肝炎の大部分がA型からE型までの肝炎ウイルスによるものであることが明らかとなった。そして、HCVに対する抗体(HCV抗体)によるスクリーニング法の改善により、とくに、慢性肝炎、肝硬変においては、非A非B型とされた肝疾患の90%以上がHCVによるものであることが明らかとなった(10-19)。

HCVはgenomeの全長が9400塩基程度の+鎖、一本鎖RNAウイルスであり、5'末端と3'末端にそれぞれnoncoding regionが存在する。そして、その中間にウイルスpolyproteinをコードしている約3,000アミノ酸からなる一つの大きなopen reading frameが存在する(20-34)。このウイルスpolyproteinは宿主細胞のプロテアーゼと、ウイルス自身のコードしているプロテアーゼにより少なくとも10個の断片へと分解される。その構成はアミノ末端から、NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOHとなっている(35, 36)。polyproteinのアミノ末端側に存在するC、E1、E2は構造蛋白であり、nucleocapsid、envelopeを構成している。E2領域のアミノ末端側にはhypervariable regionと呼ばれる高度にアミノ酸の変異に富む部位が存在する(37, 38)。この部位のアミノ酸の経時的な変異は、宿主の液性免疫によるウイルスの中和からの、抗原性の変化による逃避を反映していると考えられている(39-48)。p7の機能に関しては現在のところ明らかにされていない。カルボキシ末端側に存在するNS2、NS3、NS4、NS5は非構造蛋白と考えられている(24-36)。これらの蛋白はウイルス

が増殖する上で必要な機能性の蛋白をコードしていると考えられている。これまでにわかっている機能性蛋白の機能としては、(i)NS2/3 領域にコードされている亜鉛依存性プロテアーゼ(49-51)、これはNS2/3 間の切断を行っている。(ii)NS3 領域のアミノ末端側にコードされているセリンプロテアーゼ(52-55)、これはNS3/4A、NS4A/4B、NS4B/5A、NS5A/5Bの間の切断を行っている。(iii)NS3 領域のカルボキシ末端側にコードされているRNA helicase (56)。(iv)NS5 領域にコードされているRNA 依存性RNA polymerase (57) などが知られている。

このウイルスの培養は困難であると考えられ、チンパンジーによる感染実験が唯一の感染モデルと考えられていたが、最近ある種の培養細胞を用いると、感染実験が行えることが報告された(58-60)。しかし、その増殖はわずかであり、polymerase chain reaction (PCR)でようやく検出できる程度のものにすぎず、このウイルスの研究が困難であることの理由の一つとなっている。

HCV の病原性については、このウイルスは、成人に感染しても容易に持続性感染となることが知られており多くは慢性肝炎を発症し、少数は肝機能が正常である、いわゆるウイルスキャリアーとなる(61-67)。慢性肝炎を発症した症例の多くは、20年から30年の経過で肝硬変へと進行する(65、67)。肝硬変へ進展した患者からは年率約5%の割合で肝細胞癌が発生するため(67、70)、ウイルスを排除し、肝硬変、肝癌への進行を防ぐことが重要な課題となっている。

このウイルスの主な感染経路は輸血などの血液製剤の投与によるものであり、HCV 抗体による献血者のスクリーニングが施行されるようになった現在、日本では新たなキャリアーの発生は著減することが期待されている(71、72)。しかしながら、現在日本にはすでに100 万人以上の慢性肝炎患者、あるいはキャリアーが存在し、これらの患者を見出し、適切な治療を行うことが重要と考えられる。さらに、HCV 抗体のスクリーニングが未だなされていない東南アジア、アフリカ等においてはさらにキャリアーの増加も予測されることから、有効なワクチンの開発が必要とされている。しかしながら、このウイルスは、RNA ウィルスの特徴である抗原の高変異性を有しているため(73、74)、数多くのサブタイプが存在し、ワクチンの開発には困難が予想されている。

サブタイプに関しては、1990年にEnomoto et al (75)、が最初に4種類のサブタイプの存在を明らかにして以来、数多くのサブタイプが報告されてきた(76-81)。HCV のサ

ブタイプの分類は、中和抗体を用いた分類が現在不可能であることから、その遺伝子の配列を解析することにより決定する方法が主にとられている。従って、サブタイプも genotype と表現される場合が多い。現在少なくとも38種類の genotype が存在することが明らかにされている(82)。この genotype の分類に関しては、現在若干の問題がある。最も現在広く用いられている genotype の分類は Simmonds et al(83, 84) が提唱したものである。彼らは NS5B 領域の222塩基の配列を決定し、分子系統樹による解析を行い、当初9種類報告されていた genotype を6種類の type (type 1-type 6) に大まかに分け、さらに、その type 中の比較的類似性の高かった2種の亜型を、それぞれ 1a、1b、2a、2b、3a、3b の subtype に細分した(83)。彼らの解析によれば type 間の塩基配列の homology は72%未満であり、subtype間では75-86%、subtype内の isolate 間では88%以上であった。このため彼らは、homology が72%未満の新たな塩基配列を有する株が見出されれば新たな type、75-86%の範囲にはいるものであれば新たな subtype とすべきであると提唱した。ところが、その後 Tokita et al(84-87)、により東南アジアから、多数の新たな genotype が発見され(85)、Simmonds et al. が行ったような部分的な配列の解析では type と subtype の中間に当たるような配列を有するような isolate が多数見出され、この分類法が必ずしも適用できない場合があることが明らかになった(85)。これは、Simmonds et al(83) が塩基配列の解析を行った際に、222塩基という短い配列を用いたためであり、それまでに報告されていた9種類のサブタイプを分類する上では問題がなかったが、それ以外のサブタイプが発見されたときにこのような混乱が生じるものとなったと考えられる。より全配列に近い配列を用い、さらに多くの isolates が発見されてから分類法を作製すれば、より正確な分類法の確立が可能であったと考えられる(85)。しかし、何れにせよ現在はこの Simmonds の分類(83, 84)に準じて分類が行われている。これまでに1aから11aまで、38種類もの genotype が報告されているが(82)、これらのほとんどは部分的な配列に基づくものであり、全塩基配列が決定されている genotype は少数にすぎない。

最初に HCV の全配列を決定したのは Kato et al(20) であり、1b 型の全配列を決定して報告した。次いで、同じ1b型の配列は5施設から報告され(23, 27-30)、さらに1a型(21, 22, 24, 25)、2a型(33)、2b型(32)の配列が相次いで決定され、その後1c型(31)、3a型(88, 89)の配列が決定された。

これらの全塩基配列の決定はサブタイプの分類を行い、疫学上の解析を行う上でも重要であるが、そのみならず、現在難航している(90、91)ワクチンの開発を考える上でも重要である。効率の良いワクチンを開発するためには、各genotype間で共通の抗原性を有する部分に対する抗体を誘導し得るような抗原epitopeを見出す必要があるが、homologyの低いサブタイプ間でそのような部位を見いだせるかどうかは今後のワクチン戦略を考える上で重要なテーマであるといえる。このためにも、各genotypeの全配列を決定し、比較検討することが必要である。

さらにgenotypeに関して重要なことは、このウイルスに対して現在唯一有効な治療であるインターフェロンの治療効果の効果予測因子としてgenotypeが大きく関与していることが明らかとなってきたことである(92-100)。すなわち、genotype 1bのHCVが感染している患者はインターフェロンによる治癒が得られにくく、逆にgenotype 2aあるいは2bのHCVが感染している患者では治癒しやすいということである。これは、genotype間でウイルス量に差があり、genotype 1b感染者のウイルス量はgenotype 2aあるいは2b感染者のウイルス量より有意に多いということにも関連している(92-97)、多変量解析によりgenotype自体も独立要因として治療効果に寄与していることが証明されている(94、96)。さらに、最近インターフェロン治療開始早期のウイルス量の減少度を測定することにより、インターフェロンに対するHCVの感受性がgenotypeにより異なることが明らかにされた(99、100)。この差異がウイルスのどの構造に依存するのかは未だに明らかにされていないが、このようなgenotype間の生物学的な差異を解明するためにも各genotypeの全配列の決定とその構造の比較は重要であると考えられる。

筆者らは、1993年に日本人患者から得られたHCVのNS5B領域の340塩基の配列を検討しているうちに、それまで報告されていた4種のサブタイプとは異なる、新たなgenotypeと考えられる配列を見出した。この配列は、既知のサブタイプの何れともhomologyが69%未満と低く、新たなgenotypeであると考え、Tr型として報告した(78)。さらに、このサブタイプを含めて、日本に存在すると考えられた5種類のgenotypeを一度のPCRの反応を行うことにより簡易に決定する方法を開発した(78)。筆者らがこの方法で1,000例以上のC型肝炎患者のgenotypeの頻度を調べたところ、Tr型は、日本人患者のおよそ0.6%と希であることが明らかとなった(101)。このgenotypeはMori et al(77)がタイ国の患者から発見したgenotype Tbと、また、Simmondsらが

報告したgenotype 3b と相同性が高く、同一のgenotype である可能性が考えられた。そこで、このgenotype のサブタイプ分類上の位置を明らかにし、生物学的特性との関連を明らかにするために、筆者はこのgenotype の全配列を決定し、これまでに報告されているgenotype の配列と比較し、その特徴を明らかにすることを試みた。さらに、このgenotype 3b が検出される患者は、ある診療所の受信者に集中していることを明らかにし、このようなgenotype 解析の臨床疫学的な意義についても考察を加えた。

＜対象と方法＞

患者血清

genotype 3b 型HCV 感染患者血清はC型慢性肝炎に罹患した患者のうちからNS5 領域の配列をもとにしたmix primer を用いたPCR 法(78)によって選択した(後述)。全配列の決定に使用した症例は、1929年生まれ男性であり、1980年に受診し、腹腔鏡、肝生検で肝硬変と診断され、1993年に肝癌を発症して治療中である。

ウイルスRNA の抽出

血清からのRNA の抽出は、既報のごとく行った(102-104)。すなわち、血清100 μ l に400 μ l のグアニジンバッファー (4 M guanidine thiocyanate, 100mM Tris-HCl [pH7.5], 0.5% sarkosyl, 0.1% 2-mercaptoethanol) を加え、室温で30分間攪拌し、500 μ l の蒸留水飽和フェノール/クロロフォルム(4/1) で3回抽出し、さらにクロロフォルムで1回抽出した後にエタノール沈殿を行いRNA を沈殿させた。この沈殿に1U/ μ l のRNase inhibitor 溶液9 μ lを加えて溶解し、RNA 溶液とした。

cDNA合成

上記RNA 溶液9 μ l に対して、終濃度50mM Tris-HCl(pH7.5)、75mM KCl、10mM dithiothreitol、3mM MgCl₂、1U/ μ l RNase inhibitor、80 μ g/ml random primer、1mM dNTP (N=A, T, C, G) 10U/ μ l M-MLV reverse transcriptase (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) 総量20 μ lとなるように各溶液を加え、42°Cで30分間逆転写の反応を行った。

Mixed primer を用いた nested PCR による genotype の決定

genotype を決定するための primer は NS5 領域の配列を比較し、各タイプに特徴的で、しかもタイプ内では保存されている領域を選択してデザインした(78)。各 genotype 特異な sense primer を 5 種類 (genotype 1a 用; 5'-TCATCTCGACCCCCAAGCCCCGCGT-3', 1b 用; 5'-AGGCCACTGCGGCCTGTGAGCTGCGAA-3', 2a 用; 5'-TATGTTCAACAGCAAGGGCCAGA-3', 2b 用; 5'-GGCTTGTTCCCTGCCTCAAGAGGCCA-3', 3b 用; 5'-CCGCGCTAGCGGCGTCTTGC-3') と、genotype 共通の antisense primer (5'-CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA-3') を混合し、mixed primer として使用した。これらの primer は NS5 領域の異なる部位に設定してあるので、各 genotype の増幅された DNA 断片はサイズが異なり、agarose gel で電気泳動するとそのサイズを比較することにより genotype が決定できる(78)。

上記 cDNA 溶液 1 μ l に対して終濃度 10mM Tris-HCl (pH 9.0)、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、200mM dNTP (n=A, T, C, G)、0.01% geratin、0.75U/mL Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Japan, Tokyo, Japan)、及び、各 600pM の 6 種類の primer を加え、総量 25 μ l とし、94°C で 4 分間最初の熱変性を行った後に、94°C 1 分、61°C 1 分、72°C 1 分のサイクルで 10 サイクル、次いで 90°C 0.5 分、59°C 1.5 分、72°C 1 分のサイクルで 30 サイクルの PCR の反応を行った。なお、反応の特異性を増すために、primer のみを精製水 5 μ l に溶解し、最初の heat denature 後に加える、いわゆる hot start 法を採用した。反応産物は 3% agarose gel により電気泳動を行い、ethidium bromide により染色を行った後に紫外線照射下に写真撮影を行い、genotype を決定した。

genotype 3b の全ゲノムの PCR による増幅

これまでに報告された 4 種類の genotype 間で保存されている領域に primer を設定し、genotype 3b の全ゲノムの PCR による増幅を試みた。しかし、genotype 3b と、他の 4 種の genotype との塩基配列の違いのために、増幅不能の箇所が全長の約 1/3 をしめた。このため、増幅不能の箇所については、RACE 法(105)を一部改変して用い、未知の部位の配列を決定した。すなわち、まず、cDNA を RNase H 処理後、DNA

polymerase I を作用させることにより 2 本鎖 DNA とした。この合成反応には Boehringer Mannheim 社製の cDNA 合成キットを使用した。合成した 2 本鎖 DNA を適当な制限酵素で切断した後に 1/10 量の 3 mol の酢酸ナトリウムを加え、さらに 2.5 倍量のエタノールを加え、 -20°C で 2 時間冷却後 16,000 rpm で 30 分遠心し DNA を沈殿させた。上清を吸引除去後、DNA を精製水に溶解し、200 mM sodium cacodylate (pH 7.2)、1 mM MgCl_2 、1 mM 2-mercaptoethanol、1 mM dCTP とし、これに Toyobo 社製 terminal deoxynucleotidyl transferase を 500 units/ml とするように加え、poly C による tailing の付加を行った。この tail に対して、poly G を 3' 側に有する RACE 用 primer (105) を作製し、この primer と既知の部位にあわせて作製した primer とを使用して PCR を行うことにより、未知の部位の配列を決定した。5' 及び 3' 末端の配列も同様に RACE 法 (105) によって決定した。これらの増幅に使用した primer を表 1 に示した。

表 1、C 型肝炎ウイルス genotype 3b(isolate Tr) の全長を増幅するために使用した primer。

sense(5'-3')	position	antisense(5'-3')	position
1		TTTATCCAAGAAAGGACCC	204 - 186
2 GCCATAGTGGTCTGCGGAAC	135 - 154	GATGCACGGTCTACGAGACC	339 - 320
3 ACTGCTAGCCGAGTAGTGTT	244 - 263	ATTCCCTGTTGCATAGTT	843 - 826
4 ATGGGGTACATACCGCTCGT	739 - 758	TTCAGAGCGGTCTCTGATGTGCCA	1625 - 1600
5 ACCCGAGGTCCAAGTCAGAA	1552 - 1571	GCTTCAATGTCCTCATCCC	2084 - 2065
6 GTGTGGATGAACAGTACAGG	2002 - 2021	AGCTTCCCTCGGATGTGCCA	2708 - 2689
7 ATCGCGGACGTGCAATACCT	2449 - 2468	GCCATTTGGACGTACTTCCC	3173 - 3154
8 GTCCTTGGTCCGCTGTATTT	3046 - 3065	CCAGCACCATGGTACACAGT	3620 - 3601
9 GTGGTGACTGGTGAGGTGCA	3523 - 3542	GGGTCAATCCCATAGGCTTT	4190 - 4171
10 GGCAGCGGCAAGAGCACAA	4060 - 4079	ACCCCCATCCCTCTGAGCTT	4598 - 4579
11 AAGAAGAAGTGTGACGAGCTCGC	4552 - 4574	GGCCGGCATGCATGTCATGATGAT	5316 - 5292
12 CCTCTCCTGTATAGGTTAGGAGC	5230 - 5252	ATGAAGCAATGGCGGGTTA	5731 - 5712
13 ATTCAGTACCTGGCCGGTCT	5677 - 5696	CGGTTTCATCCACTGCACAGC	6116 - 6097
14 TGGCGTGATATGTGCTGCAG	6045 - 6064	GGGAAAGGTCCATGCCACAT	6545 - 6526
15 GGGTCCATGAGGATAGCAGG	6487 - 6506	TCAGGGGCTCGAAGAGTCA	7141 - 7122
16 TCACCCGGTGGAGTCAGAGA	7085 - 7105	CAACGAATTCCTGAGTGGACTGATAG	7725 - 7700
17 CTCAGCGACGGGTCTTGGTCTACCGT	7576 - 7601	TGCCTTACGAGCTTCTGGTTCA	8391 - 8370
18 CGCTGCTTTGACTCAACGGTCAC	8300 - 8321	CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA	8670 - 8650
19 GGAGGACAGACAGCCCTGC	8625 - 8644	TGTTGCCATAGCCAGGAGTTG	8869 - 8850
20 TGGGAGACTGCTCGCCACAC	8824 - 8843	TGATAAATGTGGATCCCGCC	9320 - 9301
21 TATCACAGCGTGTCGCGTGC	9316 - 9335		

PCR 産物のcloning と塩基配列の決定

PCR で増幅されたDNA 断片の塩基配列を決定するために、予測されたサイズのDNA 断片をagarose gel から回収し、2-10 μ l のTE 溶液(10mM Tris-HCL (pH7.5), 1mM EDTA) に溶解した。この溶液1 μ l と Stratagene 社製のplasmid vector pBluescript II 2ng をT4 DNA ligase (Toyobo, Tokyo, Japan) でligation を行った後にE.coli JM109 のcompetent cell を用いてcloning した。Taq DNA polymerase のmis-incorporation を排除するため、各DNA 断片に対して3 clone 以上の配列を決定した。塩基配列の決定はSanger のdideoxy 法(106)により行った。Parkin Elmer 社製Taq dye primer cycle sequencing kit を用いて反応を行い、同社製373A sequencer を用いて塩基配列を決定した。

塩基配列、アミノ酸配列の解析

得られた塩基配列の解析はHitachi 社製DNASIS system を用いて行った。RNA の2 次構造の予測はZucker and Stiegler (107)の方法を用いて行った。塩基配列間の遺伝学的距離の算出にはSix parameter method (108)を使用した。分子系統樹の作製はNeighbor Joining 法(109)を用いて行った。塩基配列のalignment、分子系統樹の作製はFujitsu 社製BioResearch System を用いて行った。

＜成績＞

HCV genotype の決定と genotype 3b の頻度

各type に特異的なprimer を加えて、mixed primer set とし、これを用いてPCR を行うと、増幅されたDNA 断片のサイズを比較することにより、容易に genotype を決定することが可能であった(78)。

この方法を用いて1100 例のC型慢性肝炎患者のgenotype を決定したところ、genotype 3b は7例(0.6%) に認められた。このうち6例はgenotype 3b 単独感染であったが、残りの1例はgenotype 1b との合併感染例であった。

genotype 3b の感染に関する臨床疫学的解析

最近筆者らは、1397例のC型慢性肝炎患者の血清を解析し、genotype 3b の頻度が genotype 検出可能であった1330例中14例(1.1%)であることを明らかにし、さらにこの14例中11例(79%)がある診療所を受診していたことを見いだした(110)。日本人に見いだされるgenotype の頻度は、このときの調査ではgenotype 1a 1例(0.1%)、1b 960例(72.2%)、2a 243例(18.3%)、2b 97例(7.3%)、3a 1例(0.1%)であったが、この診療所を受診したことのあるC型慢性肝炎患者32例ではgenotype 3b が11例(34.4%) と高頻度であり、この診療所を受診したことによるgenotype 3b のHCV に感染するrelative risk は、multivariate logistic analysis によると、207.2 ($P<0.0001$, 95% confidence interval 53.5-802.6) と、極めて高かった。この診療所を受診していない、残り3例のgenotype 3b 陽性者の感染経路については不明であった。

Polymerase chain reaction と改変RACE 法を用いた genotype 3b genomic RNA の増幅

RACE 法を改変した方法により未知の部分の配列を決定し、決定し得た部位に順次 primer を設定して行くことにより、最終的にgenotype 3b の全genome を、表1 に示したprimer によって21 のoverlap するsegment として増幅することが可能であった

(図1)。

genotype 3b のHCV の全配列とgenome の構造

図2にgenotype 3b の全塩基配列とアミノ酸配列を示した。全塩基配列は3' 末端のU-stretch を除いて9439 塩基からなり、3023 アミノ酸からなるsingle open reading frame をコードしていた。この配列には、宿主のsignalase の認識部位と考えられる配列 (111)、helicase/ATPase(112、113)、RNA dependent RNA polymerase (114)などに保存されている共通のモチーフが何れも存在していた。

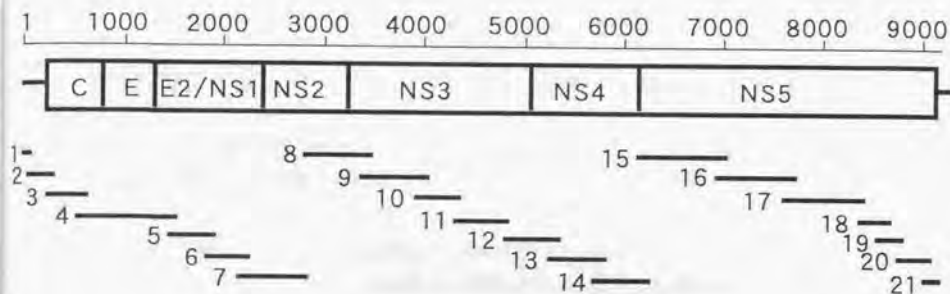


図1、genotype 3b の塩基配列決定のための polymerase chain reaction による増幅。1-21のsegmentに分けて増幅し、得られたDNA断片をcloningし、塩基配列を決定した。2-20の各segmentでは最低3 clone、1は10 clone、21は8 cloneについて配列を決定した。

[illegible]

[illegible]

全配列が報告されている genotype との比較

これらの配列を既報の6種のgenotypeと比較すると(表2)、5' noncoding regionは、genotype 1、2では341塩基であるのに対してgenotype 3bではgenotype 3aとともに339塩基と2塩基の欠失を認めた。single open reading frameにコードされているpolyproteinはgenotype 1では3010-3011アミノ酸、genotype 2では3033アミノ酸であるのに対して、genotype 3bでは3023アミノ酸であり、3021アミノ酸と報告されたgenotype 3aとともにgenotype 1と2の中間のサイズとなっていた。U-stretchを除く3' noncoding regionはgenotype 3bでは31塩基であり、genotype 3aの23塩基に次いで短かった。

表2 HCV-Tr の構造と他のgenotypeとの比較

genotype	5' noncoding region	polyprotein	3' noncoding region
1a	341 nt	3010 aa	36 nt
1b	341 nt	3011 aa	41 nt
1c	341 nt	3011 aa	66 nt
2a	340 or 341 nt	3033 aa	42 nt
2b	341 nt	3033 aa	41 nt
3a	339 nt	3021 aa	23 nt
3b	339 nt	3023 aa	31 nt

比較に用いた配列、genotype 1a 3例 (11,12,14,15), genotype 1b 7例 (10,13,16-20), genotype 1c 1例 (21), genotype 2a 1例 (23), genotype 2b 1例 (22) genotype 3a 2例 (68,69)。

さらに、ウイルスの各部位ごとに、塩基配列及びアミノ酸配列のhomologyを比較した(表3)。5' noncoding regionの塩基配列が最も高度に保存されていた。この部位においてはhomologyが最も低いgenotype 2b とも90.0%と高い保存性を示し、最もhomologyの高いgenotype 3a との間では96.7-97.1%であった。

表3、C型肝炎ウイルスgenotype 3bの全配列と、他の全配列が決定されているgenotype(1a、2a、2b、3a)との比較

Hepatitis C Virus Genotype							
region	nucleotide (amino acid)	1a	1b	1c	2a	2b	3a
5'NC	339	93.9-94.5	90.6-93.2	93.9	91.7	90.0	96.7-97.1
core	573	80.8-81.2	79.4-81.3	81.3	77.7	76.8	81.7-84.6
	(191)	(85.3-86.4)	(84.3-86.9)	(86.4)	(81.7)	(81.2)	(84.8-89.0)
E1	579	63.4-63.6	65.1-67.7	62.9	61.8	59.2	72.8-73.5
	(193)	(60.1-60.6)	(60.4-64.1)	(58.0)	(55.2)	(54.2)	(73.6-74.6)
E2/NS1	1059	52.3-54.0	51.8-55.8	54.8	61.8	62.5	73.5-73.9
	(353)	(69.97-70.8)	(69.1-72.2)	(70.2)	(66.0)	(68.3)	(78.7-79.3)
NS2	891	58.9-59.9	60.4-62.6	61.5	58.6	56.0	74.3-75.4
	(353)	(60.3-61.6)	(60.3-63.6)	(62.0)	(58.3)	(53.9)	(81.1-82.8)
NS3	1893	69.5-70.2	69.1-70.8	70.4	69.3	68.1	79.1-79.2
	(631)	(80.0-81.1)	(79.2-81.5)	(81.9)	(79.2)	(78.8)	(89.7-90.2)
NS4	945	68.3-68.8	66.8-68.5	67.1	63.4	63.0	77.5-77.6
	(315)	(76.2-78.7)	(73.7-75.9)	(74.0)	(68.9)	(67.9)	(90.2-90.5)
NS5A	1356	63.7-64.8	63.2-65.0	63.9	57.8	62.0	72.4-73.4
	(452)	(67.7-69.3)	(67.7-70.1)	(69.2)	(56.0)	(56.4)	(81.4-82.1)
NS5B	1773	69.8-70.4	68.7-70.1	71.6	68.7	68.1	82.1-83.0
	(591)	(75.8-77.0)	(75.5-77.2)	(78.8)	(75.5)	(75.6)	(88.2-89.2)
3'NC	31	58.4-64.3	61.3-64.5	65.2	51.6	48.4	76.7-83.3
Total	9439	68.4-68.7	68.3-69.0	67.2	65.8	65.6	77.9-78.5
	(3010-3039)	(72.9-73.6)	(72.7-74.3)	(74.2)	(67.2)	(67.1)	(84.9-85.5)

NC:noncoding. 比較に用いた配列、genotype 1a 3例 (11,12,14,15), genotype 1b 7例 (10,13,16-20), genotype 1c 1例 (21), genotype 2a 1例 (23), genotype 2b 1例 (22) genotype 3a 2例 (68,69)。

6種のgenotypeの5'末端の200塩基の配列をalignmentしたものを図3に示した。高度に保存されたこの領域でも最も5'末端の17塩基はgenotype間での変異が多く認められた。しかしながら、この5'末端の20-21塩基はhairpin構造をとることが知られているが(32)、これらの変異はすべてこのhairpin構造を保持する様な変異であった(図4)。



図3、C型肝炎ウイルス各 genotype の5' 末端の塩基配列。

core protein のATG のAを1として番号をつけてある。

-は同一の塩基、.はdeletionを示す。

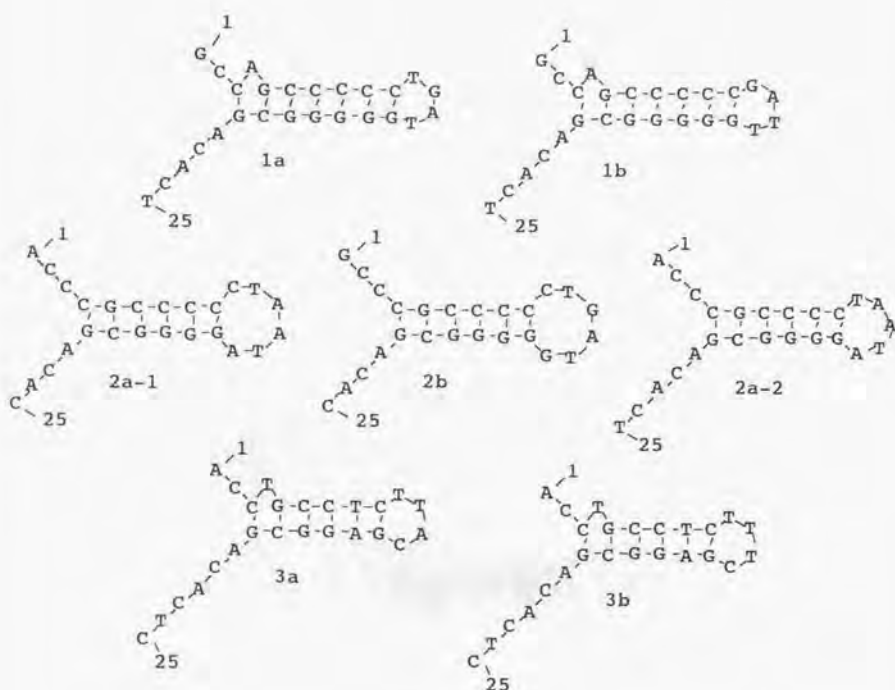


図4、C型肝炎ウイルス各 genotype の5' 末端の塩基が形成すると考えられる hairpin 構造。

5' noncoding region とは逆に、3' noncoding region は genotype 間で最も homology が低かった (表 3)。 genotype 3b と最も homology の高い genotype 3a でも 76.7-83.3% であり、最も低い genotype 2b とでは 48.4% ときわめて低かった。さらに、 genotype 1 及び 2 では、2 カ所の in frame の stop codon が存在することが知られているが (20-33, 85, 88, 89)、 genotype 3b では、 genotype 3a とともに、 stop codon は 1 カ所しか存在しなかった (図 5)。

genotype

9281					
1a	CATTATCAC	AGCGTGCTC	ATGCCCGCC	CCGCTGGTC	TGGTTCTGCC
1b	-A-----	-C-----	G-----A-	-----T	CT--G---
2a	-----	-----G-	G-----A-	-----TA--	CTCC-TG---
2b	-----	-----G-	G-----A-	-----CTA--	CTCC-T---
3a	-----	-----G-	G-----AA-	-----CAT--	CT-C-T---
3b	-----	-----G-	G-----AA-	-----CAT--	CT-C-T---

9331					
1a	TACTCCTGCT	TGCTCCAGGG	GTAGGCATCT	ACCTCCTCCC	CAACCGATAA
1b	-----A-	-T--T---	-----T-	-G-----	-GCT--G--G
2a	-----A-	-TT--T---	-----C-T	-A-----	-GCT--G--G
2b	-----A-	-AGC-T--A	-----TTT-A	-----GCT--	-G--G--G
3a	-----A-	AA-A-T---	-----T--T-G	-----AGCT--	-G--G--G
3b	-----A-	-A-C-T---	-----T-	T-----A-	TGCT--G--G

9381					
1a	AGGTTGGGG	AAACACTCCG	GCCTCTTAGG	CCATTTTCTG	TGTTTTTTTT
1b	-C-GG-A-CT	-C-----A	-G-CAA---	-----CCCG-T	-T-----
2a	-CGGCACAT	-TTAGT--A-A	CT-CA-AGCT	AAC-G-C-CT	-T-----
2b	-CGGCAAAC	CTTAGT--A-A	CT-CA-AGCT	AGT--CCG-T	-T-----
3a	GCTGGTAA-A	T-----A	TTTCT--TTT	GTT----T-T	-T-----
3b	GCTGGTA--	T-----C-A	A--CTG-GTT	TTT----T-T	-T-----

図 5、C型肝炎ウイルス各 genotype の3' 末端の塩基配列。

- は同一の塩基を示す。polyprotein の stop codon を □ で囲んで示した。 genotype 1a、1b、2a、2b では 2 カ所の in frame stop codon が存在するが 3a、3b では 1 カ所しか存在しない。

また、この3'末端には3つのstem-loop構造が存在することが知られているが(115)、この構造はgenotype 3bにおいても同様に存在することが想定された(図6)。さらに、ウイルスpolyproteinのアミノ酸配列をgenotype間で比較すると、全polyproteinではそのhomologyは最も低いgenotype 2bとの間で67.1%、最も高いgenotype 3aとの間で84.9-85.5%であった。このpolyproteinを各部位ごとにgenotype間で比較すると(図7)、core、NS3、NS5領域ではアミノ酸の保存性が高かったが、NS2、NS5A領域では保存性は低かった。さらに、アミノ酸の保存性の低い部位について、詳細にみると、E2/NS1領域(図8)とNS5A領域(図9)に各genotype間できわめて保存性の低いdomainが存在した。

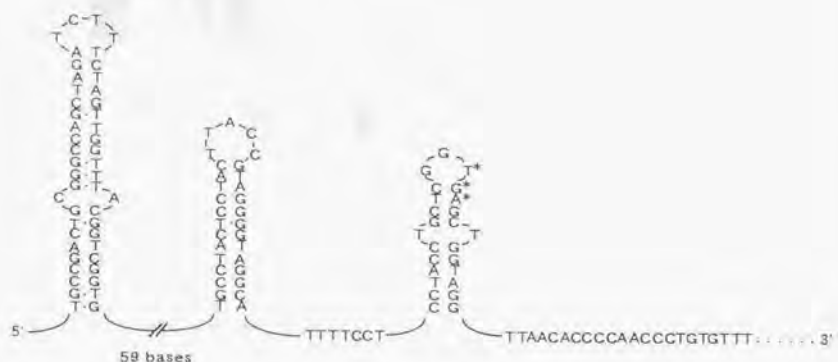


図6、C型肝炎ウイルス genotype 3b の3'末端のとりうる stem-loop構造。

Han et al. が報告したgenotype 1a、1b、2aに存在するものとはほぼ同様の構造とspacing がみられる。

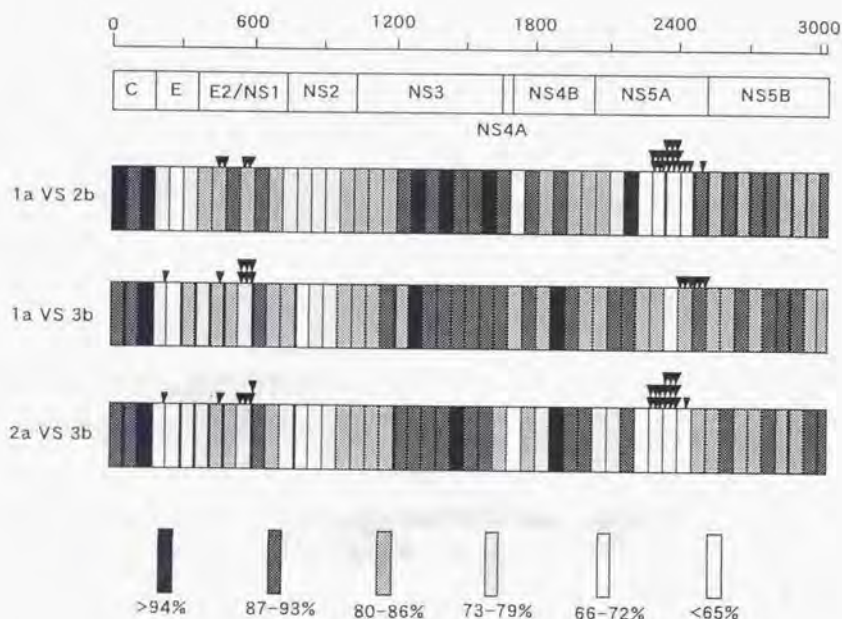


図7、C型肝炎ウイルスの genotype 1、2、3 のアミノ酸配列の homology の比較。

代表として1a、1b、3b の配列を用いて比較した。homologyの高低を下に示した塗りで表した。また、genotype 間でalignment を行ったときにアミノ酸の deletion あるいはinsertion が存在すると考えられる部位を▼で示した。

genotype		E2/NS1		HVR 1		HVR 2	
1a	370	WARVLVLL	FAGVDAETIV	SGGGAARMS	GLVSLFTP	KONIQLNTN	GSWHINSTAL
1b		---T-A---	---G-YT---	---A-AHTT---	T-A-S---	S-R-V---	---R---
2a		---V-I---	A---Q-MT---	V---ST-HNAR---	T-TGM-SL---	R-K---	---R---
2b		---IAT---	V---T-YT---	---Q-G-TVA---	FAG-T---	---LY---	---R---
3a		---AIIMVM---	S---H-YT---	T---T-S-HTQ---	AFAG-DI-P---	Q-KL-V---	---R---
3b		---VI-IM---	S---T-HT---	T---S-Q-TA---	FT-F-R-P---	S-L-V-S---	---
1a	430	NCNESLNTGW	LAGLIYQHKF	NSSGCPERLA	SCRRLTDFDQ	GWGPIS.HAN	GSQPDQRPY
1b		---D-H-F---	---A-E-T-R---	---M---	A---PTDW-A---	---T-YTE---	PDS---
2a		---D-Q-F---	---S-F-T---	---G-D-RT---	---A-STEARV---	---ALOYED---	VTRNE-M---
2b		---D-I-F---	---S-F-T---	---T-Q-S---	---KPI-F-R---	---TLEYET---	VTRNE-M---
3b		---D-I-F---	---S-F-T---	---T-Q-S---	---KPI-F-R---	---TLEYET---	VTRNE-M---
1a	488	CWHYPPKPCG	IYPAKSVCGP	VYCFTPAPVV	VGTTDRSGAP	TYNWGANDTD	VFLNNTTRPP
1b		---A-R---	---S-Q---	---M---	V---	---S-E-E---	---M---
2a		---R---	---RT---	---KQ-V---	---T-E-E---	---L-S---	---
3b		---A-R-D---	---S---	---AR-V---	---T-E-E---	---L-KSD---	---
3b		---R-N---	---TKPLN---	---TK-L---	---RF-V-E-S---	---L-YSE---	---
1a	548	LGNWFCTWM	NSTGFTKVC	APPCVI.GG	...GGNNT.L	HCPTDCFRKH	PEATYSRCGS
1b		Q-S---	---Y-T---	G-N-GG	V-H---	---T---	---TK---
2a		Q-S---	---Y-T---	---R-RI---	ADPNASMD---	---DT---	---TK---
3a		S-R---	---L-T---	NIV-E	CRPNEED---	---D---	---LK---
3b		Q-R---	---V-T---	N-YL-M	KDTEA-Q-H	K---	HD-FT---

図8、E2/NS1に認められたアミノ酸の保存性の低い部位。

特に保存性の低い部位を□で示した。

genotype		E2/NS1		HVR 1		HVR 2	
1a	2213	SRKATCTINH	DSPDAELIEA	NL.L...WR	QEMGNITRV	ES.ENKVVIL	DSFDPLVAEE
1b		---TH---	---D---	---	---	---E-H-G---	---
2a		---R---THG	KAY-VQVVD	FMGGDVT	I-SKSKVVL	D-LDEM-EEB	SDLE-SIPS
2b		---R---THG	KAY-VQVVD	FMGGDVT	I-SKSKVVL	D-LDEM-EEB	SDLE-SIPS
3a		---QTHR	PH---VD---	---	---	---T---	---E-R---
3b		---QTHR	PH---VD---	---	---	---T---	---E-R---
1a	2257	DEREISVPA	EILRKSRR.F	TQAL.PIWAR	PDYNPP.LIE	.TW.KKPN..	YEPP.VVHGC
1b		---A---	---R---	PS---	---	S-D-D---	V---
2a		YMLPKKKF-P	ALPAWA-PDY	NPP-VES-K	---Q-ATVAG	CALPPPCKTP	TP---RRRTTV
2b		YLTKRRKF-P	ALPPWA-PDY	NPV-IET-K	---G-E---TVLG	CALPPT-OTP	VP---RRRAK
3a		---DV-P-A-	CFK-PPK.Y	PP---	---	R-A-D---	V---
3b		---DT-L-I-	CFK-PPK.Y	PP---	---	S-D-T---	A---
1a	2302	PLPPPOSPPP	PPPRKKRTV.	VLTESTLST	ALAELAAKSF	SS..S.STSG	ITGDNITTS
1b		---TKA-I	---R---	---NV-S---	---T-T---	SS..S.A	VDSGTA-ALP
2a		G-SESSIADA	LOQLAISKFG	OPPP-GD-GL	STGAD-D-G	.SR.T.PPDE	LALSE-GSI
2b		V-TQDNVEG	LREMAKVL	P-QDNND-GH	STGADTGGDI	.VQ.O.PSDE	TAASEAGSL
3a		A-RGA	---R---	Q-DG-NV-A	---A-E---	P-SKPOEENS	SSSGVH-Q
3b		A-TRPA	---R---	K-DG-NV-A	---LA-ER---	P-TKPEG-GT	SSSGVH-Q
1a	2346	EPAPSGCSPD	SDAESYSS	MPPLEGEPGD	PDLSDGWSWT	VSSEAGTED.	VCSCMSYTW
1b		DO-SDDGKG	---V---	---	---	---S---	---
2a		SMP-LEGE-G	DPDLEPEQ	VELQPPPP-G	VVTGSGSGS	W-TCSSED-S	---
2b		SMP-LEGE-G	DPDLEPEQ	VGSAPPSE-E	CEVI-SDSKS	W-TVSDQ-S	---I---
3a		TSKVPSPG	GE-S-C-	---	---CD---	---DSE-EQS---	---
3b		AESGDSPETG	EE-V---	---	---DAD---	---DSE-EQS---	---

図9、NS5A領域に認められたアミノ酸の保存性の低い部位。

特に保存性の低い部位を□で示した。

全配列が決定されていない genotype の部分配列との比較

表4にこれまでに部分的な配列が報告されている。genotype 3a-3f 及び4a、5a、6aとの配列のhomologyの比較を示した。同じgenotype 3 の中での比較では、5' noncoding region の保存性は高く、homologyは96.8-98.1%であった。core領域も同様に比較的高いhomologyを呈していたが、短い配列しか比較できなかったisolate では79%と低いhomologyのものもみられた。E1以下の領域でも短い部分的な配列の比較ではhomologyは低いものもあり、十分な長さの配列による比較が必要と考えられた。同様に、genotype 4a、5a、6aではNSSB領域のわずか219-222塩基の配列の比較のみ可能であり、そのhomologyは63.1-70.7%と低かった。

genotype 3b のhypervariable region の配列の検討による quasispecies nature の解析

HCV のE2/NS1 領域のアミノ末端側にはアミノ酸の変異が高度に認められるhypervariable region が存在することが知られている。この部位の配列は一人の患者から得られたcloneでも多彩であることが知られている。genotype 3b でも同様のhypervariable region が存在するものと想定し、この部位の配列を10 clone について決定して比較した(図10)。核酸レベルでも、アミノ酸レベルでも、全く同一の配列が得られたのは2 cloneに過ぎず、残りは全て配列が少しずつ異なる、いわゆるquasispecies を形成していた。

1477

TCAGGAGTGG	ACGCGACAAC	ACACACCACT	GGTGGCAGCG	CGGCCCGAGC
-----	-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-----	-----
-----	-C-G-	-T-	-A-	-AA-
-----	-----	-----	-T-	-A-A-
-----	-----	-----	-T-	-A-
-----	-----	-----	-T-	-A-
-A-	-----	-----	-----	-T-A-
-A-	-----	-----	-----	-T-A-
-A-	-----	-----	-----	-T-A-
-----	-----	-----	-----	-----
CACTGCCGGG	TTTACAAGTT	TTTTACCCG	AGGTCCAAGT	CAGAAT
-----	-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-G-	-----
-----	-----	-----	-----	-----
-A-	C-	-A-C	-A-	-----
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G
-T-CT	C-C-G-GC	-A-TT	CAA	-G

380

SGVDATHTTT	GGSAARATAG	FTSFFTRGPS	QN
-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-G-
-----	-----	-----	-----
-PR-	-K-	-----	-----
-Y-	-S-V-OT-R	L-NP-R	-----
-----	-T-SA	L-GL-NL-Q	-K
-----	-T-SA	L-GL-NL-Q	-K
-E-	-T-SA	L-GL-NL-Q	-K
-E-	-T-SA	L-GL-NL-Q	-K
-E-	-T-SA	L-GP-NL-Q	-K

図10、genotype 3b のHCV のE2/NS1 領域に見られた
hypervariable region の解析。

上段、10 cloneの塩基配列の比較。

下段、10 cloneのアミノ酸配列の比較。

分子系統樹による genotype の解析

既報の各genotype の塩基配列をもとに、NS5 領域の222塩基の配列をalignmentし、その遺伝学的距離を算出した。これらの遺伝学的距離をもとに、Neighbor joining法により作製した分子系統樹を図11に示した。genotype 3b は相対的にはgenotype 1と近く、genotype 2、5、6とは遠い関係にあることが示された。

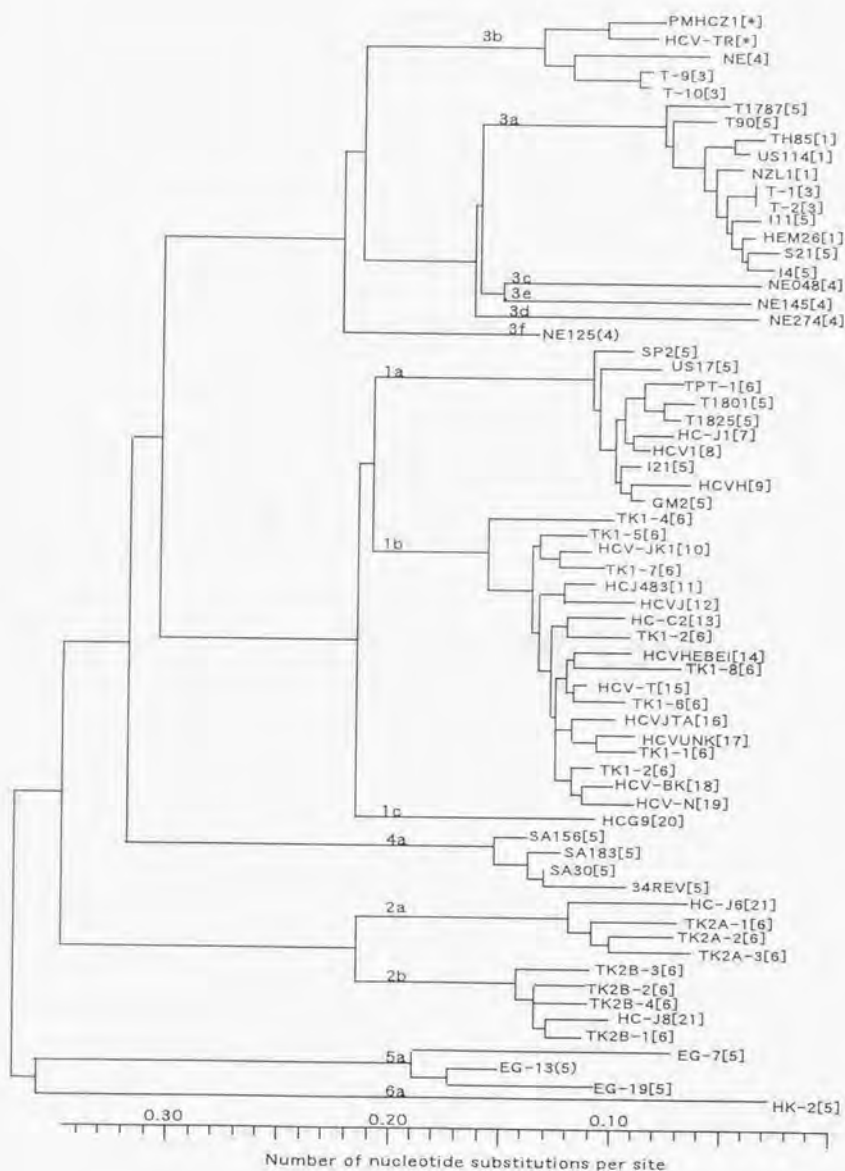


図11、NS5B 領域の222塩基の配列を利用して作製した
phylogenetic tree。

この領域を利用すると、比較的短い配列でも各genotypeに分かれている様子がよく表現される。
[1], Okamoto et al(115)、、[2], Mori et al(77)、、[3], Tokita et al(82)、、[4], Simmonds et
al(81)、、[5], Chayama et al(78)、、[6], Okamoto et al(25)、、[7] Choo et al(21)、、[8],
Inchauspe et al(24)、、[9], Honda et al(28)、、[10], Okamoto et al(74)、、[11], Kato et
al(20)、、[12], Wang et al(26)、、[13], Bi et al(unpublished)、、1992、、Chen et al
(29)、、[15], Tanaka et al(27)、、[16], Cho et al(unpublished)、、1992, [17], Takamizawa
et al(23)、、[18], Hayashi et al(30)、、[19], Okamoto et al(31)、、[20], Okamoto et
al(32)、、[21], Okamoto et al(33)。

<考察>

Enomoto et al(75). が最初にサブタイプが存在を報告して以来、数多くのサブタイプが報告され(76, 77-81, 116-118)、最近のTokita et al(82). の報告を含めると、世界各国からのgenotype の総数は38 に及ぶ。

従来ウイルスのサブタイプは中和抗体のタイピングに基づくserotype によってもっぱら分類されてきた。しかし、HCV においては持続性感染となる頻度が高く、中和抗体によるタイピングが困難である。Tsukiyama-Kohara et al(118). による、非中和抗体であるNS4 領域の蛋白に対する抗体による分類、あるいはMachida et al(119). によるcore 蛋白に対する抗体による分類法が報告されているが、これらはgenotype 1 と genotype 2 を大まかに2分するものであり、数多くのgenotype を分類することはできない。特にcore 蛋白を用いた方法では検出率が低く(119)、実用的とはいえない。さらに、最近Bhattacharjee et al(120). によりtype 1-6 に対する抗体を合成ペプチドを用いて検出する方法も報告されたが、これもサブタイプまでは判定することはできない。

一方、genotype についての決定法もいくつか報告されているが(78, 101, 116, 121-124) これらはすべて、比較的早期に発見されたgenotype のいくつかを判別するものであり、数多くのgenotype が発見された現在、そのすべてについて正確に判定するものではない。結局genotype の判別には、ウイルスの塩基配列を決定して分子遺伝学的な解析を行わなければならない。しかも、分子遺伝学的な解析を行うにしても、部分的な短い配列をもとにして行くと、遺伝学的な距離の推定において誤差が生じやすいため、isolate ごとになるべく長い配列を決定して判定を行う必要がある。現在最もよく用いられているgenotype の分類はSimmonds et al(83, 84). により提唱されたものである。彼らはgenotype を大きく6種のタイプと、それを細分するサブタイプとに分類した。しかし、この分類は、彼らがNSSB 領域のわずか222 塩基の配列をもとに分子系統樹による解析を行って決定したものである。この分類が提唱された当時では未だ6種類のタイプと、9種類のサブタイプしか発見されておらず、この9種類の中ではタイプとサブタイプ、さらには同一サブタイプ内のisolate のhomologyはoverlap していなかった。しかし、その後特に東南アジアから多数の新しいgenotype が発見されるにつれ(82, 85-87).、タイプとサブタイプとの中間に相当するような配列を有するisolate が

存在することが明らかになってきた(82, 88)。このようなoverlap は、短い配列を利用して分類しようとすればするほど顕著となる可能性が考えられる(82, 88)。従って、全配列を決定し、各isolate 間の関係を明らかにすることが、正しいサブタイプ分類を行う上でも重要と考えられる。

筆者らはHCV のNS5B 領域の340 塩基の配列を解析し、日本人患者から、それまでに報告されていないgenotype と考えられる配列を有するisolate を見出し、genotype Trとして報告し(34, 78)、日本には5種類のgenotype が存在することを示した(78, 125)。そして、これらの塩基配列に基づき、各genotype に特異的なprimer を設定し、これらをmixed primer としてPCR を行うgenotype の決定法を開発した(78, 126)。その後、筆者らは、在日バキスタン人から第6のgenotype を見出し、これら6種類のgenotype すべてを検出し得るようにgenotype 決定法を改良した(101)。筆者らが新たに見出したこれらのgenotype は、その後Mori et al(77)、あるいはSimmonds et al(83)、によって報告された配列と比較することにより、3b および3a のgenotype と最もhomology が高いことが明らかとなった。しかし、これらが本当に同じサブタイプ内のisolate なのか、あるいは異なるサブタイプなのかはさらに詳細な配列の検討を行わなければ明らかにできない。そこで、筆者はこのisolate の全配列を決定し、検討を行った。筆者がこのgenotype 3b の全配列を決定するまでに、Kato et al(20)、により、最初にgenotype 1b 型の全配列が決定され、次いで、同じ1b型の配列が(23, 27-30)、さらに1a型(21, 22, 24, 25)、2a型(33)、2b型(32)の配列が相次いで決定された。その後1c型(31)、3a型(88, 89)の配列も決定された(表2, 3)。これらの全配列と、今回筆者が解析したgenotype 3b の配列をgenome 全体で比較すると、タイプの異なる1a、1b、1cとでは72.7-74.3%、2a、2bとは67.1-67.2%、同じタイプ内の3aとは77.9-78.5%であった(表3)。さらに、Tokita et al. が最近新たに見出したgenotype 10a、11aの全配列と比較しても明らかに異なるgenotype であると考えられた(82)。今後さらに残りのgenotype の全配列の解析も進み、全配列が決定された配列との比較が行われれば、これらサブタイプ間の関係もより明確にされるものと考えられた。

現在までにgenotype 3b の存在が報告されているのは、タイ(77, 87, 127)、ネパール(85)、ベトナム(86)、インド(128)など、アジア諸国に限られている。このよう

に局限した地域分布を示すgenotypeはその伝播経路を解析する上でも重要と考えられる。

genotype 3b は日本人のC型慢性肝疾患患者でも1%程度と少なかったため、C型肝炎ウイルス感染の伝播に関する好材料であると考え、このサブタイプが陽性であった患者に関する疫学的調査をおこなった。その結果、genotype 3b のHCVを有する患者の多く(14例中11例[78.6%])が、ある診療所を受診した経験があるという事実が明らかとなった(110)。この診療所は現在はずでに閉鎖されており、診療を担当していた医師も他界している。この医師は東南アジアへの渡航歴があり、注射による治療をよく用いていたという患者の話などから、genotype 3bはこの医師を通じて東南アジアから日本へ伝播した可能性が考えられた。

次に、新たに全配列を決定したgenotype 3bとこれまでに報告された他のgenotypeとを比較してみると、ウイルスの増殖に関わると考えられる重要なエレメントは全て保存されていた。

まず、塩基配列に注目して、5' noncoding regionをみると、この領域ではgenotype間で高度に塩基配列が保存されており(123、129-135)、Internal Ribosome Entry Siteとしての機能を担っている(136-140)ことが知られているが、5'末端の17塩基の配列は、genotype 3bとgenotype 1、2では大きく異なっていた(図3)。しかしながら、その末端19塩基が形成するhairpin構造は、各genotype間できわめて類似しており、この構造がウイルスの増殖、あるいは保持に何らかの重要な働きを演じていると考えられた。さらに、3'末端の配列をみると、この部位に存在が想定されている3つのstem-loop構造(114)もほぼ同じ形で存在しており、同様になんらかの役割(例えばRNA-dependent RNA polymeraseの付着-複製開始など)を果たしていることが想定された。しかし、genotype 1a、1b、2a、2bで共通に存在する2カ所のin frame stop codonはgenotype 3bでは1カ所しか存在せず(115、116)、一方のstop codonは不必要なものであることが示された。

最近これまでに3'末端であるとされていたU-stretchのさらに3'側に約100塩基の保存性の高い領域が存在することが示され、3' X regionとして報告された(141-144)。genotype 3bに関しても、この領域は存在すると考えられる。この領域はRNA dependent RNA polymeraseがnegative strand RNAを合成する際の反応の開始点となっ

ている可能性が考えられ、HCVの増殖機構を解明する上でも重要であると考えられる。genotype 3b のHCV についてもこの領域の配列は他のgenotype との間でhomology が高く、想定される高次構造も保たれていることが報告された(144)。この症例ではこの部分の配列は決定していないが、同様の配列であることが予測される。

さらに、アミノ酸配列についてみると、genotype 1a、1b、2a、2b ではE1-E2/NS1 領域に15-16 カ所のN-glycosylation site (アミノ酸配列のNXS またはNXT) が存在することが報告されているが(20、32、33)、genotype 3b のこのisolate でも同じく16カ所のN-glycosylation site が存在した。また、von Heijne (111)の予測式に基づくsignal peptidase による認識部位もE1領域とE2/NS1領域の境界と、E2/NS1領域とNS2領域の境界とに認められた。さらに、Flavivirus およびPestivirus で共通にみられるtrypsin-like serine protease (112、113) で保存されているアミノ酸がやはりみられ、さらに、RNA ウイルスのRNA dependent RNA polymerase (114) で共通に保存されているアミノ酸も同様に保存されていた(図2)。これらの保存されているアミノ酸の存在は、genotype が異なっても、HCV がFlavivirus、Pestivirus と共通の増殖機構を利用して増殖していることを示している。しかしながら、各genotype 間でアミノ酸配列を比較すると、core、NS3、NS5B領域では比較的アミノ酸の配列が保たれていたが、E1、NS2、NS5A などではアミノ酸のhomologyがきわめて低かった。さらに、E2/NS1、およびNS5A の一部にはgenotype 間でアミノ酸のinsertion あるいはdeletion が集中している部位がみられ、これらの部位ではアミノ酸配列の相同性がきわめて低かった(図7)。さらに、genotype 間におけるアミノ酸のdeletion あるいはinsertion がきわめて限定された部位に集中していた(図8、9)。このようにhypervariable region 以外にアミノ酸の変化に富む部位が存在することの意義は現在のところ明らかでない。これらの部位の高度の変異が何らかの宿主の排除機構から逃避するためのものなのか、あるいはこのウイルスにおいて重要でないために変異が多いのかを今後明らかにする必要があると考えられた。さらに、hypervariable region も他のHCV genotype 同様に、このサブタイプにおいても存在していた。この部分の配列を見ると、全く同一の配列を有するcloneは僅か2 cloneのみであり、このRNA ウイルスのquasispecies nature をよく反映していた。このようなquasispecies からなるウイルスの配列は、一般的には数個のcloneの配列を比較し、頻度の高いものをそのウイルスの

配列としているのが通常である。しかしながら、本研究のようなウイルスの全配列を問題とする場合、果たして記されたような配列を有するウイルスが実際に存在するののかという疑問が当然生じる。これは1個のウイルスの全配列を決定するような技術が確立するまでは、quasispecies nature を有するウイルスの配列を解析する上ではやむを得ない技術上の限界であるといえよう。今後完全長のcloneを用いて、infectious clone を作製し得たなら、感染性を有する、当該ウイルスに極めて近いようなウイルスの実存を確認しうる手段となりうるであろう。

さらに、最近注目すべき話題として、Enomoto et al(145, 146), はインターフェロンの治療効果を規定する領域がNS5A 領域のアミノ末端側に存在することを見出し、Interferon Sensitivity Determining Region (ISDR) として報告した。この部位に注目して、genotype 3b と1a、あるいはgenotype 3bと2bとの間での配列の比較をみると、この部分のアミノ酸配列はgenotype によりかなり異なっており(図9)、genotype 間でアミノ酸のinsertion、deletion もみられる部位であった。なぜこのような保存性の高くない部位がインターフェロンの治療効果と深く関わっているのかは現在不明であり、今後究明すべき課題であるといえる。

さらに、今後解決すべき問題として、HCV の感染経路の究明とワクチンによる感染の予防の問題が存在する。筆者らは、HCV の感染経路の一つとして、配偶者間でのHCV 感染の有無を調べるために配偶者にHCV の感染が認められた患者及びその配偶者の血清からHCV RNA を抽出し、その配列を解析した(147)。その結果、解析した8組の夫婦のうち5組で塩基配列の相同性が有意に高く、また、これらの夫婦が他に感染の機会を共有していなかったため、夫婦間での感染が強く示唆されることを示した。しかし、これらの夫婦間感染の頻度は3%程度と低く、さらには輸血歴もなく、家族にもHCV 感染が認められないにも拘わらず、HCV に感染している症例もあり、このような症例の感染経路については現在のところ不明である。HCV のgenotype 解析、塩基配列の解析はこのような感染経路の究明にも有用な手段の一つと考えられる。

さらに、今後HCV に対するワクチンの開発を考えるときに、今回筆者が明らかにしたようなgenotype 間でのHCV の構造の違い(図8, 9)は重視すべき問題点であるといえる。特に、envelope の蛋白をコードしており、ワクチン戦略のターゲットとなると考えられるE1, E2/NS1 領域のアミノ酸配列がgenotype 間で非常に変異が多いという事実

はgenotype 共通のワクチンの開発が困難であることを予想させる。今後さらに未決定の genotype の全配列を決定し、各genotype 間で保存されている、免疫原性の高いドメインを見出し、多くのgenotype に有効なワクチンを作製して行く必要がある。

最後に、現在部分的な配列によりgenotype 分類がなされ、若干の混乱を来しているが、今後さらに世界に存在する多数のgenotype の全配列を決定し、phylogenetic な関係を明らかにし、明確なgenotype 分類を確立すれば、感染経路などの問題の解明にさらに貢献するものと期待される。

<まとめ>

1. 日本人患者から、新たなHCV genotype (3b またはTr)を見出し、その全配列 (3' X-region を除く) を決定した。
2. ウイルスの増殖に必要と考えられる特徴的な構造は他のgenotype と同様に genotype 3bでも保存されていた。
3. genotype 間でアミノ酸配列の保存性が極めて低く、insertion、deletion が集中している部位がE2/NS1、NS5A領域に存在することを明らかにした。
4. このような全配列の解析は明確なgenotype 分類法の確立、疫学的な研究、ワクチン戦略などにおいて重要と考えられた。

<文献>

- (1) Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-361, 1989
- (2) Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Denstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee W-S, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362-364, 1989.
- (3) Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028, 1973.
- (4) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A 'new' antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541-546, 1965.
- (5) Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 2: 838-841, 1975.
- (6) Knodell RG, Conrad ME, Ginsberg AL, Bell CJ. Efficacy of prophylactic gamma globulin in preventing non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1:557-561, 1976.
- (7) Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1:459-463, 1978.
- (8) Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20: 23-31, 1983.
- (9) 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* 185: 120-131, 1991
- (10) Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R,

Van Boven JJ, Winkel I, Mulder-Folkerts D, Exel-Oehlers PJ. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337: 317-319, 1991.

(11) Hsu HH, Gonzalez M, Fong SK, Feinstone SM, Greenberg HB. Antibodies to hepatitis C virus in low-risk blood donors: implications for counseling positive donors. *Gastroenterology* 101: 1724-1727, 1991. (12) Garson JA, Clewley JP, Simmonds P, Zhang LQ, Mori J, Ring C, Follett EA, Dow BC, Martin S, Gunson H. Hepatitis C viraemia in United Kingdom blood donors. A multicentre study. *Vox Sanguinis*. 62: 218-223, 1992.

(13) Farci P, London WT, Wong DC, Dawson GJ, Vallari DS, Engle R, Purcell RH. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *Journal of Infectious Diseases* 165:1006-1011, 1992.

(14) Ichimura H, Tamura I, Yamada O, Takezaki E, Koda T, Kurimura O, Kurimura T. Hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus antibody in the serum of patients with abnormal liver function. *Journal of Infection* 25: 47-53, 1992.

(15) Brown D, Powell L, Morris A, Rassam S, Sherlock S, McIntyre N, Zuckerman AJ, Dusheiko GM. Improved diagnosis of chronic hepatitis C virus infection by detection of antibody to multiple epitopes: confirmation by antibody to synthetic oligopeptides.

Journal of Medical Virology 38: 167-171, 1992.

(16) McCrudden EA, Welch S, Batchelor B, Allison MC, Dow B, Follett EA, Mills PR, Briggs JD. Hepatitis C virus infection detected by antibody tests and the polymerase chain reaction as a cause of liver dysfunction in renal transplant recipients. *Journal of Medical Virology* 42: 158-163, 1994.

(17) Tobler LH, Busch MP, Wilber J, Dinello R, Quan S, Polito A, Kochesky R, Bahl C, Nelles M, Lee SR. Evaluation of indeterminate c22-3 reactivity in

- volunteer blood donors. *Transfusion* 34: 130-134,1994.
- (18) Peters T, Mohr L, Scheiffele F, Schlayer HJ, Preisler S, Berthold H, Gerok W, Rasenack J. Antibodies and viremia in acute post-transfusion hepatitis C: a prospective study. *Journal of Medical Virology* 42: 420-427,1994.
- (19) Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Laufs R. Study on reliability of commercially available hepatitis C virus antibody tests. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 620-624,1995.
- (20) Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 87:9524-9528,1990.
- (21) Choo Q-L, Richman K, Han J. H., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby A., Barr P. J., Weiner A. J., Bradley D. W., Kuo G. & Houghton M. Genomic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 88 : 2451-2455, 1991
- (22) Han J. H., Shamala V., Richman K H., Brauer M, J., Irvine B., Urder M. S., Tekamp Olson P., Kuo G., Choo Q. L. & Houghton M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA : identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 8 : 1711-1715, 1991
- (23) Takamizawa A., Mori C., Fuke I., Manabe S., Murakami S., Fujita J., Onishi E., Andoh T., Yoshida L., & Okayama H., Structure and organization of the hepatitis C virus genome from human carriers. *Journal of Virology*, 65 : 1105-1113, 1991
- (24) Inchauspe G., Zebedee S., Lee D. H., Sugitani M., Nasoff M. & Prince A. M. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus :

- comparison with American and Japanese isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 88 : 10292-10296, 1991
- (25) Okamoto H., Kanai N., Mishiro S. Full-length nucleotide sequence of a Japanese hepatitis C virus isolate (HC-J1) with high homology to U. S. A. isolates. *Nucleic Acids Research*, 20 : 6410, 1992
- (26) Wang Y, Okamoto H, Tsuda F, Nagayama R, Tao QM, Mishiro S. Prevalence, genotypes, and an isolate (HC-C2) of hepatitis C virus in Chinese patients with liver disease. *Journal of Medical Virology* 40: 254-260, 1993.
- (27) Tanaka T., Kato N., Nakagawa M., Ootsuyama Y., Cho M. J., Nakazawa T., Hijikata M., Ishimura Y. & Shimotohno K. Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier : sequence variation within the same individual and among infected individuals. *Virus Research*, 23 : 39-53, 1992
- (28) Honda M, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, Murakami S. Sequence comparisons of a hepatitis C virus genome RNA isolated from a patient with liver cirrhosis. *Gene* 120:317-318, 1992.
- (29) Chen PJ, Lin MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ, Chen DS. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology* 188:102-133, 1992.
- (30) Hayashi N, Higashi H, Kaminaka K, Sugimoto H, Esumi M, Komatsu K, Hayashi K, Sugitani M, Suzuki K, Tadano O, Shikata T. Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *Journal of Hepatology* 17:94-107, 1993.
- (31) Okamoto H, Kojima M, Sakamoto M, Iizuka H, Hadiwandowo S, Suwignyo S, Miyakawa Y, Mayumi M. The entire nucleotide sequence and classification of a hepatitis C virus isolate of a novel genotype from an Indonesian patient with chronic liver disease. *Journal of General Virology* 75: 629-635, 1994.
- (32) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, 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. *Journal of General Virology* 72:2697-2704,1991.

(33) Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Iizuka H, Tanaka T, Fukada S, Tsuda F, Mishiro S. Full length sequence of hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188,331-341,1992.

(34) Chayama K, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. *Journal of General Virology* 75:3623-3628,1994.

(35) Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. in Field BN, Knipe DM, Howley PM (ed.). *Fields virology*:931-960, Raven Press, New York, 1996.

(36) Shimotohno K, Tanji Y, Hirowatari Y, Komoda Y, Kato N, Hijikata M. Processing of the hepatitis C virus precursor protein. *Journal of Hepatology* 22:87-92,1995.

(37) Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Rickman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo Q-L, Houghton M, Han JH. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180: 842-848,1991.

(38) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175:220-228,1991.

(39) Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Binono F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, Houghton M. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic infections. *Proceedings of the National*

Academy of Science U.S.A. 89: 3468-3472,1992

(40) Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, Munetaka E, Muchmore EE, Peterson DA, Mishiro S. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 195: 297-301,1993.

(41) Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Sarracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, Brunetto M, Barr PJ, Miyamura T, McHutchinson J, Houghton M. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89: 3468-3472,1992.

(42) Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, Shimotohno K. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189: 119-127,1992.

(43) Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 67:3923-3930,1993.

(44) van Doorn LJ, Quint W, Tsiquaye K, Voermans J, Paelinck D, Kos T, Maertens G, Schellekens H, Murray K. Longitudinal analysis of hepatitis C virus infection and genetic drift of the hypervariable region. *Journal of Infectious Diseases* 169: 1226-1235 1994.

(45) Sekiya H, Kato N, Ootsuyama Y, Nakazawa K, Yamauchi K, Shimotohno K. Genetic alterations of the putative envelope proteins encoding region of the hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis: humoral immune response to hypervariable region 1. *International Journal of Cancer* 57: 664-670,1994.

- (46) Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, Ohkoshi S, Nakazawa T, Hijikata M, Shimotohno K. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 68: 4776-4784, 1994.
- (47) van Doorn LJ, Capriles I, Maertens G, DeLeys, R, Murray K, Kos T, Schellekens H, Quint W. Sequence evolution of the hypervariable region in the putative envelope region E2/NS1 of hepatitis C virus is correlated with specific humoral immune responses. *Journal of Virology* 69:773-778, 1995.
- (48) Scarselli E, Cerino A, Esposito G, Silini E, Mondelli MU, Traboni C. Occurrence of antibodies reactive with more than one variant of the putative envelope glycoprotein (gp70) hypervariable region 1 in viremic hepatitis C virus-infected patients. *Journal of Virology* 69: 4407-4412, 1995.
- (49) Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 67: 4665-4675, 1993.
- (50) Grakoui AD, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 90:10583-10587, 1993.
- (51) Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hirowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohno T. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 90: 10733-10777, 1993.
- (52) Grakoui AD, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of Virology* 67:2832-2843, 1993.
- (53) Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required

- for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *Journal of Virology* 67:3835-3844, 1993.
- (54) Eckart MR, Selby M, Masiarz F, Lee C, Berger K, Crawford K, Kuo G, Kuo G, Houghton M, Choo Q-L. The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192:399-406, 1993.
- (55) Manabe S, Juke I, Tanishita O, Kaji C, Gomi Y, Yoshida S, Mori C, Takamizawa A, Yoshida I, Okayama H. Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* 198:636-644, 1994.
- (56) Kim DS, Gwack Y, Han JH, Choe J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215:160-166, 1995.
- (57) Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO Journal* 15:12-22, 1996.
- (58) Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 89: 5477-5481, 1992.
- (59) Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K. Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 206: 863-869, 1995.
- (60) Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titer infectious virus. *Journal of General Virology* 77:1043-1054, 1996.
- (61) Alter HJ, Purcell RH, Shin JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G.

Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine* 321: 1494-1500, 1989.

(62) Lee SD, Tsai YT, Hwang SJ, Wu JC, Yung CH, Cheng KK, Lo KJ. A prospective study of Post-transfusion non-A, non-B (type C) hepatitis following cardiovascular surgery in Taiwan. *Journal of Medical Virology* 33, 188-192, 1991.

(63) Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML, Realde G. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) posttransfusion hepatitis. *Journal of Hepatology* 16:273-281, 1992.

(64) Dienstag JL, Alter HJ. Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Seminar in Liver Disease* 6: 67-81, 1986.

(65) Tanaka E, Kiyosawa K, Nakatsuji Y, Inoue Y, Miyamura T, Chiba J, Furuta S. Clinical significance of antibodies to nonstructural and core proteins of hepatitis C virus in posttransfusion hepatitis patients during long-term follow up. *Journal of Medical Virology* 39: 318-324, 1993.

(66) Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, Onorato MDV, Ordinas A. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 21: 639-644, 1994.

(67) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, Houghton M. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12, 671-675, 1990.

(68) Brix J, Barrera JM, Calvet X, Ercilla G, Costa J, Sanchez-Tapias JM, Ventura M, Vall M, Bruguera M, Bru C, Castillo R, Houghton M. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 2: 1004-1006, 1989.

(69) Colombo M, Kuo G, Choo Q-L, Donato MF, Del Ninno E, Tommasini MA,

- Dioguardi N, Houghton M. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2: 1006-1008, 1989.
- (70) Kew MC, Houghton M, Choo Q-L, Kuo G. Hepatitis C virus antibodies in southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 335:873-874, 1990.
- (71) Japanese Red Cross Non-A, Non-B Hepatitis Research Group: Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet* 338: 1040-1041, 1991.
- (72) The Japanese Red Cross Hepatitis Research Group: The predictive value of screening tests for persistent HCV infection evidenced by viremia: the Japanese experience. *Vox Sanguinis* 65: 199-203, 1993.
- (73) Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Prucell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 88:3392-3396, 1991.
- (74) Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore E, Peterson D, Ito Y, Mishiro S. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2 year infection in chimpanzee; variability and stability. *Virology* 190:894-899, 1992.
- (75) Enomoto N., Takada A., Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 170,1021-1025, 1990.
- (76) Tsukiyama-Kohara, Kohara M, Yamaguchi K, Maki B, Toyoshima A, Miki K, Tanaka S, Hattori N, Nomoto A. A second group of hepatitis C viruses. *Virus Genes* 5:243-254, 1991.
- (77) Mori, S., Kato, N., Yagyu, A., Tanaka, T., Ikeda, Y., Petchclai, B., Chiewsilp, P., Kurimura, T. and Shimotohno, K. (1992) A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183, 334-342.
- (78) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Koida I, Ikeda K, Matsumoto T,

- Kobayashi M, Iwasaki S, Koyama S, Morinaga T, Kumada H. Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 8:150-156,1993.
- (79) Cha, T.A., Beall, E., Irvine, B., Kolberg, J., Chien, D., Kuo, G. and Urdea, M. S. At least five related, but distinct C viral genotypes exist. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89:7144-7148,1992.
- (80) Bukh, J., Purcell, R., H. and Miller, R., H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 90: 8234-8238,1993.
- (81) Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL., Kolberg J, Urdea MS, Holmes, EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *Journal of General Virology* 75:1053-1061,1994.
- (82) Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, Kishimoto J, Tsuda F, Lesmana LA, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotype in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *Journal of General Virology* 77: 293-301,1996.
- (83) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology* 74:2391-2399,1993.
- (84) Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Breshot C, Brouwer JT, Chan S-W, Chayama K, Chen D-S, Choo Q-L, Colombo M, Cuypers HTM, Date T, Dusheiko GM, Esteban JI, Fay O, Hadziyannis SJ, Han J, Hatzakis A, Holmes EC, Hotta H, Houghton M, Irvine B, Kohara M, Kolberg JA, Kuo G, Lau JYN, Lelie PN, Maertens G, McOmish F, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice C, Roggendorf M, Shalm SW, Shikata T,

Shimotohno K, Stuver L, Trepo C, Weiner A, Yap PL, Urdea MS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 19, 1321-1324, 1994.

(85) Tokita H, Shrestha SM, Okamoto H, Sakamoto M, Horikita M, Iizuka H, Shrestha S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. *Journal of General Virology* 75:931-936, 1994.

(86) Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 91, 11022-11026, 1994.

(87) Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Luengrojankul P, Vareesagthip K, Chainuvati T, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c,7d) and ninth (9b,9c) major genetic groups. *Journal of General Virology* 76:2329-2335, 1995.

(88) Sakamoto M, Akahane Y, Tsuda F, Tanaka T, Woodfield DG, Okamoto H. Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a. *Journal of General Virology* 75:1761-1768, 1994.

(89) Yamada N, Manihara K, Mizokami M, Ohba K-I, Takada A, Tsutsumi M, Date T. Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *Journal of General Virology* 75:3279-3284, 1994.

(90) Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lensniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, Purcell RH. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258, 135-140, 1992.

(91) Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A, Alter AJ, Purcell RH, Yoshikura H.

Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant virus. *Journal of Virology* 68, 1494-1500, 1994.

(92) Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 18:1319-1325, 1992.

(93) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Morinaga T, Kumada H. Effect of lymphoblastoid alfa-interferon in patients with chronic hepatitis C having different genotypic subtype of hepatitis C virus. *Gastroenterologia Japonica* 28(Suppl 5):45-47, 1993.

(94) Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Arase Y, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Kumada H. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 19:1088-1094, 1994.

(95) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Koida I, Morinaga T, Kumada H. High virus titer, slow virus decrease, genotype II, and sequence variability of E2/NS1 hypervariable region predict poor response to interferon therapy in chronic hepatitis C. Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T eds, *Viral Hepatitis and Liver Disease*: 617-620, Springer-Verlag, 1994.

(96) Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Iino S, Wang Y, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 42:299-305, 1994.

(97) Chayama K, Arase Y, Koida I, Tsubota A, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Kanda M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hashimoto M, Unakami M, Morinaga T, Kumada H. Antiviral effect of lymphoblastoid IFN-alpha on hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis type C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9:128-133, 1994.

- (98) Dusheiko G, Schmilovits-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap P-L, Sherlock S, McIntyre N, and Simmonds P. Hepatitis virus genotypes: An investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18,1994.
- (99) Chayama K, Tsubota A, Akase Y, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Hashimoto M, Kobayashi M, Kanda M, Morinaga T, Kumada H. Genotype, slow decrease in virus titer during interferon treatment and high degree of sequence variability of hypervariable region are indicative of poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis type C. *Journal of Hepatology* 23:648-653,1995.
- (100) Kohara M, Tanaka T, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka S, Mizokami M, Lau JYN, Hattori N. Hepatitis C virus genotypes 1 and 2 respond to interferon with different virologic kinetics. *Journal of Infectious Diseases* 172:934-938,1996.
- (101) Hashimoto M, Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Nakano A, Takagi K, Koike H, Okamoto K, Handa H, Kumada H. Typing six major hepatitis C virus genotypes by polymerase chain reaction using primers derived from nucleotide sequences of the NS5 region. *International Hepatology Communications* 4:263-267,1996.
- (102) 茶山一彰、熊田博光、斉藤聡、荒瀬康司、池田健次、酒井洋子、松本豊海、小林万利子、森永博。Nested polymerase chain reaction と Digoxigenin-labeled probe による C 型肝炎ウイルス RNA の高感度検出法と臨床応用。肝臓 32: 136-140,1990。
- (103) Chayama K, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Unakami M, Morinaga T, Kumada H. Effect of interferon administration on serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 13:1040-1043,1991.
- (104) Chayama K, Tsubota A, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y, Kobayashi M, Morinaga T, Kumada H. Quantitative analysis of hepatitis C

- virus RNA by competitive nested polymerase chain reaction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 8:540-44, 1993.
- (105) Frohman A, Dush K, Martin R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 85:8998-9002, 1988.
- (106) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 74:5463-5467, 1977.
- (107) Zucker M, Stiegler P. Optimal computer folding of larger RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research* 9:133-148, 1981.
- (108) Gojobori T, Ishii K, Nei M. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *Journal of Molecular Biology and Evolution* 18:414-423, 1982.
- (109) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Journal of Molecular Biology and Evolution* 27:189-204, 1987.
- (110) Ikeda K, Chayama K, Saitoh S, Koida I, Suzuki Y, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Murashima N, Kumada H. Hepatitis C virus subtype 3b infection in a hospital in Japan: epidemiological study. *Journal of Gastroenterology* 31:801-805, 1996.
- (111) von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research* 14:4683-4690, 1986.
- (112) Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171:367-369, 1989.
- (113) Moormann RJM, Warmerdam PAM, van der Meer B, Schaaper WMM, Wensvoort G, Hulst MM. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholea virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding

- envelope protein E1. *Virology* 177, 184-198,1990.
- (114) Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* 12: 7269-7282,1984.
- (115) Han JH, Houghton M. Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication. *Nucleic Acids Research*. 20: 3520,1992.
- (116) Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, Horikita M, Kojima M, Iizuka H, Mishiro S. Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *Journal of General Virology* 74:2385-2390,1993.
- (117) Stuyver L, Arnhem V, Wyser A, Deleys R, Maertens G. Analysis of the putative E1 envelope and NS4a epitope region of HCV type 3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192:935-941,1993.
- (118) Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Maki N, Ohta Y, Miki K, Mizokami M, Ohba K, Tanaka S, Hattori N, Nomoto A, Kohara M. Antigenecities of group I and II hepatitis C virus polypeptides-Molecular basis of diagnosis. *Virology* 192:430-437,1993.
- (119) Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Munakata E, Tanaka T, Akahane Y, Okamoto H, Mishiro S. Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core protein. *Hepatology* 16: 886-891,1992.
- (120) Bhattacharjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR, Kew MC, Conradie J, Lin CK, Masden H, Saeed AA, Parker D, Yap P-L, Simmonds P. Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C genotypes 1,2,3,4,5 and 6. *Journal of General Virology* 76:1737-1748,1995.
- (121) 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. *Journal of General Virology* 73:673-679,1992.

(122) Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *Journal of General Virology* 72:2105-2112,1991.

(123) 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 genotype and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *Journal of General Virology* 76:1197-1204,1995.

(124) Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborcht B, Van Hewverswyn H, Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and chracterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* 74:1093-1102,1993.

(125) 茶山一彰、坪田昭人、荒瀬康司、齊藤聡、池田健次、末澤美栄子、酒井洋子、松本豊海、小林万利子、森永傳、熊田博光。日本人患者から得られたC型肝炎ウイルスのNS5領域の塩基配列の検討。肝臓33:500-501,1992。

(126) 茶山一彰、荒瀬康司、坪田昭人、齊藤聡、鯉田勲、池田健次、岩崎里美、小山志真、松本豊海、小林万利子、森永傳、熊田博光。mixed primer を用いたpolymerase chain reaction によるC型肝炎ウイルスのサブタイプ分類の検討。肝臓33:805-806,1992。

(127) Greene WK, Cheong MK, Ng V, Yap KW. Prevalence of hepatitis C virus sequence variants in South-East Asia. *Journal of General Virology* 76:211-215,1995.

(128) Valliammai T, Thyagarajan P, Zuckerman A, Harrison T. Diversity of genotype of hepatitis C virus in southern India. *Journal of General Virology* 76: 711-716, 1995.

- (129) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 60: 167-177,1990.
- (130) Cha T-A, Beall E, Kolberg IJ, Chien D, Kuo G, Urdea MS. At least five related, but distinct, hepatitis C virus genotypes exist. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89:7144-7148,1992.
- (131) Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89:187-191,1992.
- (132) Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 89:4942-4946,1992.
- (133) Lee C-H, Cheng C, Wang J, Lumeng L. Identification of hepatitis C viruses with a nonconserved sequence of the 5' untranslated region. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1602-1604,1992.
- (134) Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan S-W, Lin CK, Ducheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions of sequence diversity. *Journal of General Virology* 74:661-668,1993.
- (135) Kleter GEM, van Doorn L-J, Brouwer JT, Schalm SW, Heijtkink RA, Quint WGV. Sequence analysis of the 5' untranslated region in isolates of at least four genotype of hepatitis C virus in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 32:306-310,1994.
- (136) Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal Ribosome Entry Site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* 66:1476-1483,1992.
- (137) Fukushi S, Katayama K, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Ando T, Oya A. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications 199: 425-432,1994.

(138) Le SY, Sonenberg N, Maizel JV. Unusual folding regions and ribosome landing pad within hepatitis C virus and pesti-virus RNAs. *Gene* 154: 137-143,1995.

(139) Wakita T, Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14205-14210,1994.

(140) Ali N, Siddiqui A. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *Journal of Virology*. 69: 6367-6375,1995.

(141) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215: 744-749,1996.

(142) Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of Virology* 70: 3307-3312,1996.

(143) Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology* 70: 3363-3371,1996.

(144) Yamada N, Tanihara K, Takada A, Yoriuji T, Tsutsumi M, Shomomura H, Tsuji T, Date T. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223: 255-261,1996.

(145) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *Journal of Clinical Investigation* 96: 224-230,1995.

(146) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein

5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine* 334: 77-81,1996.

(147) Chayama K, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Molecular Analysis of Intrapousal Transmission of Hepatitis C Virus. *Journal of Hepatology*

