

綜 説

## C型肝炎ウイルスの分子生物学と臨床

袖 山 健

信州大学医学部第2内科学教室

### Molecular Biology of Hepatitis C Virus and its Application for Clinical Medicine

Takeshi SODEYAMA

*Department of Internal Medicine,  
Shinshu University School of Medicine*

---

**Key words:** hepatitis C virus (HCV), HCV-RNA, molecular biology, hepatitis C  
C型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス RNA, 分子生物学, C型肝炎

---

#### I はじめに

肝炎ウイルスには現在A~E型が確認されている<sup>1)~4)</sup>。うちC型は血液を介して感染し、起因ウイルスゲノム発見前は非A非B (non-A, non-B: NANB) 型肝炎とよばれた<sup>5)</sup>。NANB型肝炎には、他に経口感染する型も存在し、その起因ウイルスは1983年に発見されE型肝炎ウイルス (HEV) と命名された<sup>6)</sup>。

血液を介して感染するNANB型肝炎は、長らく起因ウイルス解明の糸口が掴めず<sup>5)</sup>、慢性化率や肝硬変・肝癌への進展率が高い<sup>7)</sup>特徴をもつため原因究明が待たれていた。しかし、治療に関しては、1986年にinterferon (IFN) 治療の有効性が報告<sup>8)</sup>され、その後盛んに試行されていた。

1988年、Chiron社研究陣<sup>9)</sup>は、遺伝子工学的手法により、NANB型肝炎感染チンパンジー血液から遺伝子断片をクローン化し、HCV遺伝子の一部に相当するcDNAを得た。これは、その後判明したHCVゲノムの非構造遺伝子領域の一部に相当する。彼らはこれをC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) と

命名し、HCVに起因する肝炎はC型肝炎と呼ばれた。ウイルス粒子本体は未同定であったが、得られた遺伝子断片の一部を発現したペプチド (C100-3抗原) を用いて抗体検査が開発された<sup>10)</sup>。また、遺伝子断片を発現した蛋白の解析により、動物のペスティウイルス (豚コレラウイルスやウシ下痢症ウイルス等) や人のフラビウイルス (黄熱病ウイルス・デングウイルス・日本脳炎ウイルス等) との類似点が指摘され<sup>11)12)</sup>、これら類似ウイルスの構造からHCV前駆体蛋白構造が予測された。その後、逆転写酵素を用いた polymerase chain reaction (RT-PCR) 法<sup>13)</sup>によるHCV遺伝子RNAの検索や全塩基配列の決定が可能となり、複数の遺伝子型の存在も明らかとなった<sup>14)~17)</sup>。

HCVの解明は、粒子本体が不明のまま、分子生物学的に遺伝子の一部を捕え解析することで進展した。これはB型肝炎ウイルス (HBV) やA型肝炎ウイルス (HAV) の解明の過程と全く異なり、ウイルス学における新たな展開である。本稿では、HCVの分子生物学的側面を解説し、HCV感染症としての臨床面にも触れる。

---

別冊請求先: 袖山 健

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第2内科

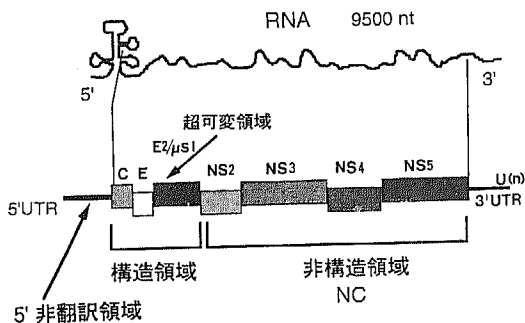


図1 HCV-RNA 遺伝子構成の模式図<sup>27)</sup>

5'UTR; 5'側非翻訳領域 (untranslated region : UTR)

構造領域 (structural region); 構造蛋白 (structural protein) 領域

C; コア (core) 領域, ナクレオカプシド (コア) 蛋白をコードする領域

E; E (envelope, E1) 領域, エンベロープ蛋白をコードする領域

E2/NS1; E2領域 (E2/NS1, NS1/E2領域); 第2のエンベロープ領域

非構造領域 (non-structural region : NS region); 非構造蛋白 (non-structural protein) 領域 NS2~NS5の各領域がある

3'UTR; 3'側非翻訳領域 (untranslated region : UTR)

(U)n; poly U tail

構造領域と非構造領域が1つの読み取り枠 (open reading frame : ORF) を形成する

## II HCVの遺伝子構造

### A HCVの遺伝子構成

HCVゲノムはプラス極性で約9,500塩基長の一本鎖RNAである(図1)<sup>11)</sup>。その95%を1つの大きな読み取り枠 (open reading frame : ORF) が占め、1つの前駆体ポリ蛋白をコードする。ORFの両側の5' (アミノ : N) 末端と3' (カルボキシ : C) 末端には、おのおの5'-, 3'-非翻訳領域 (untranslated region : UTR) があり、これらは特定の蛋白をコードしない。HCVゲノムやORFの長さは分離クローンにより異なる。ORFは9,030~9,099塩基 (3,010~3,033のアミノ酸残基) からなる<sup>19)</sup>。5'側非翻訳領域 (5'UTR) の長さはほぼ一定である。3'側非翻訳領域 (3'UTR) の3'末には、poly U tailの付加があり、クローンにより長さが異なる<sup>15)17)19)</sup>。

#### 1 ORFの構造

フラビウイルス、ペスティウイルスのORFと類似し、5'側にウイルス粒子を構成する構造蛋白 (structural protein) のコード領域、その3'側に非構造蛋白 (non-structural protein) のコード領域がある。構造蛋白領域 (structural region) 内には、HCV粒子のヌクレオカプシド (コア : 芯) 蛋白をコードするC (core) 領域、エンベロープ (被膜) 蛋白をコードするE (envelope, E1) 領域およびE2領域 (E2/NS1) が存在する。非構造蛋白領域 (non structural region : NS region) には、NS2~NS5の各亜領域がある。NS1領域は、当初非構造領域とされたが、E領域と同様に糖鎖結合可能部位を持ち、もう1つのエンベロープ領域であり<sup>20)</sup>、E2 (E2/NS1) 領域とよばれている。

#### 2 ORFより読み取られる蛋白

ORFから一旦生成された前駆体蛋白 (ポリプロテイン) は、肝細胞由来 signalase やウイルス由来 protease で切断され、少なくとも7つのウイルス蛋白となる。構造蛋白領域由来のものは、コア蛋白およびエンベロープ蛋白 (EないしE1, およびE2/NS1の2つ) に切断され、おのおのHCVのコア<sup>21)</sup>およびエンベロープを構成する<sup>22)</sup>。非構造蛋白領域由来のものは、おのおのNS-2, 3, 4および5の4つに切断され、NS4とNS5はさらにa, bの小部分に切断される<sup>23)24)</sup>。

#### B 5'非翻訳領域 (5'UTR)

5'UTRは約340塩基からなり<sup>25)</sup>、類似ウイルスの5'UTRより長い。塩基配列はペスティウイルスとは相同性が高く構造も類似するが、フラビウイルスとは異なる。5'UTRはHCV各クローン間で塩基配列の相同性が高く、PCR法でcDNAを分離する際にこの領域内よりプライマーを作製すると効率よく分離可能である<sup>19)25)</sup>。5'UTR内にはATGが3~5個あり、短いORFの開始部位となりうる。また、数カ所に「逆向き繰り返し (Inverted repeat : IR)」配列がある<sup>26)27)</sup>。この構造から、HCVの蛋白合成の開始部位が、5'UTR末端のATGのみではなく、5'UTR内にも存在しうるとされる<sup>27)</sup>。また、ヘアピンループを作る配列があり、種々の高次構造を取る可能性がある<sup>28)</sup>。

#### C 構造領域 (structural region)

##### 1 コア蛋白領域 (C領域)

190アミノ酸残基からなる。コア蛋白は分子量が22 kDでp22ともよばれ、きわめて塩基性に富み糖鎖の付加はない<sup>21)</sup>。C領域の塩基配列はHCV各クローン間でよく保存されている。コア蛋白は、ウイルスゲノ

ムである HCV-RNA と複合体を形成し、ヌクレオカプシドとして粒子を形成する。また3' (C) 末端側の疎水性の強い部分は細胞膜成分と結合すると推定されている。コア蛋白に対する抗体 (コア抗体) は、C型肝炎患者血清中に高率に検出される。コア領域の3'側を除去した cDNA からの発現蛋白も同じ抗原性を持つことより、コア抗原のエピトープ部分は5' (N) 側にあるとされる<sup>22)</sup>。

## 2 エンベロープ蛋白領域 (E ないし E1領域)

190アミノ残基からなり、エンベロープ蛋白 E1 (gp35) をコードする<sup>22)28)</sup>。HCV 各クローン間の変異が著明である。糖鎖結合可能部位が5~6カ所にある。発現蛋白には糖鎖の付加があり<sup>29)</sup>、その程度はクローンにより異なる。E1蛋白に対する抗体はC型肝炎患者に検出される<sup>30)</sup>。抗E1抗体は一部の患者では肝機能の改善に一致して検出され、HCV-RNA の排除を伴う。しかし、全C型肝炎患者の本抗体検出率は20%以下で、肝機能の改善と必ずしも対応しない<sup>31)32)</sup>。

## 3 E2/NS1領域

第2のエンベロープ蛋白領域で、細胞膜と結合性の高い蛋白をコードする<sup>32)33)</sup>。11の糖鎖付加部位があり、動物細胞での発現実験で分子量約60~70kDの糖蛋白が同定されている<sup>29)</sup>。HCV 粒子形成に際し、E2/NS1発現蛋白はE1発現蛋白とヘテロダイマーを形成し被膜上に表出する<sup>22)</sup>。この領域は、ベスティウイルスのE2領域、フラビウイルスのNS1領域に対応する。両ウイルスでは、その発現蛋白は感染細胞表面に表出し、対応抗体は感染防御に関係している可能性がある<sup>32)</sup>。

この領域内には、きわめて変異性に富む超可変領域 (hyper variable region: HVR) がある<sup>34)</sup>。E2/NS1の5'側端に存在する25~30アミノ残基の垂領域 HVR 1である。遺伝子型がIb型のHCVには、さらにもう1つ変異の激しい領域がある。HVR 1領域の3'側より存在する短い部位で、HVR 2とよばれる。HVRは、クローン間や同一クローン内の変異、および経時的変異が激しい<sup>31)35)</sup>。

E2/NS1領域、殊にHVR1の発現蛋白に対する抗体 (E2抗体) はC型肝炎患者に高率に検出される。抗E2抗体が中和能を持ち免疫学的選択に関与することが指摘されている<sup>36)~37)</sup>。また、E1/E2由来蛋白をチンパンジーに接種した後のHCV感染実験で、vaccineとしての感染予防効果をもつことが示されてい

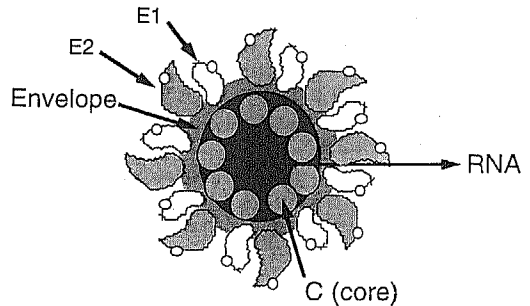


図2 HCVの構造 (想像図, Mishiroら<sup>40)</sup>による; 1994 ISVHLD, Japan)  
C (core); ヌクレオカプシド (コア)  
E1, E2; エンベロープ上の E1, E2領域発現蛋白

る<sup>38)</sup>。

## D 非構造領域 (non-structural region: NS region)

NS2~NS5領域に細分される<sup>11)18)</sup>。NS2領域がコードする蛋白は疎水性が強いが、生物学的機能は不明である。NS3領域の5', 3'側は、おのおの protease, helicase をコードし、NS3由来 protease は前駆体ポリ蛋白の切断に関与する<sup>39)</sup>。

前駆体ポリ蛋白の切断部位は、E2とNS2, NS2とNS3, NS3とNS4, NS4とNS5, の各領域の境界にあり<sup>39)</sup>、さらにNS4, NS5内部の切断によりNS4aとNS4b, NS5aとNS5bに分かれる<sup>24)</sup>。NS4aとNS4bは、疎水性が強く細胞膜に親和性を持ちうるが、機能は不明である。NS5内のNS5bは、ウイルス増殖に必要なRNA依存性RNA-polymeraseをコードする。NS3由来 helicase や他の非構造蛋白と協調して作用するとされる。

NS5aとNS3の発現蛋白は可溶性蛋白と考えられ、HCV感染肝細胞内で細胞質にび慢性に存在し<sup>24)</sup>、かつ血清中にも検出される。他の蛋白は強い疎水性を持ち、小胞体の膜に関連して検出される。

## E 3'非翻訳領域 (3'UTR)

27~45塩基配列の後に、10~100塩基の poly U tail が付加している<sup>14)18)</sup>。クローン間の遺伝子配列の保存性が低く、poly U tail の長さも異なる<sup>17)18)</sup>。欧米の遺伝子型Ia型のHCVにはpoly A tailの付加が報告されている<sup>29)</sup>が、日本で分離同定されたIa型ではみられない。

生体内でのHCV-RNA複製に際し3'末端は読み取り開始部位となるが、3'UTRの塩基配列による一次

構造は保存性が低く不利である。この点から、二次構造が重要な意味を持つことが示唆されている。フラビウイルスやペステivirusと異なる特徴であり、核酸複製機構の特殊性が示唆される。

### III HCV の構造

HCV 粒子は、被膜を被り、中に RNA とコアをもつと推定されている。図 2 に諸家の報告や類似ウイルスの構造をもとにした HCV の想像図を示す。

C 型肝炎患者の血液をチンパンジーに接種した感染実験<sup>40)</sup>では、ヒト血液中の感染性 HCV 粒子数はきわめて少ない。また、感染実験が可能な培養細胞はある<sup>30)</sup>が、HCV 増殖に適した培養細胞系は未開発である。このため、HCV 粒子の視覚的確認は困難であった<sup>29)41)</sup>。しかし、最近 HCV 粒子の電子顕微鏡像が報告されている<sup>42)</sup>。

### IV HCV 遺伝子の多様性

類似ウイルスでは複数の型が存在することから、HCV にも異なる型が存在する可能性が HCV 遺伝子の発見当初より指摘されていた<sup>11)12)14)</sup>。その後次々に HCV 遺伝子断片が分離されたが、塩基配列はクローンごとに少しずつ相違していた<sup>14)-18)26)</sup>。この違いの検討により、HCV には 4~6 の遺伝子型があること<sup>17)</sup>、また同一型でも遺伝子領域ごとに塩基配列の相違がみられることが判明した。さらに、1つのクローンの塩基配列が経時的に変異し、クローン構成の多様性形成

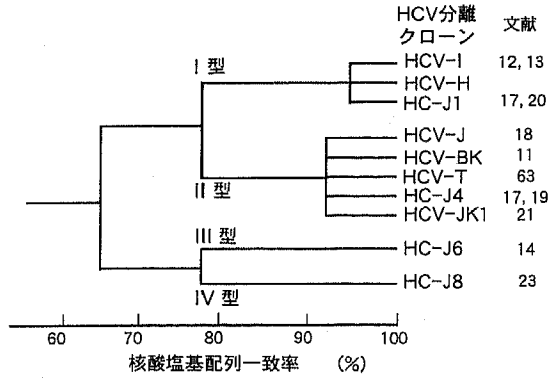


図 3 HCV の分子系統樹 (文献23)より改変引用)

もみられる<sup>20)</sup>。この多様性は HCV 感染の特徴であり、臨床的に重要な意味を持つ。

#### A 遺伝子型とその分類

1992年までに10クローン以上の HCV 株の全塩基配列が決定された<sup>14)-19)</sup>。Okamoto ら<sup>18)</sup>はこれらの前駆体蛋白のアミノ酸配列を比較し、少なくとも 4 型に分類可能であることを示した。その成績を図 3 に分子系統樹で示す。全塩基配列について核酸レベルの一致率は、HCV-1, -H, HC-J1 の 3 株間では約 95%、また HCV-J, -BK, -T, -JK1, HC-J4 の 5 株間では 92~93% であり、分子進化的にはおのおの同じグループに属すると判定できる。一方、前者 3 株と後者 5 株との間の一致率は 79% と低値で、互いに別のグループに属することが示唆される。HC-J6, HC-J8 は、相互の

表 1 HCV の遺伝子型の新分類と NS-5 領域における遺伝子配列の相同性 (文献44)より改変引用し、岡本らの分類 I~IV と対比した)

新名称	旧名称		相同性 (%) ; NS-5 の 7975~8196 番の塩基											
	Okamoto ら	Simmonds ら	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	4a	5a	6a	
1a	I	1a	96											
1b	II	1b	80	94										
1c	NC	NC	83	77	95									
2a	III	2a	62	63	66	92								
2b	IV	2b	64	66	67	79	93							
2c	NC	NC	63	63	64	81	79	92						
3a	V	3	67	66	65	62	64	62	95					
3b	NC	NC	67	71	69	63	66	62	78	99				
4a	NC	4	66	62	65	61	63	62	64	68	88			
5a	NC	NC	69	70	69	65	66	63	65	69	65	96		
6a	NC	NC	66	65	62	65	65	64	64	62	66	67	NA	

NC ; not classified, NA ; not available, Okamoto ら<sup>18)</sup>, Simmonds ら<sup>43)</sup>

一致率76%, 前述の2群との一致率68~67%で, おのおのさらに異なるグループと考えられる。以上より, 一致率79%未満を基準にし, 分子進化的に4つのグループ(遺伝子型), I型, II型, III型, IV型に分類することができた。

現在は少なくとも6種類の遺伝子型の存在が知られ, 新しい名称も提案されている(表1)<sup>43)44)</sup>。

この分類は, 大きなグループ(群)1~6, およびサブグループa~cに整理されている。そのおのな4種類は, 1群のaとb, および2群のa, bであり, おのおのOkamotoらの分類I, II, III, IV型に相当する。

各型のORFは, I, II型はおのおの9,033塩基, 9,030塩基, III型とIV型は9,099塩基で, おのおの3,011, 3,010, 3,033のアミノ酸からなるポリ蛋白をコードする<sup>19)</sup>。HCV型判定に際し, HCV-RNAの全塩基配列を決定するとすれば大変な作業量となる。そこで, C領域由来の型特異的プライマーを用いたPCR法による型分類法が開発された<sup>45)</sup>。C領域におけるHCV各型間の塩基配列一致率は, 核酸, アミノ酸レベルでおのおの80%, 90%以上であり, かつコドン第3文字の変異が少ない。この特徴を利用して, 共通プライマーによるfirst PCRの後に, 同一領域内由来でHCV型ごとにおのおの長さの異なる型特異的プライマーを用いてsecond PCRを行い, 反応産物の長さの違いからI~IV型を判別するものである。

なお, C領域の17残基よりなる2種類の合成ペプチドを用いると, I, II型に対応する血清型のGroup-1, およびIII, IV型に対応する血清型のGroup-2, の2グループに分類可能である<sup>46)</sup>。Tanakaら<sup>47)</sup>も, NS4領域に由来し遺伝子型に特異的な性質をもつC-14-1と, C-14-2の発現蛋白を用い, 血清学的なグループ分類を行っている。血清学的方法は酵素標識抗体法(ELISA法)で行え, 容易で多数検体の迅速処理ができ, HCV-RNAが検出不可でも抗体陽性なら型判定が可能である。

遺伝子型に関する研究成果より, 地理的な分布の違い, 複数のHCV型の重複感染例の存在<sup>48)</sup>, 感染源の同定での有用性, C型肝炎の病態, 特にIFN治療効果との関連, 等が明らかにされている<sup>49)50)</sup>。

## B 各遺伝子領域内の多様性

HCVの型やクローンにより塩基配列やアミノ酸配列に相違があるが, その程度は遺伝子領域により異なる。塩基配列の変異が最も低いのは5'UTRで, 次に

C領域やNS3領域である。一方, 最も激しい変異を示すのはE2/NS1領域のHVRで, E1, NS4, 3'UTRも変異度が高い。

5'UTRは最も保存性が高く, HCV型間での塩基配列の相違は2~8%程度である。相違する部位は数カ所に偏在する傾向がある<sup>25)</sup>。3'UTRは, 5'側の約40塩基の配列がHCV型により異なりその相違は21~74%に及ぶが, 同一型内では2~9%の相違である<sup>17)19)</sup>。3'UTRには内部に2つの終止コドンが存在し, この間の塩基数はI型とII型は9塩基, III型とIV型は12塩基と異なる。3'末のpoly U配列はHCV型により長さに差がある<sup>14)~18)</sup>。なお, I型に属するHCV-1ではpoly A配列である<sup>29)</sup>が, 同じI型のHC-J1ではpoly U配列である<sup>17)19)</sup>。

ORFの中ではC領域が最もよく保存され, そのアミノ酸配列は同一HCV型内では98%以上一致する。各HCV型間での一致率は90~98%で, 相違は最大10%に過ぎない<sup>19)</sup>。エンベロープ領域(E1, E2/NS1)は, 各HCV型間での塩基配列の保存度は低く<sup>31)34)37)</sup>, E1領域の一致率は51~79%, E2/NS1領域も50~79%である。一方, 同一型内では, E1領域, E2/NS1領域の相違はおのおの6~7%, 7~13%に過ぎない。しかし, この領域内の亜領域であるHVRは塩基配列の保存度がきわめて低く, 同一型内でも著しい変異を示す。E2/NS1領域の配列からHVRを除いて比較すると, 同一型内での相違は数%低下し4~10%程度となる<sup>19)</sup>。HVRは中和抗体のエピトープを含むことが示唆されているが, 急激に変異する特性があることからHCVの感染防御を考える上で難点となる<sup>35)37)</sup>。

非構造蛋白領域の塩基配列の相違は, 同一HCV型内では10%以下である。しかし, 異なる型間では領域ごとに相違の程度が違い, NS3領域では8~20%, NS2領域ではE1領域の変異率に匹敵する23~44%, NS4とNS5領域はおのおの9~28%, 16~31%である。NS5bは比較的保存性が高い<sup>19)</sup>。

## C 1つの個体内における多様性

1人のHCV感染患者から抽出したHCV-RNAでも異なる塩基配列が検出される。すなわち, 複数クローンの存在, 1クローン内の塩基配列の多様性や, それらが経時的に変化する現象, 等がみられる<sup>51)</sup>。これはRNAウイルス一般の特徴で, その機序は以下のごとく推定されている。1輸血後肝炎の如く大量の汚染血液による感染では, 多種類のクローンが同時に侵入し感染初期から多様性を示しうる。2少量の汚染血

液による感染では、最初は1種類の単一クローンであるが、経過とともに変異株が出現して蓄積し多様性を示す<sup>51)</sup>。すなわち、遺伝子変異により変異株が移り変わる (genetic drift) 現象がみられる。単一宿主内でクローンが多様で不均一となった状態は quasi-species とよばれる<sup>52)</sup>。HCV 持続感染例でのクローンの多様性にはこれら2因子の関与が推定されている。

持続感染例における HCV 遺伝子の変異率は、II 型 HCV (HC-J4株) 感染チンパンジーの成績では8.2年間で9,412塩基中111塩基 (1.2%) に置換がみられ、1塩基、1年当たり $1.44 \times 10^{-3}$ と推定されている<sup>51)</sup>。また、I 型 HCV (HCV-H 株) 感染ヒトでは13年間で4,923塩基中123塩基 (2.5%) に置換を認め、 $1.92 \times 10^{-3}$ /塩基/年と推定されている<sup>20)</sup>。この変異速度は遺伝子領域ごとに異なり、HVR ではさらに約10倍高率に変異し、HIV (human immunodeficiency virus) のエンベロープ遺伝子の変異率にも匹敵する<sup>35)36)</sup>。

HVR1発現蛋白に対する抗体 (E2抗体) はC型肝炎患者に高率に検出される<sup>36)</sup>。そして、HVR1にはB細胞に対するエピトープが存在することが示唆されており、またE2抗体はその抗原が由来するクローンに対して中和能を有することが証明されている。宿主の産生するE2抗体により対応するHCVクローンは排除されうる<sup>35)36)</sup>のである。これは、肝炎の経過中に特定の遺伝子配列のHVR1領域を持つクローンに対する宿主の免疫学的排除反応が常に起こり、新たにHVR1領域が変異した別のクローンが増殖することを意味する。かかる免疫学的選択の結果HVRは急速に変異し、新しい変異株 (escape mutant) が生まれクローンの様相が常に変化していく。この変異株生成とクローン多様性は、感染持続に密接に関連する<sup>31)</sup>。

## V HCV と肝炎

当教室の成績をもとに、C型肝炎の臨床面について概説する。HCVはNANB型肝炎の65% (輸血後の95%、散発性の50%以上) の原因であり<sup>7)53)54)</sup>、成人の初感染でも慢性化傾向が強く、肝硬変や肝癌と密接に関連する<sup>7)54)</sup>。

### A HCV 感染検出法

HCV 感染の検出は、HCV 抗体検査あるいはHCV-RNA 検出による<sup>42)49)55)</sup>。おもな検査法とHCVの遺伝子産物との関係を図4に示す。

HCV 抗体検査は、HCV 遺伝子より遺伝子工学的

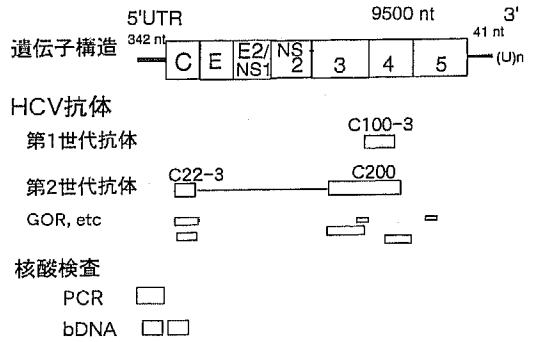


図4 HCV 関連検査法と HCV-RNA 由来遺伝子産物の関係

に作製された蛋白や合成ペプチドを抗原とし、宿主が産生する血清中の感染抗体を検出する<sup>10)</sup>。当初は、第1世代のC100-3抗体検出系が用いられた。その後、C領域およびNS3領域の産物を含む第2世代のHCV抗体測定系が開発された。本抗体検出は間接的にHCV存在を示唆するものであるが、HCVの存在を概ね反映する。特に肝障害例ではHCVの存在とよく一致する。しかし既往感染での弱反応例がある。HCV抗体測定系にはこの他に、遺伝子型検出に使われるC14抗体等、目的に応じた測定系がある。コア抗体の1つであるC-11抗体の力価はHCVの増殖度を反映する<sup>50)</sup>。

より直接的にHCVの存在や増殖状態を証明するには、HCV-RNAの検索・定量を行う<sup>49)</sup>。血中HCV粒子量がきわめて少ないため、HCV-RNA検出にはRT-PCR法が用いられる。HCV-RNAを抽出、逆転写によりcDNAとした後に、PCR法により数百万倍に増幅し検出するものである。検出感度が高く、数コピーのHCV-RNAの検出も可能であるが、操作が煩雑な欠点がある。主として、核酸配列が良く保存されている5'UTRの塩基配列がプライマーとして用いられる。定量には、competitive RT-PCR法が用いられる。

近年開発された branched DNA probe (bDNA) 法<sup>57)</sup>は、人工的に合成した多数の分枝をもつDNAを用い、血清より抽出したHCV-RNAと hybridize させ、感度をあげてHCV-RNAを検出する方法である。低力価のHCV-RNAは検出不可能である。C型慢性肝炎例ではbDNA法の陽性率は72.4%で、PCR法の99%に比べると感度はやや低い。しかし、PCR法による成績とよく相関し、操作が比較的簡便で多数検体

の一括測定が可能である。IFN 治療効果の予測などに臨床応用が期待され、1994年10月より保険診療で使用されている。

遺伝子型検査法には、PCR 法と血清学的方法がある。前者は、C 領域や NS5 領域の塩基配列の違いを PCR 法で検出する。後者は遺伝子型特異的発現蛋白を用いた型特異的抗体を ELISA 法で血清学的に判定する方法で、サブグループ判定はできないが簡便である。

C 型急性肝炎における HCV 関連マーカーの推移は次のごとくである。第 1 世代 HCV 抗体は出現時期が遅く、検出率は発症後 1, 3, 6 カ月で 17, 65, 78% と低い<sup>58)</sup>。第 2 世代 HCV 抗体は早期から高率に検出され、検出率はおのおの 70, 90, 98% であり診断能が高い。HCV-RNA は発症初期から 98% と高率に検出され、慢性化例ではその後も持続する。C 型慢性肝疾患においては、第 1 世代 HCV 抗体陽性率は 80~90% であるのに対し、第 2 世代 HCV 抗体は 95~100% の陽性率で PCR 法の成績とほぼ同等である<sup>58)</sup>。最近では第 2 世代 HCV 抗体がおもに使用されている。なお、C-11 抗体の抗体価は HCV の増殖を反映するため HCV 存在の判断の一助となり、既往の HCV 感染との鑑別診断等に有用である<sup>59)</sup>。

## B HCV 感染の疫学

本邦一般人集団では、第 2 世代 HCV 抗体陽性率は約 1.2~1.9% である<sup>59)</sup>。小児では 0.2% ときわめて低率であるが<sup>59)</sup>、加齢とともに高率になり 40~50 歳代では 2~3% である<sup>54)</sup>。国内の所々に HCV 抗体陽性率が高い地域があり、長野県内の某地区では 33% に達する<sup>60)</sup>。

急性ウイルス肝炎例に占める C 型の比率は、当教室の 1985 年から 9 年間の成績では、輸血後例では 88%、散発例では 30% であった<sup>54)</sup>。1989 年 11 月以後日赤血液センターの HCV 抗体スクリーニング開始以降、輸血後 C 型肝炎は激減し、われわれもこの 1 年間新規発生を経験していない。不思議なことに、散発性 C 型肝炎の新規発生も激減している。

ウイルス性慢性肝疾患に占める C 型の頻度は、慢性肝炎で 65%、肝硬変で 59%、肝細胞癌で 60% である<sup>54)</sup>。本邦の肝細胞癌死亡者数は、1970 年は 9.5 人/人口 10 万人で、C 型が 60% を占めた。その後、1985 年には 16 人/10 万人を超え、C 型の占める比率が 75% に増加した。現在でも HCV 起因の肝細胞癌は増加の一途を辿っている<sup>7)54)61)</sup>。C 型慢性肝疾患は男性に優位で、40~60 歳代以降が多く、平均年齢は B 型慢性肝疾患よ

り約 13 歳高齢である。特に肝硬変・肝細胞癌は 60 歳前後ないしそれ以降に高率となる。輸血率は約 40~48% にみられる<sup>53)54)61)</sup>。なお、HCV 遺伝子型には地理的な分布の違いがみられるが、我が国における C 型肝炎の起因 HCV の遺伝子型は II 型が約 70% を占め、残りが III 型と IV 型であり、I 型はきわめて少ない。欧米で I 型が高率であるのと異なっている。

従来、我が国のアルコール多飲者には慢性肝炎がみられ、肝癌の発生も多いことが報告されていた。これはアルコールが引き起こす肝病変の病態・機序を考案する上で重要であった。過去の教科書の一部には「我が国のアルコール多飲者の肝障害には、ウイルスによる慢性肝炎と同様の組織像を呈するものが存在し、細胞性免疫の機序が推定される」との内容が記載されていた。アルコール多飲歴をもつ慢性肝炎・肝癌症例を HCV 感染の面から再検討すると、HCV-RNA が 90~80% と高率に検出され、肝病変は HCV 感染に起因すると考えられる<sup>62)</sup>。また、アルコール多飲者の肝硬変例では、その約 4 割は HCV 感染に起因することが判明した。一方、アルコール多飲者でも、肝障害のない人のみならず、脂肪肝・肝線維症・急性アルコール性肝炎では HCV 感染は健常者と同率であり、その病因はアルコールのみと考えられる。アルコール多飲者で慢性肝炎、肝癌の病像を呈する例の大多数と、肝硬変例の半数弱は、病因診断が誤っていたと推察される。これらの症例では真の主要原因がアルコールではなく HCV であったものと理解されるに至った。かかるアルコール多飲者で HCV 感染が高率である理由は不明である。

自己免疫性肝炎には 14% に HCV 抗体陽性例がみられるが、HCV-RNA 陽性例は 7.1% と低率である<sup>63)</sup>。HCV-RNA 陰性症例での HCV 抗体の検出は、免疫反応に関連した疑陽性であり、自己免疫性肝炎は C 型肝炎とは異なる独立した疾患単位 (Type I) と考えられる。しかし近年、HCV 感染が自己免疫性肝炎を引き起こしうることが示唆され、HCV-RNA 陽性の自己免疫性肝炎は Type II b として分類研究されている。

HCV の感染源は HCV キャリアの血液であり、HCV を含む血液、血液を混入した体液、血漿製剤、等を介して感染する。主要な感染の機会・経路<sup>54)59)60)</sup>は、医療上の観血的行為に関連し、輸血、血漿製剤の静注、透析、汚染医療器具の再使用 (含; 民間医療<sup>60)</sup>)、等である。医療従事者の汚染針事故による感

染率は、1.2～1.4%と低率で<sup>64)</sup>、汚染源のHCV量との関連がある<sup>65)</sup>。その他、経静脈的麻薬乱用、入れ墨、鍼治療、等である。母子間垂直感染や乳幼小児期の感染<sup>66)</sup>、性交感染は頻度が低い<sup>66)</sup>。しかし、感染経路を特定できないものが約半数にのぼる。

### C 肝細胞障害発生の機序

C型肝炎における肝細胞障害の発生には細胞性免疫学的な機序が関与する。また、HCVにより肝細胞のアポトーシスが促進されることが指摘され、アポトーシスを介する直接的肝細胞障害の関与も考えられている<sup>67)</sup>。免疫学的機序については、C型慢性肝炎患者の末梢血リンパ球をHCV関連抗原で刺激する実験系で証明されている。すなわち、core領域、E1領域、およびE2/NS1領域の発現蛋白に対するリンパ球増殖反応試験では、GPT高値例は、健常者やGPT値正常の例に比べていずれも有意に高い反応を示す<sup>68)</sup>。これは、肝細胞障害発生にHCV特異的細胞性免疫学的機序が介在することを示唆する。

### D HCVキャリアの成立と経過

C型急性肝炎は慢性化しやすい。当教室の成績では輸血後例の73.6%、散発例の54.5%が慢性肝炎に移行している<sup>69)70)</sup>。これはHCVが高率に持続感染化＝キャリア化することを意味し、ウイルス側にその要因がある。HCVは被膜を持つRNA型ウイルスであり、その被膜をコードする遺伝子の変異率が高いことに由来すると推定される。

肝炎発症に際して生じる宿主の免疫学的排除反応により、おもなクローンは排除され一過性にHCV量は低下する。しかし経過中にHCV遺伝子のHVRが著しく変異し、宿主の免疫学的排除反応から逃れたクローンが出現する。かかる免疫学的選択を受けた変異株は出現後長期にわたり肝細胞で増殖を続けるため、宿主は持続感染化しキャリアに移行する<sup>30)</sup>。慢性肝炎の経過中にも宿主の免疫学的反応による肝細胞障害は持続し、HCVの免疫学的選択が繰り返される。しかし、常に新たな変異株が出現・増殖する<sup>45)</sup>ためHCV感染が終息することはきわめてまれである<sup>69)</sup>。

以上のごとく、C型慢性肝炎は、HCV持続感染肝細胞に対し宿主の免疫機序による肝障害を繰り返す病態で、HCV感染が持続する限り治癒は期待できない。また、たとえ緩徐であっても肝病変は進行性であり、その予後は楽観できない。C型慢性肝炎を平均約9年経過観察した当教室の成績<sup>61)69)70)</sup>では、HCV-RNAが陰性化しGPT値が正常化した例は1.8%にすぎない。

53%は肝硬変に移行し、23%に肝癌の発生を認めた。生命表で解析すると、平均13年の経過で45%が肝硬変に、その後25%は肝細胞癌へ進展し、20年弱で半数が肝硬変・肝癌に進展すると予想される<sup>61)</sup>。なお組織学的にみると、肝硬変進展例の75%は慢性活動性肝炎より進展している。特に組織学的に強いpiecemeal necrosis, bridging necrosisの存在は小葉の改築を来し、肝硬変を招来する。また、非活動性の症例でもHCVの増殖は持続しており、長い年月の経過後に活動性へ移行すると考えられる。

### E HCV-RNA量およびHCV遺伝子型

C型慢性肝炎患の組織学的進展度とHCV-RNA量とは関連がみられる。肝硬変や慢性活動性肝炎(CAH)のHCV-RNA量は、慢性持続性肝炎(CPH)のそれに比べ高値である。肝病変の進展に伴いHCV-RNA量は増加している<sup>49)</sup>。また、組織学的進展に伴いgroup 2型HCV起因例の頻度が減少する傾向があり、HCV遺伝子型と肝病変の進展速度との関連が示唆される<sup>60)</sup>。なお、HCV-RNA量と遺伝子型との間にも関連がみられ、group 1型HCV感染例は、group 2型感染例に比べてHCV-RNA量が有意に高値であるとする報告もある<sup>49)</sup>。

C型慢性肝炎の予後決定因子を、肝硬変・肝細胞癌への進展の面から多変量解析で検討すると、年齢、HCV遺伝子型、性の3因子が有意に関与する。他に組織学的進展度、HCV-RNA量、経過観察期間も関与している<sup>61)</sup>。HCVの性格がC型慢性肝炎患の病態や予後に密接に関連しているのである。

### F C型肝炎の治療

C型肝炎の終末像は肝硬変・肝細胞癌である。これらは非可逆的であり、治癒を目的とする治療は慢性肝炎の時点に行う必要がある。C型慢性肝炎の病因はHCVの持続感染であり、感染が持続する限り自然治癒は期待できない。したがって、C型慢性肝炎の病因論的治療の原則は、HCVの増殖抑制、感染の終息促進である。これにより活動性の慢性肝炎を非活動性の状態に改善させるのである。この目的で $\alpha$ 、 $\beta$ 型IFNが抗ウイルス剤として用いられている。最長6カ月間の投与で、その著効率は30～40%である。必ずしも十分な有効率とはいえず、最善の投与方法は現在なお明確でないが、自然治癒不可能な病態に対する治療の道が開かれた。

当教室の治療成績<sup>71)</sup>の一部を以下に示す。C型慢性肝炎72例に対し、recombinant IFN  $\alpha$ 2a 900万単位／



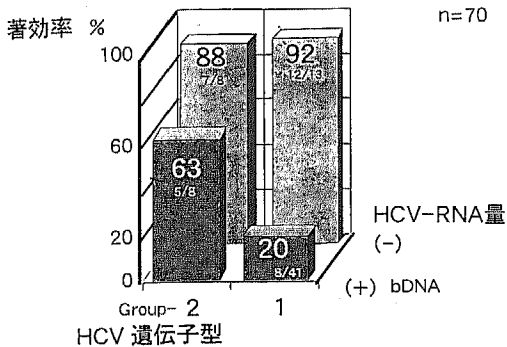


図5 C型慢性肝炎70例におけるHCV量、HCV遺伝子型とIFN治療成績；(recombinant IFN $\alpha$ 2a 900万単位/日、2週間連日後、週3回2週間、計6か月間投与)

日を、最初の2週間は連日で、その後は週3回隔日で22週間、計6か月間投与した。効果判定は、IFN治療中あるいは治療後6か月以内にGPT値が正常化、以後6か月間以上正常で推移し、かつHCV-RNAが持続陰性化した場合を著効とし、それ以外を無効とした。この判定で著効例は33例、45.8%であった。著効例は組織学的にも炎症像が著明に改善し、ほぼ治癒といえる非特異反応にまで改善した症例もある。しかし、無効例ではその後も活動性病変が持続し、一部は肝硬変・肝癌へ進展した。なお、現時点での保険診療ではPCRによるHCV-RNAの検索を行えず、効果判定はGPT値で行うしかない。

IFN治療効果の予測因子を多変量解析で検討した成績では、HCV-RNA量、HCV遺伝子型、組織学的進展度の順に有意に関与する<sup>49)</sup>。遺伝子型がgroup2の例では著効率が75%であるのに対して、group1では37%と低率である。HCV-RNA量については、bDNA法で陰性と判定されるHCV量の少ない症例で

は著効率が87%と高率であるが、HCV量の増加に伴い著効率は低下する。これらをまとめて図示すると、図5のごとくである。IFNの治療効果は、HCV型とHCV量の両方に関連し、HCVの性質に依存するといえる。これらの測定結果より治療前に効果予測がある程度可能である。組織像をみると、CPHでは著効率73%であるのに対し、CAHは45%、より進展した小葉改築傾向を伴うCAHは33%となり、組織学的進展度・活動性の低い例ほど有効である。

ところで、慢性肝炎では組織学的活動性が強い例は肝硬変へ進展しやすく真に治療を要する症例と判断される。しかし、前述の治療成績から、非活動性で進展度の低い時期でIFNを投与した方がより効果的といえる。一方、現在の保険診療では慢性活動性肝炎のみがIFN投与の適応となっている。今後は、組織学的に非活動性例も治療の適応となることが望ましい。また、無効例に対してより有効な投与方法の検討が必要である。IFN治療効果はGPT値の推移から判定されるが、HCV-RNAの推移も加味するのが望ましい<sup>49)</sup>。HCV-RNA検査は繁雑で高価であるのが難点である。HCVの増殖を反映しうるC11抗体価は、著効例では治療終了後4か月目には前値の50%以下に低下する<sup>79)</sup>ので、C11抗体のようなcore抗体価の推移からも治療効果の判定が可能である。

#### おわりに

HCVの分子生物学的側面を解説し、HCV感染症の臨床面についても概説した。C型慢性肝炎は、HCV感染が持続する限り治癒は期待できず、その病因論的治療の原則は、HCVの増殖を抑制・終息を促進することであるが、遺伝子工学を駆使して解明されてきたHCVに関する知見がHCV感染症への病因論的対応を可能にしたといえる。

#### 文 献

- 1) Purcell RH: The hepatitis viruses: An overview. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds), Viral hepatitis and liver disease, 1993 ISVHLD, pp 19-21, Springer-Verlag, Tokyo, 1994
- 2) Blumberg B, Alter H, Visnich S: A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191: 541-546, 1965
- 3) Feinstone S, Kapikian A, Purcell R: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. Science 182: 1026-1028, 1973
- 4) 清澤研道: B型肝炎ウイルスの分子生物学と臨床への応用. 信州医誌 34: 3-19, 1986
- 5) Alter H, Purcell R, Holland P, Feinstone S, Morrow A, Moritsugu Y: Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet 2: 838-841, 1975
- 6) Balayan M, Andjaparide A, Sabinskaya S, Ketiladze E, Braginsky D, Savinov A, Polesschuk V:

Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20 : 23-31, 1983

- 7) Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Furuta K, Usuda S, Yousuf M, Furuta S : Transition of antibody to hepatitis C virus from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 81 : 1089-1091, 1990
- 8) Hoofnagle J, Mullen K, Brian-Jones D, Rustgi V, Di-Bisceglie A, Peters JGM, Park JEAY : Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315 : 1575-1578, 1986
- 9) Choo QL, 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 : 359-362, 1989
- 10) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Houghton M : An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244 : 362-364, 1989
- 11) Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL : Molecular biology of the hepatitis C viruses : implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14 : 381-388, 1991
- 12) Miller RH, Purcell RH : Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 2057-2061, 1990
- 13) Ulrich PP, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Daniel LJ, Vyas GN : Detection, semiquantitation, and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. *J Clin Invest* 86 : 1609-1614, 1990
- 14) Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H : Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 65 : 1105-1113, 1991
- 15) Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Houghton M : Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2451-2455, 1991
- 16) Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1711-1715, 1991
- 17) 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. *J Gen Virol* 72 : 2697-2704, 1991
- 18) 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
- 19) Okamoto H, Kanai N, Mishiro S : Full-length nucleotide sequence of a Japanese hepatitis C virus isolate (HC-J1) with high homology to USA isolates. *Nucleic Acids Res* 20 : 6410, 1992
- 20) Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH : Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 3392-3396, 1991
- 21) Chiba J, Ohba H, Matsuura Y, Watanabe Y, Katayama T, Kikuchi S, Saito I, Miyamura T : Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 4641-4645, 1991

- 22) Matsuura Y, Harada S, Suzuki R, Watanabe Y, Inoue Y, Saito I, Miyamura T : Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J Virol* 66 : 1425-1431, 1992
- 23) 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. *J Virol* 67 : 3835-3844, 1993
- 24) Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C, Chien D, Kuo C, Houghton M : Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 74 : 1103-1113, 1993
- 25) 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. *Jpn J Exp Med* 60 : 167-177, 1990
- 26) Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, Suzuki T, Katayama T, Takebe Y, Saito I, Miyamura T : Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol* 65 : 3015-3021, 1991
- 27) Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A : Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66 : 1476-1483, 1992
- 28) Kohara M, Tsukiyama-Kohara K, Maki N, Asano K, Yamaguchi K, Miki K, Tanaka S, Hattori N, Matsuura Y, Saito I : Expression and characterization of glycoprotein gp35 of hepatitis C virus using recombinant vaccinia virus. *J Gen Virol* 73 : 2313-2318, 1992
- 29) Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishiro S : Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 196 : 354-357, 1993
- 30) Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H : Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 6037-6041, 1993
- 31) Okada S, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Mishiro S : The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 16 : 619-624, 1992
- 32) Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M : 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
- 33) Mita E, Hayashi N, Ueda K, Kasahara A, Fusamoto H, Takamizawa A, Matsubara K, Okayama H, Kamada T : Expression of MBP-HCV NS1/E2 fusion protein in *E. coli* and detection of anti-NS1/E2 antibody in type C chronic liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 183 : 925-930, 1992
- 34) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K : Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 220-228, 1991
- 35) Yamaguchi K, Tanaka E, Higashi K, Kiyosawa K, Matsumoto A, Furuta S, Hasegawa A, Tanaka S, Kohara M : Adaptation of hepatitis C virus for persistent infection in patients with acute hepatitis. *Gastroenterology* 106 : 1344-1348, 1994
- 36) 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. *J Virol* 67 : 3923-3930, 1993
- 37) Shimizu Y, Hijikata M, Iwamoto A, Alter H, Purcell R, Yoshikura H : Neutralizing antibodies against hepatitis C virus the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 68 : 1494-1500, 1994
- 38) Choo QL, Kuo G, Ralson R, Weiner AJ, Chien D, Van-Nest G, Han J, Berger K, Thudium K, Kuo C, Kansopon J, MacFarland J, Tabrizi A, Ching K, Moss B, Cummins LB, Houghton M, Muchmore E :

- Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 1294-1298, 1993
- 39) Tomei L, Failla C, Santolini E, De-Francesco R, La-Monica N : NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 67 : 4017-4026, 1993
  - 40) Alter H, Purcell R, Holland P, Popper H : Transmissible agent in 'non-A, non-B' hepatitis. *Lancet* 1 : 459-463, 1978
  - 41) Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S : p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 191 : 431-434, 1992
  - 42) Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M : Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 : 1755-1760, 1994
  - 43) 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. *J Gen Virol* 74 : 2391-2399, 1993
  - 44) Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, Choo QL, 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, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice C, Roggendorf M, Schalm SW, Shikata T, Shimotohno K, Stuyver L, Trepo C, Weiner A, Yap PL, Urdea MS : A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19 : 1321-1324, 1994
  - 45) 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
  - 46) Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Munekata 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
  - 47) 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. *Hepatology* 19 : 1347-1353, 1994
  - 48) Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, Yap PL, Simmonds P : Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 73 : 1131-1141, 1992
  - 49) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki T, Ogata H, Kiyosawa K : Viral and host factors that contribute to efficacy of interferon- $\alpha$ 2a therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 39 : 1273-1280, 1994
  - 50) Tanaka E, Kiyosawa K, Matsumoto A, Sodeyama T, Urushihara A, Suzuki T, Kobayashi M, Furuta S : Prevalence of hepatitis C virus with different genotypes determined by a group-specific antibody assay in Japanese patients with chronic liver diseases due to hepatitis C virus infection. *Jpn J Med Sci Biol* 47 : 47-57, 1994
  - 51) Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore EE, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S : Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee : variability and stability. *Virology* 190 : 894-899, 1992
  - 52) Weiner AJ, Thaler MM, Crawford K, Ching K, Kansopon J, Chien DY, Hall JE, Hu F, Houghton M : A unique, predominant hepatitis C virus variant found in an infant born to a mother with multiple variants.

- J Virol 67: 4365-4368, 1993
- 53) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH: 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.
  - 54) Kiyosawa K, Furuta S: Review of hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 383-391, 1991
  - 55) Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K: Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* 16: 300-305, 1992
  - 56) Urushihara A, Suzuki T, Matsumoto A, Tanaka E, Sodeyama T, Kiyosawa K, Furuta S: Quantitative assay for anti-HCV-core antibody in healthy individuals found anti-HCV positive during a mass screening. *Int Hepatol Commun* 2: 47-51, 1994
  - 57) 鈴木俊夫, 松本晶博, 田中栄司, 袖山 健, 清澤研道, 古田精市: bDNA プローブ法による血清中 HCV RNA の定量と C 型慢性肝炎インターフェロン治療における同法の有用性の検討. *肝臓* 35: 183-184, 1993
  - 58) 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. *J Med Virol* 39: 318-324, 1993
  - 59) Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T, Hayata T, Ohike Y, Nakano Y, Yoshizawa K, Furuta S, Watanabe Y, Watanabe J: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Japanese schoolchildren: comparison with adult blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 46: 460-464, 1992
  - 60) Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshizawa K, Yabu K, Furuta K, Nakano Y, Usuda S, Uemura K, Furuta S, Watanabe Y, Watanabe J, South-Kiso-Hepatitis-Study-Group: Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community-acquired infection. *Gastroenterology* 106: 1596-1602, 1994
  - 61) Kiyosawa K, S Furuta: Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. In: Reesink H (ed), *Hepatitis C*. *Curr stud hematol blood transf*, pp 98-120, Karger, Basel, 1994
  - 62) Shimizu S, Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Nakano M: High prevalence of antibody to hepatitis C virus in heavy drinkers with chronic liver diseases in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 30-35, 1992
  - 63) Tanaka E, Kiyosawa K, Seki T, Matsumoto A, Sodeyama T, Furuta S, Kumagai T, Kohara M: Low prevalence of hepatitis C virus infection in patients with auto-immune hepatitis type 1. *J Gastroenterol Hepatol* 8: 442-447, 1993
  - 64) Sodeyama T, Kiyosawa K, Urushihara A, Matsumoto A, Tanaka E, Furuta S, Akahane Y: Detection of hepatitis C virus markers and hepatitis C virus genomic-RNA after needlestick accidents. *Arch Intern Med* 153: 1565-1572, 1993
  - 65) Sodeyama T, Kiyosawa K, Urushihara A, Matsumoto A, Tanaka E, Furuta S, Mizokami M, Akahane Y: Transmission of hepatitis C virus through needlestick accidents in health care workers. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds), *Viral hepatitis and liver disease*, pp 459-452, Springer-Verlag, Tokyo, 1994
  - 66) Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Shimizu S, Furuta S, Miyazaki Y, Akahane Y, Suzuki H: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in Japan. *J Med Virol* 33: 114-116, 1991
  - 67) Roberts J, Searle J, Cooksley W: Histological patterns of prolonged hepatitis C infection. *Gastroenterol Jpn* 5: 37-41, 1993
  - 68) Mori H, Yabu K, Yoshizawa K, Usuda S, Tanaka E, Kiyosawa K, Hasegawa A, Kohara M, Furuta S: In vitro immune responses specific for NS3 regional peptide (C7) and core regional peptide (C11) of

- HCV in chronic hepatitis C. In : Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds), *Viral hepatitis and liver disease*, pp 182-185, Springer-Verlag, Tokyo, 1994
- 69) Yousuf M, Nakano Y, Tanaka E, Sodeyama T, Kiyosawa K : Persistence of viremia in patients with type -C chronic hepatitis during long-term follow-up. *Scand J Gastroenterol* 27 : 812-816, 1992
- 70) Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T, Nakano Y, Yoshizawa K, Hayata T, Shimizu S, Nakatsuji Y, Koike Y, Furuta S : Significance of antibody to hepatitis C virus in Japanese patients with viral hepatitis : relationship between anti-HCV antibody and the prognosis of non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *J Med Virol* 33 : 117-122, 1991
- 71) Suzuki T, Tanaka E, Matsumoto A, Sodeyama T, Kiyosawa K : Usefulness of simple assays for serum concentration of hepatitis C virus (HCV) RNA and HCV genotype in predicting response of patients with chronic hepatitis C to interferon  $\alpha$ 2a therapy. *Hepatology* (投稿中)
- 72) Urushihara A, Sodeyama T, Matsumoto A, Tanaka E : Changes in antibody titers to hepatitis C virus following interferon therapy for chronic infection. *J Med Virol* 42 : 348-356, 1994
-