

C형 간염바이러스 혈청형과 HCV RNA 정량적 분석

김영아 · 김현숙 · 한광협*

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 내과학교실*

HCV Serotypes and HCV RNA Quantitation

Young Ah Kim, M.D., Hyon-Suk Kim, M.D., and Kwang Hyub Han, M.D.*

Departments of Clinical Pathology and Internal Medicine*, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : There are several serological subtypes (serotypes) of hepatitis C virus (HCV) which can be detected by a serological enzyme immunoassay (EIA) method which detects the HCV subtype-specific antibodies against the NS4 region of the virus. We determined the HCV serotypes chronic HCV infected patients in terms of clinical applications.

Methods : Subtypes based on Simmonds' classification were detected in chronic HCV patients serologically and viral loads quantitated with branched DNA (bDNA) assay. The EIA was compared with multiplex PCR method.

Results : The serotype 1 (Simmonds' classification, 1a, 1b, 1c), the most prevalent form in Korea followed by serotype 2 (Simmonds' classification, 2a, 2b, 2c). The distribution of serotypes and HCV viral loads were not different according to disease severity. The patients infected with serotype 1 had higher viremic level (serotype 1, 7.4 ± 15.5 MEq/mL; serotype 2, 1.1 ± 2.2 MEq/mL, $P=0.017$). The serotype matched with the genotype in 85.7% (18/21) of cases.

Conclusions : HCV serotype 1 is the most prevalent form in Korea and seemed to be able to more actively replicate than serotype 2. Both multiplex PCR and EIA can be used for detecting HCV subtypes and mutually interpretable. (*Korean J Clin Pathol 1998; 18: 259-64*)

Key words : HCV, Subtype, Serotype, Genotype, Enzyme immunoassay (EIA), Multiplex PCR, Branched DNA (bDNA), Viral load quantitation

서론

C형 간염바이러스(hepatitis C virus, HCV)는 flaviviridae에 속하는 RNA 바이러스로 다양한 유전적 구조에 따라 여러 가지 아형이 알려져 있으며 Simmonds[1, 2]나 Okamoto[3-5]가 제안한 분류에 따라 나누고 있다. HCV 아형에 따라 지역간 분포[6, 7], 질병 유발정도(disease inducing activity)[8, 9] 및 치료반응정도가 다르다고 한다[10-12].

HCV 아형의 검사는 아형특이 시발체를 사용한 multiplex PCR [4, 5], reverse hybridization line probe assay[13] 및 restriction fragment length polymorphism (RFLP)[6, 14] 등의 분자생물학적 방법으로 유전자아형(genotype)을 주로 결정해왔으나, 최근 효소면역법으로 중심부, nonstructural region 4 (NS4) 등의 아미노산의 차이에 따라 생성되는 아형특이 항체를 검출하여 아형(혈청학적 유전자아형, 혈청형)을 검사하는 방법도 소개되고 있다 [15-17].

본 연구의 목적은 한국의 HCV 혈청형 분포를 알아보고, 혈청형에 따라 질병유발정도에 차이가 있는지 알아보고자 하는 것이다. 이를 위해서 만성C형 간질환에서 HCV 혈청형 검사, HCV RNA 정량 및 간기능 검사를 실시하여 혈청형 분포 및 복제능력을 비교해 보았다.

접 수 : 1998년 3월 21일 접수번호: KJCP1140
수정본접수 : 1998년 5월 14일
교신저자 : 김현숙
우 135-720 서울특별시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 임상병리과
전화 : 02-3497-3531, Fax : 02-3462-9493

대상 및 방법

1. 대상

1996년 8월부터 1997년 8월까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에 내원한 64명의 만성 C형 간질환을 대상으로 하였다. 질환 정도에 따라 대상군을 I 군(만성 간염, 28명)과 II 군(간경변 또는 간암, 36명)으로 분류하였다. 모든 대상 환자는 B형 간염바이러스의 혈청학적 검사를 실시하여 B형 간염바이러스의 중복감염은 배제하였다. 검체는 무균적으로 정맥 채혈하여 1시간 이내에 혈청 분리하여 -20°C 이하에서 보관 후 사용하였다.

2. 방법

1) 혈청학적 검사를 이용한 HCV 혈청형

혈청학적 HCV 아형(혈청형) 검사는 Murex HCV Serotyping 1-6 Assay[®] (Murex Diagnostics Limited, Dartford, England)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 검사하였다. 이 방법은 혈청형에 따라 NS4 부위의 아미노산에 차이가 있으므로, 효소면역법으로 이 부분에 대한 혈청형특이 항체를 검출하여 아형을 결정하는 방법이다. 결과는 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 정도관리를 위해 매 검사마다 양성 대조군을 포함시켰다. 검사결과 해석은 제조사의 설명서에서 권유하는 바에 따랐으며, 중복감염의 경우 따로 분류하였다.

2) 중합효소연쇄반응을 이용한 HCV 유전자아형

아형특이 시발체로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하여 HCV 유전자아형을 결정하였다(4, 5). 공통 시발체를 사용하여 중심부의 일부분을 1차 증폭시킨 후 아형에 따라 반응산물의 크기가 다르게 2차 증폭 시켰다. 증폭산물의 크기는 49 bp (1a), 144 bp (1b), 174 bp (2a), 123 bp (2b) 및 88 bp (3a)이다.

3) HCV 아형의 분류

HCV 유전자아형은 주로 Simmonds[1, 2]나 Okamoto[3-5]의 분류법이 널리 쓰인다. 두 분류법은 상호 해석이 가능하다(Table 1). 혈청형의 경우 Simmonds 등의 분류법과 잘 일치하였다.

본 연구자가 HCV 유전자형을 결정한 방법은 Okamoto 등의 방법을 따랐으나, 혈청형에 통일하여 Simmonds 등의 분류법에 따라 표기하였다.

Table 1. Nomenclature of HCV subtypes

Okamoto*	I	II	NC	III	IV	NC	V					
Simmonds†	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	4a	5a	6a	
Serotype‡	1	1	1	2	2	2	3	3	4	5	6	

*Okamoto et al., 1992, 1993, genotype determined by PCR; † Simmonds et al., 1993, genotype determined by PCR; ‡ Serotype determined by Murex HCV Serotyping 1-6 Assay[®] (Murex Diagnostics Limited, Dartford, England).

4) HCV RNA 정량

Branched DNA (bdDNA)법인 Quantiplex[™] HCV RNA 2.0 Assay (Chiron Corporation, Emeryville, CA., USA)를 사용하여 제조사의 술식에 따라 검사하였다. 이 방법은 sandwich nucleic-acid hybridization법으로 유전자 자체를 증폭하는 것이 아니라 혈청으로부터 HCV RNA를 분리한 후 표적 표식자를 보합시키고 합성된 bdDNA 분자가 부착된 표식자를 이용하여 신호를 증폭시켜 화학발광기질의 발광정도로 정량하는 방법이다. 농도는 알고 있는 표준물질을 이용하여 표준곡선을 산출하여 결과를 HCV RNA megaequivalent per mL (MEq/mL)로 나타내었다. 1 MEq/mL은 3.2 Kb HCV RNA transcript 10⁶에 해당하는 양이다. 이 방법은 아형에 영향을 받지 않고 특이성이 좋은 것으로 보고된 바 있다[18].

5) 간기능 검사

Hitachi 747 analyzer (Hitachi Corporation, Japan)를 이용하여 AST, ALT 등의 간효소치와 총빌리루빈치를 측정하였다.

6) 혈청형 검사의 재현성

재현성을 보기 위해 12개의 검체에서 24시간 간격으로 2회 반복 측정하였다.

7) 혈청형 검사와 PCR법의 상관성

총 27명의 환자에서 혈청형 검사와 PCR법으로 HCV 아형을 검사하였다.

3. 결과분석

HCV 혈청형의 분포를 알아보고 chi-square test를 실시하여 분포의 차이를 알아보았다. 또 HCV RNA 양과 간기능 검사 결과는 윌콕슨 순위합 검정으로 검토하였다. 통계처리는 DOS용 SAS 프로그램(version 6.04 for MS DOS, SAS Inco., USA)을 사용하였다.

결 과

1. 대상군

전체 대상군 64명 중 남자 39명, 여자 25명이었다. 대상군을 간질환의 진행정도에 따라 I 군과 II 군으로 나누었는데 만성 간염인

Table 2. The distribution of HCV serotypes

Group	No.*	HCV serotype (%)		
		1	2	Other†
I‡	21	12 (57.1)	9 (42.9)	0 (0.0)
II§	26	15 (57.7)	11 (42.3)	0 (0.0)
Total	47	27 (57.4)	20 (42.6)	0 (0.0)

*Numbers of patients whose serotype was determined by serologic method; † Other included serotype 3, 4, 5, 6; ‡ Chronic hepatitis; §Advanced liver disease.

I 군은 28명으로 평균연령은 47.5 (18-64)세, 남녀의 비는 1.3:1이었고 진행된 간질환인 II 군은 36명으로 평균연령은 65.6 (54-77)세, 남녀의 비는 1.8:1이었다.

2. 혈청형 검사에 의한 HCV 아형

만성C형 간질환 64명의 환자에서 시행한 혈청형 검사에서 47명에서 HCV 아형(혈청형)을 결정할 수 있었는데, 한국에서 가장 흔한 혈청형은 1형(57.4%, 27/47)이었고 나머지는 모두 2형(42.6%, 20/47)이었다. 4명은 중복감염이었으나 반복 검사에서 재현성이 충분치 않아서 결과에 포함시키지 않았다. 13명에서는 혈청형을 결정할 수 없었는데 아마도 혈청내 충분한 양의 항체가 존재하지 않았기 때문으로 생각된다. 혈청형이 결정된 47명을 I 군(만성 간염)과 II 군(진행된 간질환)으로 분류하였을 때 가장 흔한 혈청형은 두 군 모두 1형이었으나, 분포에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P=0.970$, chi-square test)(Table 2).

3. HCV RNA 정량

혈청형이 결정된 47명 중 42명에서 HCV RNA 정량을 실시하였다. I 군은 2.3 ± 4.5 MEq/mL ($n=19$), II 군은 7.2 ± 16.3 MEq/mL ($n=23$)였으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.092$). HCV 혈

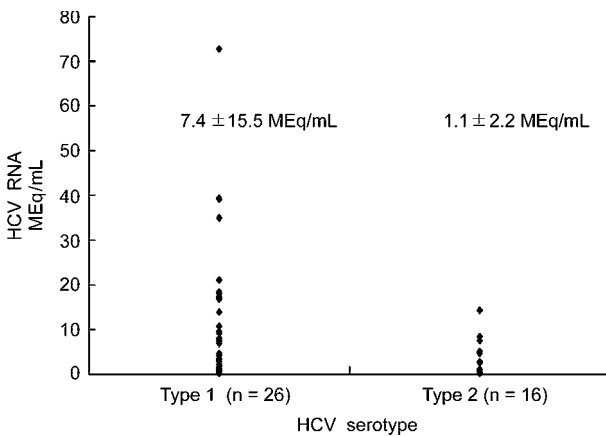


Fig. 1. The HCV viral loads quantities in patients with different serotypes ($n=42$).

Table 3. The liver function tests in patients with different HCV serotypes

Serotype	No.	Liver function test		
		AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Total bilirubin (mg/dL)
Type 1	24	96.6 ± 283.9	17.9 ± 28.5	0.69 ± 0.59
Type 2	19	35.8 ± 43.9	14.8 ± 11.2	0.43 ± 0.35
P*		0.488	0.869	0.122

*Wilcoxon rank sum test

청형 1형은 7.4 ± 15.5 MEq/mL ($n=26$), 2형은 1.1 ± 2.2 MEq/mL ($n=16$)로 1형의 환자들에서 HCV RNA 양이 많았다($P=0.017$, Fig. 1).

4. 혈청형에 따른 간기능 검사

혈청형이 결정된 47명 중 43명에서 간기능 검사를 실시하였다. AST는 96.6 ± 283.9 IU/L (1형)와 35.8 ± 43.9 IU/L (2형), ALT는 17.9 ± 28.5 IU/L (1형)와 14.8 ± 11.2 IU/L (2형), 총빌리루빈치는 0.69 ± 0.59 mg/dL (1형)와 0.43 ± 0.35 mg/dL (2형)로 모든 항목에서 두 군에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3).

5. 혈청형 검사법의 재현성

12개의 동일한 검체에서 24시간 간격으로 2회 반복 측정시 각 검체 당 8개의 흡광도를 측정하므로 96개의 optical density (O.D.)치를 비교할 수 있었으며, $r^2=0.818$ 로 비교적 재현성이 좋았다(Fig. 2).

6. 혈청형과 유전자아형의 비교

27명에서 HCV 혈청형과 유전자아형을 검사한 결과 21명에서

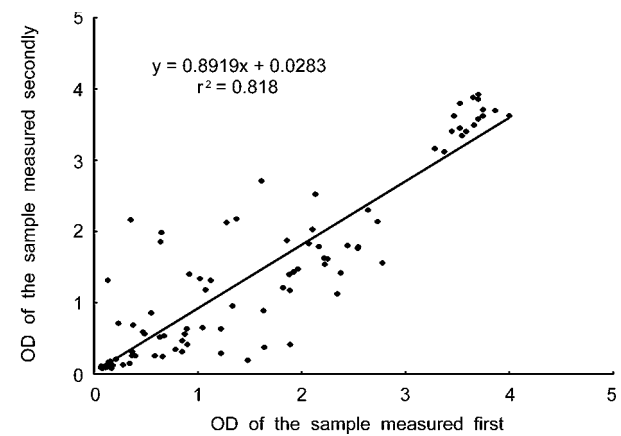


Fig. 2. The reproducibility of HCV serotyping ($n=96$). The optical density (OD) of 12 samples in 8 different wells of microplate are compared each other.

Table 4. The comparison between HCV serotype and genotype (concordance rate=85.7%, 18/21)

		Genotype	
		1b	2a
Serotype	Type 1	13	1
	Type 2	2	5

아형이 결정되었고 이중 18명에서 유전자아형(Simmonds 등의 분류법)과 혈청형의 결과가 일치하여 일치율은 85.7% (18/21)이었다. 또 2명은 유전자아형만, 4명은 혈청형만 결정할 수 있었다 (Table 4).

고 찰

HCV는 유전적 다양성에 따라 여러 가지 아형(subtype)이 알려져 있고 HCV 아형간 지역 분포, 질병유발정도[8, 9] 및 치료에 대한 반응정도가 다른 것으로 보고되고 있다[10-12]. 한국의 HCV 아형은 PCR법을 이용한 유전자아형(genotype)이 알려져 있으며, 흔히 관찰되는 아형이나 간질환별 분포는 일본과 비슷하리라 생각되고 있다[19-20].

혈청학적 아형(혈청형, serotype) 검사법은 HCV의 유전자아형 간에 C100-3 단백질에 대한 1세대 anti-HCV ELISA 및 2세대 recombinant immunoblot assay에 대한 반응이 차이가 있음이 밝혀졌고[21], 5.11, C-33, C-22 단백질에 대해 양성도가 다른 것이 알려짐에 따라[22, 23] 최근에 고안된 것으로, 아형특이 아미노산에 대한 항체를 효소 면역법으로 검출하는 것이다. 한국의 혈청형 분포는 아직 알려지지 않았지만 외국의 경우 중심부 아미노산 차이에 바탕을 둔 혈청형 1 형과 2 형을 비교해 보면 증상이 있는 만성C형 간질환에서 혈청형 1 형이 주로 관찰되고 2 형은 간효소치가 낮은 (alanine aminotransferase, 45 IU/L 미만) 환자에서 주로 관찰되었다고 한다[15]. 반면 NS4 아미노산 차이를 이용해 분류한 혈청형 1 형과 2 형의 분포는 간질환간에 큰 차이가 없었으며, 일본의 경우 혈청형 1 형이 가장 흔히 관찰되었고(74%, 74/100), 2 형이 22% (22/100), 중복감염이 2% (2/100)에서 관찰되었다는 보고가 있다[16].

혈청형 검사 결과 47명에서 혈청형을 결정할 수 있었으며, 가장 흔한 혈청형은 1 형(57.4%, 27/47)이며 그 다음은 2 형(42.6%, 20/47)이었으나 두 혈청형 간의 분포의 차이는 일본처럼 현저하지 않았다. 본 연구의 혈청형 결과는 Simmonds의 분류와 잘 일치하였으며 유전자아형 1a, 1b 및 1c 형을 모두 혈청형 1 형으로 분류하고 있었다. 그러나 혈청형이 결정되지 않는 경우는 전체 64명중 13명으로 일본의 경우보다 높았는데, 일본의 경우는 2세대 anti-HCV로 양성인 확인된 검체만을 대상으로 하였으나 본 연구에 사용된 검체는 anti-HCV 양성시기와 시간적 차이가 있었기 때문으로 생각된다.

HCV 아형의 임상적인 의미에 대해서는 유전자아형 1b 형이 다

른 형에 비해 간경변이나 간암으로 이환이 잘된다고 알려져 있으며 [8, 9], 유전자아형 1b 형이 2a 형보다 바이러스 양도 많고, 임상적 증상도 심하다고 알려져 있다[24]. 인터페론 치료에서도 1b 형일 때 치료에 반응이 적었다고 한다[8, 12]. 본 연구에서는 혈청형이 결정된 47명을 I 군(만성 간염)과 II 군(진행된 간질환)으로 분류하였을 때 가장 흔한 혈청형은 두 군 모두 1 형이었고, 분포에 서로 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P=0.970$). 또 HCV 혈청형 간의 질병유발정도 및 복제능력의 차이를 알아보려고 간기능 검사와 HCV RNA 정량을 실시하였다. 간기능 검사상 AST는 96.6 ± 283.9 (1형)와 35.8 ± 43.9 (2형), ALT는 17.9 ± 28.5 (1형)와 14.8 ± 11.2 (2형), 총빌리루빈치 0.69 ± 0.59 (1형)와 0.43 ± 0.35 (2형)로 모든 항목에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 혈청 HCV RNA 양은 2.3 ± 4.5 MEq/mL (I 군, 만성 간염)와 7.2 ± 16.3 MEq/mL (II 군, 진행된 간질환)로 질병의 진행정도에 따라 차이는 없었지만($P=0.092$), 혈청형에 따라 7.4 ± 15.5 MEq/mL (1형)와 1.1 ± 2.2 MEq/mL (2형)로 1 형의 환자에서 2 형보다 HCV RNA 양이 많았다($P=0.017$). 간기능 검사는 간세포의 손상이 진행된 경우 그 증가가 미미할 수 있어 손상 정도를 정확하게 반영하지 못하기 때문에 혈청형에 따라 차이가 없었다고 생각된다.

HCV 아형간 HCV RNA 양의 차이는 복제능력의 차이나 면역 반응의 유발정도에 차이에 의한 것이라 생각된다. 지금까지 알려진 바로는 HCV RNA 양이 많은 경우 손상정도가 크며[25], 간질환에서 만성 지속성간염 군과 진행된 간질환 군 사이에는 HCV RNA 양에 차이가 있다는 보고가 있으며[8, 9, 25, 26] 인터페론 반응 군이 무반응 군보다 치료 전 바이러스 양이 적다고 알려져 있어 [10-12, 27-29], 본 실험의 결과는 HCV 아형간 복제능력의 차이를 보여 주고 있다고 생각할 수 있겠다. 이는 간질환 진행정도에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았지만 HCV 혈청형 1 형이 더 심각한 간질환을 일으킬 수 있음을 시사한다고 하겠다.

한편 HCV RNA 정량법에서 고려할 사항은 아형에 따라 차이가 없어야 한다는 것인데, Quantiplex™ HCV RNA 2.0 Assay (Chiron Corporation, Emeryville, CA., USA)는 6종의 유전자아형의 염기서열에 기초하여 합성된 표식자를 사용하여 아형에 영향을 받지 않으므로 본 연구에서 이것을 선택하였다[18].

본 연구에서 사용된 혈청형 검사법은 NS4 아미노산 차이에 바탕을 둔 것으로 유전자아형과 85.7% (18/21)의 일치율을 보였다. 이는 일본에서 보고한 두 방법간의 일치율 88.0% (88/100)[16]와 비슷하였으나, RFLP나 line probe assay를 이용한 유전자아형과의 일치율 99%[17]보다는 낮았다. 이 방법은 PCR법보다 신속하고 간편하게 실시할 수 있었으며 재현성은 반복검사로 흡광도치를 비교한 결과 비교적 좋은 재현성을 보였다($r^2=0.818$). 다만 중복감염의 해석에 어려움이 있었다.

PCR법을 이용한 유전자아형 검사시간이 길고 HCV RNA 양이 적은 경우 검사에 어려움이 예상되어 본 실험에서도 HCV RNA가 최소검출농도 미만(0.2 MEq/mL)인 한 검체 외에는 유전자아형의 증폭산물을 관찰할 수 없었다. 하지만 혈청형 검사법으로는 모두 1 형으로 결정되는 1a, 1b 및 1c 형을 검사하기 위해서는 유전자

아형 검사가 필요하다고 할 수 있다. 두 방법이 각각 분류법은 다르지만 각 방법에서 채택하고 있는 분류법을 상호 해석할 수 있으므로, 두 방법을 보완적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, 한국에서 가장 흔한 HCV 혈청형은 Simmonds의 분류법을 기준으로 하였을 때 1 형이며, 이에 감염된 경우 혈청내 HCV RNA 양도 2 형에 감염된 경우보다 많은 것으로 나타나 아형간 복제정도에 차이를 시사하였다. 본 연구의 결과는 HCV 혈청형과 임상적 양상의 심각성 사이에 확실한 연관성은 찾지 못하였지만 혈청형에 따라 질병유발정도에 차이가 있음을 시사하였다.

요 약

배경: C형 간염바이러스에는 여러 가지 아형이 존재하며 질환의 진행정도에 따라 분포가 차이가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 아형특이 항체를 효소면역법으로 검출한 혈청학적 아형(혈청형)을 결정하여 한국의 혈청형 분포, 간질환 진행정도에 따른 분포 및 혈청형 간 질병유발정도를 검토하였으며 혈청형 검사가 임상적인 예후의 판정의 지표로 유용한지 알아보았다.

방법: 만성 간질환에서 혈청형을 효소면역법으로 결정하였고 일부는 연쇄중합효소반응을 이용하여 유전자아형과 비교하여 보았다. 또 대장균에서 branched DNA법을 사용하여 HCV RNA 정량을 실시하였다.

결과: 한국에서 가장 흔한 혈청형은 1 형(Simmonds 분류, 1a, 1b, 1c)이었고, 나머지는 2 형이었다. 간질환 진행정도에 따라 혈청형의 분포와 HCV RNA 양은 큰 차이는 없었지만 혈청형에 따른 HCV RNA 양은 의미있는 차이를 보여 1 형에 감염된 경우 7.4 ± 15.5 MEq/mL를 2 형에 감염된 경우 1.1 ± 2.2 MEq/mL의 혈청내 HCV RNA를 가지고 있는 것으로 나타났다($P=0.017$). 혈청형과 유전자아형의 일치율은 85.7% (18/21)이었으며, 동일 검체를 반복 측정하여 확인한 재현성도 좋았다($r^2=0.818$).

결론: 한국에서 가장 흔한 혈청형은 1 형이었고, 혈청형과 간질환 진행정도에 직접적인 관련성은 밝히지 못하였지만 1 형의 환자에서 HCV RNA 양이 높으므로 혈청형에 따라 복제능력이 다르다고 생각된다. 혈청형 검사법은 유전자아형 검사법과 상관성이 좋고 상호해석할 수 있어 혈청형으로 쉽게 아형을 결정할 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9.
2. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis

C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. J Gen Virol 1993; 74: 661-8.

3. Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, et al. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331-41.
4. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai KAY, Sugai Y, Tanaka T, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73: 673-9.
5. Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, Horikita M, Kijima M, Iizuka H, et al. Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* 1993; 74: 2385-90.
6. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-92.
7. Mellor J, Walsh EA, Prescott LE, Jarvis LM, Davidson F, Yap PL, et al. Survey of type 6 group variation of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 417-23.
8. Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, et al. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver Disease. *J Med Virol* 1994; 43: 291-6.
9. Tanaka K, Ikematsu H, Hirohata T, Kashuwa S. Hepatitis C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma among Japanese: possible role of type 1b infection. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 742-6.
10. Ideo G, Bellobuono A, Mondazzi L, Tempini S, Ideo GM, Silini E. Alpha interferon treatment in chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: S167-73.
11. Lunel F and Pawotaky JM. Hepatitis C virus virological diagnosis. *Pathol Biol* 1995; 43: 681-90.
12. Peignoux MM, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1995; 22: 1050-6.
13. Vadon-Doorn LJ, Kleter B, Stuyver L, Maertens G, Brouwer H, Schalm S, et al. Analysis of hepatitis C virus genotypes by line probe assay and correlation with antibody profiles. *J Hepatol* 1994; 21: 122-9.
14. Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991; 72: 2105-12.
15. Mondelli MU, Cerino A, Bono F, Cividini A, Maccabruni A, Arico M, et al. Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2523-7.
16. Mizokami M, Mizoguchi N, Shibata H. Significance of serological genotyping of hepatitis C virus in Japanese patients with chronic liver disease due to hepatitis C. *Rinsho Byori* 1994; 42: 1015-20.
17. Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, Dinello R, et al. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with sustained genotyping methodologies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2978-83.
18. Detmer J, Lagier R, Flynn J, Zayati C, Kolberg J, Collins M, et al. Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. *J Clin Microbiol*

- 1996; 34: 901-7.
19. Kim CJ, Shin KS, Kim WY, Lim DS, Yoon SK, Park YM, et al. Genotype distribution and comparison of the putative envelope region of hepatitis C virus from Korean patients. *J Med Virol* 1995; 46: 380-6.
 20. Lee DS, Sung YC, Whang YS. Distribution of HCV genotypes among blood donors, patients with chronic liver disease, hepatocellular carcinoma, and patients on maintenance hemodialysis in Korea. *J Med Virol* 1996; 49: 55-60.
 21. Nagayama R, Tsuda F, Okamoto H, Wang Yu, Mitsui T, Tanaka T, et al. Genotype dependence of hepatitis C virus antibodies detectable by the first-generation enzyme-linked immunosorbent assay with C100-3 protein. *J Clin Invest* 1993; 92: 1529-33.
 22. Alonso C, Lamelin JP, de Sanjose S, Vitvitski L, Li J, Berby F, et al. Serological responses to different genotypes of hepatitis C virus in France. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 211-2.
 23. Zein NN, Germer JJ, Wendt NK, Schimeck CM, Thorvilson JN, Mitchell PS, et al. Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 311-2.
 24. Sinico RA, Ribero ML, Fornoldi A, Zhou J, Fasola M, Porthera G, et al. Significance of hepatitis C virus genotypes and viral load in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: S83-5.
 25. Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, Ito Y, Ohto M, Omata M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increased of the virus in advanced liver disease. *J Hepatol* 1993; 18: 16-20.
 26. Bernardi M, Glauser A, Kupferschmidt H, Havelka J, Zaugg P, Joller-Jemelka HI, et al. Virus titer and histological inflammation activity in chronic hepatitis C (Abstract). *Schweiz Med Wochenschr Suppl* 1996; 79: S30-5.
 27. Mita E, Hayashi N, Hagiwara H, Ueda K, Kanazawa Y, Kasahara A, et al. Predicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 977-82.
 28. Osada T, Iwabuchi S, Takatori M, Murayama M, Iino S. Serum level of HCV-RNA determined by branched DNA (bDNA) probe assay in chronic hepatitis C: methods and clinical significance on interferon (IFN) therapy. *Rinsho Byori* 1994; 52: 1747-53.
 29. Tsujii H, Yoshikawa M, Nakano H. HCV. *Rinsho Byori* 1993; 41: 1232-9.