

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

都築 昌之

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

(平成13年8月18日受理)

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

Masayuki TSUZUKI

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











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

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

HCV RNA の検出は、最も保存性の高い 5' UTR に由来するプライマーを設定することにより、PCR に使用するプライマー配列において HCV RNA の変異が少ないため false negative を最小限にすることができる。約 340 の塩基長からなる 5'UTR 内にも可変部位が存在し塩基置換が認められるが、この可変部位を避けてプライマーを設定することが重要である。HCV RNA の 1st PCR 産物を鋳型にして、その内側に設定したプライマーを用いてもう一度増幅する nested PCR 法は<sup>20)</sup>、感度も良くしかも特異的に HCV ゲノムを検出する方法である。今回新たに開発した 5'UTR 法では、ウイルス量が 1000 copy/ml においてはアンプリコア HCV モニター v2.0 キットを利用した簡便な操作によ

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

## 結 語

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

## 謝 辞

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

## 文 献

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

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